



Análise Vestigial de Pesticidas em Azeite: Aplicação de Polímeros Molecularmente Impressos

Nuno Miguel Costa Martins

Tese apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias
Especialidade: Ciência dos Alimentos

ORIENTADOR (A/ES): *Raquel Marta Neves dos Santos Garcia*
Maria João Pires de Bastos Cabrita

ÉVORA, SETEMBRO 2015





Análise Vestigial de Pesticidas em Azeite: Aplicação de Polímeros Molecularmente Impressos

Nuno Miguel Costa Martins

Tese apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias
Especialidade: Ciência dos Alimentos

ORIENTADOR (A/ES): *Raquel Marta Neves dos Santos Garcia*
Maria João Pires de Bastos Cabrita

ÉVORA, SETEMBRO 2015



“Que todos os vossos esforços desafiem o impossível, pois os grandes feitos foram conquistados do que outrora pareceria inatingível.”

(Charles Chaplin)

*Dedicado à minha família
e em memória dos meus avós.*

Esta dissertação é apresentada como cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias com especialidade em Ciência dos Alimentos e inclui os resultados referentes ao trabalho experimental desenvolvido durante o doutoramento, que decorreu no período de 2011 a 2015, realizado na Universidade de Évora.

A dissertação intitula-se de “Análise Vestigial de Pesticidas em Azeite: Aplicação de Polímeros Molecularmente Impressos” e enquadra-se no âmbito do projeto de investigação financiado pela FCT (PTDC/AGR-ALI/117544/2010). Mais concretamente, o trabalho de doutoramento tem como objetivo o desenvolvimento e posterior aplicação de uma metodologia analítica com capacidade para detetar e quantificar, de forma seletiva e específica, quantidades vestigiais de diversos pesticidas (dimetoato, terbutilazina e deltametrina) em amostras de azeite.

Em concreto, a presente dissertação encontra-se organizada da seguinte forma:

No ponto 1 é apresentada a introdução geral ao tema do presente trabalho.

No ponto 2 é realizada uma revisão bibliográfica, a qual se divide em 3 tópicos distintos. No tópico “I Pesticidas” são apresentadas de forma resumida algumas informações pertinentes relativamente à temática dos pesticidas, inclusive, é feita a sua classificação, são abordadas as principais classes, é ainda avaliada a importância dos pesticidas organofosforados (dimetoato), piretróides (deltametrina) e triazinas (terbutilazina) para a atividade agrícola, bem como as causas e consequências da sua toxicidade. No tópico “II Azeite” faz-se uma breve referência ao azeite, à sua importância cultural e socioeconómica, é ainda descrita de forma resumida a sua composição química e os benefícios que apresenta para a saúde humana. Por fim, no tópico “III Metodologias de Preparação de Amostra: Aplicação na Detecção e Quantificação de Pesticidas no Azeite” faz-se uma revisão crítica das metodologias analíticas descritas na literatura, fundamentalmente com maior destaque para as técnicas de preparação de amostras desenvolvidas ao longo dos últimos anos para a

determinação de pesticidas a partir de matrizes alimentares complexas, com principal enfoque nos polímeros molecularmente impressos.

No ponto 3 são abordados de forma sucinta e detalhada os principais objetivos do trabalho desenvolvido no âmbito do doutoramento.

No ponto 4 é apresentada a componente experimental, nomeadamente os materiais e métodos, bem como as metodologias realizadas para a concretização dos objetivos propostos.

No ponto 5 são apresentados os resultados obtidos durante a realização do atual trabalho de investigação, bem como a sua discussão. Com a finalidade de tornar a apresentação dos resultados e a sua interpretação mais clara e concisa, este ponto encontra-se dividido em três secções (I, II e III) de acordo com os três tipos de pesticidas que serão alvo do presente estudo (dimetoato, terbutilazina e deltametrina, respetivamente). Na secção I são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a avaliação da capacidade de reconhecimento molecular de diferentes MIPs e posterior desenvolvimento, validação e implementação de uma metodologia baseada na aplicação de polímeros de impressão molecular como adsorventes de colunas de SPE, para a determinação de resíduos de dimetoato, presentes em quantidades vestigiais em amostras de azeite. De forma similar, a secção II contempla os resultados referentes a todo o trabalho de investigação realizado durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica seletiva que permita a determinação de resíduos de terbutilazina a partir da matriz azeite. Finalmente, na secção III é essencialmente apresentado o método desenvolvido para a determinação de resíduos de deltametrina em azeite, utilizando a tecnologia MIP, bem como os resultados obtidos durante o processo de otimização e posterior aplicação desta metodologia a amostras reais, seguindo-se a sua interpretação e discussão.

Finalmente, no ponto 6 encontram-se resumidamente descritas as conclusões gerais obtidas mediante a realização do presente trabalho e são identificadas algumas perspectivas futuras e possíveis áreas de investigação.

Agradecimentos

*“Aprendi que deveríamos ser gratos a Deus
por não nos dar tudo aquilo que lhe pedimos.”*

(William Shakespeare)

A realização deste trabalho, seria, sem dúvida, dificultada ou mesmo quase impossível se não fosse a colaboração de diversas pessoas que foram incansáveis no carinho e apoio que sempre demonstraram, pelo que não posso deixar de expressar por elas o meu enorme reconhecimento e gratidão.

Aos meus pais pelo sacrifício, apoio incondicional, orientação, disponibilidade e importantes conselhos que sempre me souberam inculcar ao longo de todo o meu percurso.

Aos meus avós por todo o apoio e força que me transmitiram durante toda a minha aprendizagem.

À minha mulher e amiga Ana Rita Tique Carona, pelo seu amor, amizade, apoio, extrema paciência e por toda a força e motivação que me deu quando me sentia sem vontade de continuar.

À Doutora Raquel Marta Neves dos Santos Garcia, pela permanente disponibilidade demonstrada ao longo de todo este tempo, por todos os preciosos conselhos que me transmitiu, pela sua amizade, preocupação e pelo grandioso voto de confiança que me deu através da possibilidade de trabalhar no projeto financiado pela FCT e sem o qual teria sido extremamente difícil atingir esta meta.

À Professora Maria João Pires de Bastos Cabrita, pela orientação científica, disponibilidade e saber dispensados ao longo da realização deste trabalho, pela sua amizade e manifesto apoio, e principalmente por sempre ter acreditado em mim.

Ao Professor Fernando Manuel de Campos Trindade Rei, pela sua ajuda e disponibilidade, que foram bastante importantes para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo e colega Bruno Miguel Oliveira Soares, pelo seu apoio e companheirismo e, sobretudo por me ter incentivado a realizar este percurso.

Aos colaboradores do laboratório de Enologia pelo seu incentivo, carinho e companhia.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento parcial da minha bolsa de doutoramento, inserida no projeto PTDC/AGR-ALI/117544/2010.

Por fim, e para não me esquecer de ninguém, a todos os que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho o meu sincero obrigado.

Nuno Costa Martins

O azeite é o principal ingrediente da dieta mediterrânica devido às suas propriedades antioxidantes, aos benefícios associados à regulação dos níveis de colesterol e à prevenção das doenças cardiovasculares. Em Portugal o azeite assume um papel importante tanto a nível cultural como socioeconómico, sendo que nos últimos anos, a olivicultura tem sofrido grandes modificações, tendo-se assistido à intensificação da produção, sobretudo devido à conversão dos olivais tradicionais em sistemas de produção intensivo e super-intensivo, o que pressupõem uma maior utilização de pesticidas. Contudo, os pesticidas aplicados ao olival podem persistir até à fase de colheita e, conseqüentemente serem transferidos para o azeite, dado que o processo de transformação é meramente físico/ mecânico. Assim, por forma a garantir a segurança alimentar do consumidor é crucial desenvolver metodologias analíticas capazes de determinar resíduos de pesticidas no azeite. Porém, a análise de pesticidas em amostras vegetais com elevado teor de gordura é uma tarefa extremamente difícil devido à inerente complexidade da matriz.

Com a finalidade de ultrapassar as limitações associadas às técnicas de preparação de amostra convencionalmente utilizadas, no presente trabalho desenvolveu-se uma metodologia altamente seletiva para a extração e quantificação de cada um dos pesticidas em estudo (dimetoato, terbutilazina e deltametrina), a qual teve por base a utilização de polímeros molecularmente impressos como materiais adsorventes na extração em fase sólida (MISPE). Em concreto, as metodologias MISPE foram implementadas com sucesso para a quantificação destes pesticidas em amostras de azeite dopadas com concentrações iguais aos limites máximos de resíduos de pesticidas, permitindo obter taxas de recuperação de 90 % para o dimetoato, 92 % para a terbutilazina e 90 % para a deltametrina. Deve ainda salientar-se que estas metodologias revelaram-se bastante robustas, precisas, de fácil aplicação, requerem um reduzido manuseamento das amostras e as colunas MISPE podem ser reutilizáveis sem perder a especificidade para os analitos alvo.

Palavras-Chave: Pesticidas, Azeite, Polímeros Molecularmente Impressos.

Trace Analysis of Pesticides in Olive Oil: Application of Molecularly Imprinted Polymers

Olive oil is the main ingredient of the Mediterranean diet due to its antioxidant properties, benefits associated with the regulation of cholesterol levels and capacity to prevent cardiovascular disease. In Portugal the olive oil plays an important role in country`s culture and socio-economic development. In recent years, olive groves has undergone major changes, namely the intensification of production, mainly due to conversion of traditional olive groves in intensive and super-intensive production systems, which require a greater use of pesticides. Moreover, pesticides applied to olive trees may persist until the harvest stage, and consequently can be transferred to the olive oil, since the transformation process is purely physical/ mechanical. Thus, in order to ensure consumer`s food safety is crucial the development of efficient analytical methodologies to determine pesticide residues in olive oil. However, the analysis of pesticides in samples with high fat content is an extremely difficult task due to the inherent complexity of the matrix.

In order to overcome the limitations associated with conventional sample preparation techniques, in this work a highly selective methodology for extraction and quantification of each pesticide under study (dimethoate, terbuthylazine and deltamethrin), based on the use of molecularly imprinted polymers as adsorbent materials in the solid phase extraction (MISPE) has been developed. The MISPE methodologies have been successfully implemented for the quantification of these pesticides in olive oil samples spiked with concentrations equal to the tolerated maximum residue limits, allowing to obtain recovery rates of 90 % for dimethoate, 92 % for terbuthylazine and 90 % for deltamethrin. It should also be noted that these methodologies have proved to be very robust, accurate, easy to use, require a reduced sample handling and, also, MISPE columns can be regenerate and reusable without losing the specificity for target analytes.

Keywords: Pesticides, Olive Oil, Molecularly Imprinted Polymers.

Índice Geral

Prefácio	I
Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VI
Índice Geral	VII
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas	XVII
Abreviaturas	XIX
Designações Anglo-Saxónicas	XXIII
1.Introdução Geral	1
2.Revisão Bibliográfica	4
I.Pesticidas	4
1.1.Introdução	5
1.2.Resenha Histórica	6
1.3.Definição de Pesticidas	7
1.4.Composição dos Pesticidas	8
1.5.Legislação e Noções Básicas Referentes ao Uso de Pesticidas	8
1.6.Classificação dos Pesticidas	11
1.6.1.Grau de Toxicidade	12
1.6.2.Organismos Alvo	14
1.6.3.Via de Penetração	15
1.6.4.Modos de Ação	17
1.6.5.Classe Química	18
1.6.5.1.Organofosforados	18
1.6.5.1.1.Dimetoato	20
1.6.5.2.Piretróides	22
1.6.5.2.1.Deltametrina	25
1.6.5.3.Triazinas	28
1.6.5.3.1.Terbutilazina	30
1.7.Vantagens e Desvantagens Associadas ao Uso de Pesticidas	32
1.8.Principais Pesticidas Utilizados no Olival	35

1.9.Referências Bibliográficas	37
II.Azeite	45
2.1.Introdução	46
2.2.Resenha Histórica	46
2.3.A Oliveira, a Azeitona e o Azeite	48
2.4.Composição Química do Azeite	55
2.5.O Azeite e a Saúde	56
2.6.Possível Contaminação do Azeite com Pesticidas	58
2.7.Referências Bibliográficas	61
III.Metodologias de Preparação de Amostra: Aplicação na Detecção e Quantificação de Pesticidas no Azeite	65
3.1.Introdução	66
3.2.Técnicas de Preparação de Amostra	70
3.3.Polímeros Molecularmente Impressos	79
3.3.1.Síntese Química	81
3.3.2.Caracterização Química e Morfológica	90
3.3.3.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular	92
3.4.Metodologia de Preparação de Amostra Baseada na Utilização de Polímeros Molecularmente Impressos	102
3.4.1.Aplicação como Adsorventes de Extração em Fase Sólida	105
3.4.1.1. Detecção e Quantificação de Pesticidas no Azeite Utilizando a Metodologia MISPE	110
3.5. Referências Bibliográficas	114
3.Objetivos	126
4.Material e Métodos	128
4.1.Material	128
4.1.1.Polímeros Molecularmente Impressos	128
4.1.2.Padrões de Pesticidas	131
4.1.3.Reagentes, Solventes e Outros Consumíveis	131
4.2.Equipamentos	133
4.2.1.Cromatografia Líquida e Métodos Cromatográficos	133
4.2.2.Outros Equipamentos	135
4.3.Procedimentos Experimentais	136

4.3.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular	136
4.3.2.Estudos de Seletividade para os Sistemas de Impressão Molecular face a Compostos Análogos dos Analitos Alvo	142
4.3.3.Implementação da Metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração	142
4.3.4.Validação das Metodologias MISPE para a Detecção e Quantificação dos Pesticidas Alvo Presentes na Matriz Azeite.....	145
4.3.5.Método da Adição de Padrão	147
4.3.6.Estudos Comparativos das Metodologias MISPE com os Cartuchos de SPE C ₁₈ Comerciais	148
4.3.7.Estudos Comparativos das Metodologias MISPE com os QuEChERS	149
4.3.8.Estudos Comparativos da Metodologia tbz-tr-MISPE com os Cartuchos MISPE Disponíveis Comercialmente para a Classe das Triazinas	150
4.3.9.Aplicação das Metodologias MISPE para a Detecção e Quantificação dos Diferentes Pesticidas Alvo em Azeites Comerciais ...	151
4.3.10.Identificação e Quantificação dos Pesticidas	151
4.4.Referências Bibliográficas	153
5.Resultados e Discussão	154
I.Polímeros Molecularmente Impressos Seletivos para o Dimetoato: Aplicação como Adsorventes na Extração em Fase Sólida para a sua Detecção e Quantificação em Azeite	154
5.I.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular	155
5.I.1.1. Avaliação Cromatográfica: Fatores de Impressão Molecular	155
5.I.1.2.Estudos de Adsorção em Solução	161
5.I.1.3.Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE	168
5.I.2.Estudos de Seletividade do dmt-inif-MIP	172
5.I.3.Implementação da Metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração	175
5.I.4.Validação da Metodologia dmt-inif-MISPE para a Detecção e Quantificação de Dimetoato em Amostras de Azeite Dopado	179

5.I.5.Estabilidade e Capacidade de Reutilização da Coluna dmt-inif-MIP ...	184
5.I.6.Efeito de Matriz - Método de Adição Padrão	185
5.I.7.Estudos Comparativos da Metodologia dmt-inif-MISPE com os Cartuchos de SPE C ₁₈ Comerciais e com a Metodologia QuEChERS	187
5.I.8.Aplicação da Metodologia dmt-inif-MISPE para a Detecção e Quantificação de Dimetoato em Diferentes Azeites Comerciais	192
II.Polímeros Molecularmente Impressos Seletivos para a Terbutilazina: Aplicação como Adsorventes na Extração em Fase Sólida para a sua Detecção e Quantificação em Azeite	194
5.II.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular	195
5.II.1.1.Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE	195
5.II.2.Estudos de Seletividade do tbz-tr-MIP para a Terbutilazina	200
5.II.3.Implementação da metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração	203
5.II.4.Validação da Metodologia tbz-tr-MISPE para a Detecção e Quantificação de Terbutilazina em Amostras de Azeite Dopado	209
5.II.5.Estudos Comparativos da Metodologia tbz-tr-MISPE com os Métodos Convencionais de Preparação de Amostras e com os Cartuchos (SupelMIP TM SPE – Triazine 10)	214
5.II.6.Aplicação da Metodologia tbz-tr-MISPE para a Detecção e Quantificação de Terbutilazina em Diferentes Azeites Comerciais	222
III.Polímeros Molecularmente Impressos Seletivos para a Deltametrina: Aplicação como Adsorventes na Extração em Fase Sólida para a sua Detecção e Quantificação em Azeite	224
5.III.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular	225
5.III.1.1.Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE	225
5.III.2.Estudos de Seletividade do dn-tr-MIP-2 para a Deltametrina	229
5.III.3.Implementação da Metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração	232
5.III.4.Validação da Metodologia dn-tr-MISPE para a Detecção e Quantificação de Deltametrina em Amostras de Azeite Dopado	237
5.III.5.Efeito de Matriz - Método de Adição Padrão	240

5.III.6.Estudos Comparativos da Metodologia dn-tr-MISPE com os Cartuchos de SPE C ₁₈ Comerciais e com a Metodologia QuEChERS	242
5.III.7.Aplicação da Metodologia dn-tr-MISPE para a Detecção e Quantificação de Deltametrina em Diferentes Azeites Comerciais	246
5.IV.Referências Bibliográficas	248
6.Conclusões e Perspetivas	253
7.Anexos	258

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática das diferentes classes de pesticidas (Nollet, 2010).	11
Figura 2. Representação da fórmula estrutural geral da classe dos organofosforados ($X = O, S, N,$ ou C ; $Y = O, S,$ ou N ; $Z = O$ ou S) (Kavvalakis <i>et al.</i> , 2012).	19
Figura 3. Representação geral da estrutura química do dimetoato.	20
Figura 4. Representação da estrutura química de alguns piretróides ($X = Cl, Br,$ ou $-CH_3$; $Y = -CF_3, Cl, Br$ ou $-CH_3$; $R = -CN$ ou H).	23
Figura 5. Estrutura química da Deltametrina.	26
Figura 6. Representação da estrutura química geral de uma <i>s</i> -triazina ($R_1 = Cl, -OCH_3$ ou $-SCH_3$; R_2 e $R_3 = -NH_2$).	28
Figura 7. Representação da estrutura química da terbutilazina.	30
Figura 8. Representação esquemática das diferentes etapas usadas durante o processo usualmente utilizado para a obtenção de azeite (adaptado de Firestone, 2005).	51
Figura 9. Técnicas de preparação de amostra amplamente utilizadas na extração de pesticidas em amostras de azeite (adaptado de Gilbert-López <i>et al.</i> , 2009).	73
Figura 10. Representação esquemática do processo de síntese do MIP. (a) Etapa de pré-polimerização na qual se verifica a formação do complexo entre a molécula molde (T) e os monómeros funcionais (M); (b) Etapa de polimerização que resulta da adição de um agente de ligação cruzada (A) e um iniciador radicalar ao sistema; (c) Extração da molécula molde dos locais de ligação; (d) Obtenção do polímero com locais de ligação específica (com carácter reversível) para o analito alvo (Adaptado de Sigma-Aldrich, 2015).	82

Figura 11. Representação esquemática dos estudos de adsorção em solução para avaliação da capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular. (T) Molécula molde; (MIP) Polímero Molecularmente Impresso; (a) Agitação; (b) Remoção do MIP por centrifugação seguida de filtração; (1) Analito retido nas cavidades do MIP após se estabelecer o equilíbrio; (2) Analito livre em solução. (Adaptado de García-Calzón e Díaz-García, 2007). 93

Figura 12. Representação gráfica geral das isotérmicas de adsorção referentes ao MIP e respetivo NIP (Adaptado de Spivak, 2005). 95

Figura 13. Princípio geral da avaliação cromatográfica dos polímeros molecularmente impressos através do uso destes materiais como adsorventes de fase estacionária em cromatografia líquida. Análise do analito alvo (1) e subsequentemente análise do marcador de volume morto (2) (Adaptado de García-Calzón e Díaz-García, 2007). 13

Figura 14. Aplicação da tecnologia de impressão molecular a diferentes técnicas de preparação de amostra: a) SPE; b) fibra de SPME; c) tubo capilar de SPME; d) membranas; e) SBSE; f) partículas magnéticas; g) agulha/ ponta de micropipeta (Adaptado de Hu *et al.*, 2013). 103

Figura 15. Representação esquemática das diferentes etapas do processo de extração MISPE. 1) Acondicionamento do adsorvente; 2) Aplicação da amostra; 3) Remoção dos compostos interferentes; 4) Eluição do analito alvo (Adaptado de Garcia *et al.*, 2011). 107

Figura 16. Perfis cromatográficos relativos à eluição do dimetoato da coluna cromatográfica contendo o dmt-tr-MIP-1 como fase estacionária, mediante a utilização de diferentes fases móveis: (1) acetonitrilo-água (8:2 (v/v)); (2) acetonitrilo; (3) metanol e (4) metanol-água (8:2 (v/v)); fluxo de 0,5 mLmin⁻¹ e deteção $\lambda = 220$ nm. 156

Figura 17. Perfis cromatográficos correspondentes à eluição do dimetoato na coluna cromatográfica empacotada com (a) NIP e (b) MIP. Condições cromatográficas: fase móvel – MeOH, fluxo - 1 mLmin⁻¹ e deteção $\lambda = 220$ nm. 160

- Figura 18.** Isotérmicas de adsorção determinadas experimentalmente referentes aos MIPs- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e correspondentes NIPs. Os ensaios foram realizados em duplicado e o valor apresentado corresponde à média das determinações (n = 2). 163
- Figura 19.** Imagens obtidas por SEM referentes aos sistemas de impressão molecular a) dmt-tr-MIP-1 e b) dmt-tr-MIP-2 (voltagem 15 kV, resolução de 30000 x). 165
- Figura 20.** Capacidade de adsorção do dmt-inif-MIP e correspondente NIP. 169
- Figura 21.** Imagens obtidas por SEM correspondentes aos sistemas de impressão moleculares a) dmt-inif-MIP e b) dmt-inif-NIP, com uma voltagem de aceleração de 10 kV e ampliação de 11,0 mm x 5,00 k SE. 171
- Figura 22.** Representação geral das estruturas químicas do dimetoato e dos diferentes compostos análogos pertencentes à classe dos organofosforados. 174
- Figura 23.** Efeito do uso de diferentes solventes (utilizados na etapa de aplicação da amostra) na taxa de recuperação do dmt. 176
- Figura 24.** Efeito do uso de diferentes solventes utilizados durante a etapa de lavagem da metodologia dmt-inif-MISPE, a eluição foi efetuada utilizando 2 mL de metanol. 178
- Figura 25.** Cromatogramas de HPLC-DAD dos extratos obtidos após a extração de uma alíquota de 1 g de azeite contendo $29,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de tbz, mediante a aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE às colunas contendo como adsorvente o dmt-inif-MIP (A) e o respectivo NIP (B). Taxa de recuperação de tbz referente ao MIP: 64 %. 181
- Figura 26.** Representação gráfica da regressão linear e respetiva equação geral da reta obtidas mediante a aplicação do método de adição padrão. 186
- Figura 27.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos com a metodologia dmt-inif-MISPE (A), LLE – cartucho C_{18} (B) e metodologia QuEChERS (C). Nos cromatogramas são apresentadas as ampliações do pico correspondente ao dmt e os respetivos espectros UV-Vis (220 nm), bem como o espectro UV-Vis referente ao padrão dmt. 188
- Figura 28.** Capacidade de adsorção do tbz-tr-MIP e correspondente NIP. 197

Figura 29. Imagens obtidas por SEM do a) tbz-tr-MIP e b) correspondente NIP (voltagem 10 kV, resolução de 6,7 mm x 8,00 k SE).	199
Figura 30. Representação geral das estruturas químicas da terbutilazina e de compostos análogos pertencentes à classe das triazinas.	200
Figura 31. Representação esquemática das ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre o MAA e as moléculas de tbz nos locais de ligação formados durante a síntese do MIP.	202
Figura 32. Efeito da utilização de diferentes solventes durante a otimização da etapa de aplicação da amostra.	204
Figura 33. Estudo da influência da natureza do solvente utilizado na otimização da etapa de lavagem. A eluição foi efetuada utilizando 2 mL de metanol.	207
Figura 34. Cromatogramas de HPLC-DAD referentes aos extratos obtidos mediante a aplicação das metodologias de preparação de amostra tbz-tr-MIP e tbz-tr-NIP. Tempo de retenção da tbz: 45,8 min.	211
Figura 35. Cromatogramas de HPLC-DAD dos extratos obtidos com a metodologia tbz-tr-MISPE (A), LLE – cartucho C ₁₈ (B), metodologia QuEChERS (C) e cartucho comercial para a classe das triazinas (D). Nos cromatogramas são apresentadas as ampliações do pico correspondente à tbz e os respetivos espectros UV-Vis (220 nm), bem como o espectro UV-Vis referente ao padrão de tbz.	221
Figura 36. Representação esquemática das interações estabelecidas entre a AM e as moléculas de deltametrina nos ensaios de reconhecimento molecular, mediante a formação de ligações por pontes de hidrogénio nos locais de ligação existente no material polimérico.	227
Figura 37. Imagens obtidas por SEM do a) dn-tr-MIP-2 e b) correspondente NIP.	228
Figura 38. Estruturas químicas da deltametrina e dos diferentes compostos análogos pertencentes à classe dos piretróides, em estudo neste trabalho.	229
Figura 39. Efeito da natureza dos solventes utilizados durante a otimização da etapa de aplicação da amostra, na capacidade de ligação do dn-tr-MIP-2 à deltametrina.	232

- Figura 40.** Efeito da utilização de diferentes solventes na otimização da etapa de lavagem, através da análise da capacidade de ligação do dn-tr-MIP-2 à deltametrina. A eluição foi efetuada utilizando 2 mL de metanol. 235
- Figura 41.** Representação gráfica da regressão linear e respetiva equação geral da reta obtidas mediante a aplicação do método de adição padrão. 241
- Figura 42.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos com a metodologia dn-tr-MISPE (A), LLE – cartucho C₁₈ (B) e metodologia QuEChERS (C). Nos cromatogramas A e C são apresentadas as ampliações do pico correspondente à dn e os respetivos espectros UV-Vis (220 nm), bem como o espectro UV-Vis referente ao padrão dn. 245
- Figura A1.** Perfil cromatográfico de HPLC-DAD do extrato obtido com a metodologia dmt-inif-MISPE mediante a aplicação de 1 g do azeite biológico (sem adição de dmt) diluído com 10 mL de heptano. 259
- Figura A2.** Perfil cromatográfico de HPLC-DAD do extrato obtido com a metodologia tbz-tr-MISPE mediante a aplicação de 1 g do azeite biológico (sem adição de tbz) diluído com 10 mL de diclorometano. 259
- Figura A3.** Perfil cromatográfico de HPLC-DAD do extrato obtido com a metodologia dn-tr-MISPE mediante a aplicação de 1 g do azeite biológico (sem adição de dn) diluído com 5 mL de heptano. 260

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação toxicológica dos pesticidas adotada pela União Europeia (adaptado de Amaro, 2003).	14
Tabela 2. Características químicas, físicas e toxicológicas do dimetoato (WHO, 2015).	21
Tabela 3. Características químicas, físicas e toxicológicas da deltametrina (WHO, 2014).	27
Tabela 4. Características químicas, físicas e toxicológicas da terbutilazina (WHO, 1998).	31
Tabela 5. Classificação do azeite com base na análise sensorial e alguns parâmetros químicos da qualidade.	53
Tabela 6. Condições reacionais da polimerização envolvida na síntese dos diferentes sistemas de impressão molecular em estudo.	130
Tabela 7. Condições experimentais das várias etapas de extração em fase sólida utilizadas para avaliarem a capacidade de reconhecimento molecular dos diferentes MIPs/ NIPs em estudo.	141
Tabela 8. Condições experimentais das várias etapas envolvidas na validação das metodologias MISPE desenvolvidas para a posterior detecção e quantificação dos pesticidas alvo presentes na matriz azeite.	146
Tabela 9. Parâmetros analíticos das curvas de calibração de cada pesticida alvo.	152
Tabela 10. Fatores de impressão molecular (IF) referentes ao dmt-tr-MIP-1 em função das condições cromatográficas utilizadas.	158

Tabela 11. Coeficientes de determinação (R^2), parâmetros de ligação (m e a) e número aparente de locais de ligação ($N_{kmin-kmax}$) referentes às isotérmicas de Freundlich dos sistemas de impressão molecular dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e correspondentes NIPs.	167
Tabela 12. Taxas de recuperação, capacidade de adsorção e fator de seletividade referente a cada análogo estrutural do dimetoato, para os sistemas de impressão molecular dmt-inif-MIP e correspondente NIP.	173
Tabela 13. Precisão e exatidão da coluna dmt-inif-MISPE na extração de dmt a partir de amostras de azeite dopadas com diferentes concentrações deste pesticida.	182
Tabela 14. Taxas de recuperação, capacidade de adsorção e fator de seletividade referente a cada pesticida, relativamente ao tbz-tr-MIP e correspondente NIP.	201
Tabela 15. Precisão e exatidão da coluna tbz-tr-MISPE na extração de terbutilazina a partir de amostras de azeite dopadas com diferentes concentrações deste pesticida.	212
Tabela 16. Capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular dn-tr-MIP-1/ dn-tr-NIP-1 e dn-tr-MIP-2/ dn-tr-NIP-2 para a deltametrina.	226
Tabela 17. Taxas de recuperação, capacidade de adsorção e fatores de seletividade referentes a cada pesticida, relativamente ao dn-tr-MIP-2 e correspondente NIP.	230
Tabela 18. Precisão e exatidão da coluna dn-tr-MISPE na extração de dn a partir de amostras de azeite dopadas com diferentes concentrações deste pesticida.	238
Tabela 19. Reprodutibilidade e capacidade de reutilização das colunas dn-tr-MISPE.	239

Abreviaturas*

A	Agente de ligação cruzada.
<i>a</i>	Coefficiente de adsorção de Freundlich.
a.C.	Antes de Cristo.
ACH	Enzima acetilcolinesterase.
ADI	Ingestão diária admissível (Acceptable Daily Intake).
ADN	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid).
AIBN	2,2-azo-bis-iso-butironitrilo.
AM	Acrilamida.
ASE	Extração acelerada por solvente (Accelerated Solvent Extraction).
ATP	Adenosina trifosfato.
ATRP	Técnica de polimerização radicalar por transferência atômica (Metal-Catalyzed Atom Transfer Radical Polymerization).
B	Concentração de dimetoato ligado no polímero.
BET	Análise da área superficial específica (Brunauer, Emmett e Teller).
CAS RN	Número de registo CAS (Chemical Abstracts Service Registry Number).
CE	Comunidade Europeia.
CEE	Comunidade Económica Europeia.
C_i	Concentração inicial.
C_L	Concentração de analito livre em solução.
CLRP	Técnica de polimerização radicalar controlada (Controlled Living Radical Polymerization).
C_{max}	Concentração máxima de analito livre em solução.
C_{min}	Concentração mínima de analito livre em solução.
COI	Conselho Oleícola Internacional.
C_R	Concentração de analito retido no MIP/ NIP.
DAD	Detetor de fotodiodos (Diode Array Detector).
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis (<i>p</i> -clorofenil) etano.
DI	Diâmetro Interno da coluna.
DL ₅₀	Dose Letal do pesticida em 50 % dos animais estudados.
DMF	Dimetilformamida.
dmt	Dimetoato.

dn	Deltametrina.
DOP	Denominação de Origem Protegida.
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (European Food Safety Authority).
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato.
EUA	Estados Unidos da América.
FAO	Organização das Nações Unidas para a alimentação (Food and Agriculture Organization).
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).
GABA	Neurotransmissor do ácido γ -aminobutírico.
GC	Cromatografia em fase gasosa.
GCB	Carvão ativo grafitizado (Graphitized Carbon Black).
GPC	Cromatografia de permeação em gel (Gas Permeation Chromatography).
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (High-Density Lipoprotein).
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography).
I	Iniciador radicalar.
IA	Ácido itacónico (itaconic acid).
IF	Fator de impressão molecular (Imprinting Factor).
INE	Instituto Nacional de Estatística.
Inif	Agente iniferter.
ISEC	Cromatografia inversa por exclusão de tamanho (Inverse Size Exclusion Chromatography).
JMPR	Comité de especialistas sobre resíduos de pesticidas.
K	Constante de dissociação.
k	Fator de retenção.
K_0	Afinidade média dos locais de ligação
K_{232}	Coeficiente de extinção específica no ultravioleta a 232 nm.
K_{270}	Coeficiente de extinção específica no ultravioleta a 270 nm.
LC	Cromatografia líquida (Liquid Chromatography).
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (Low-Density Lipoprotein).
LLE	Extração líquido-líquido (Liquid Liquid Extraction).
LMR	Limite Máximo de Resíduos.
LOD	Limite máximo de detecção.

LOQ	Limite máximo de quantificação.
M	Monómero funcional.
m	Massa.
<i>m</i>	Constante de Freundlich.
MAA	Ácido metacrílico (Methacrylic Acid).
MAE	Extração assistida por micro-ondas (Microwave Assisted Extraction).
MBAA	N, N'-metileno bisacrilamida.
MF	Modelo de Freundlich.
MIP	Polímero Molecularmente Impresso (Molecularly Imprinted Polymer).
MISPE	Polímeros molecularmente impressos como adsorventes da extração em fase sólida.
MS	Espectrometria de massa (Mass Spectrometry).
MSPD	Dispersão de matriz em fase sólida (Matrix Solid Phase Dispersion).
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados (Monounsaturated Fatty Acid).
NIP	Polímeros não molecularmente impressos (Non Imprinted Polymer).
NISPE	Polímeros não molecularmente impressos como adsorventes da extração em fase sólida.
$N_{kmin-kmax}$	Número aparente de locais de ligação.
NMP	Técnica de polimerização mediada por azoto (Nitroxide-Mediated Polymerization).
NT	Medida da capacidade dos sistemas de impressão molecular.
OMS	Organização Mundial de Saúde.
OPP	Organofosforados (Organophosphorus).
pH	Potencial hidrogeniônico.
PLE	Extração com líquido pressurizado (Pressurized Liquid Extraction).
PSA	Amina primária-secundária (Primary Secondary Amine).
Q	Quantidade de analito retido no MIP/ NIP por massa de polímero.
Q_{max}	Quantidade máxima de analito retido no MIP/ NIP por massa de polímero.
Q_{min}	Quantidade mínima de analito retido no MIP/ NIP por massa de polímero.
QuEChERS	Método de extração denominado de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).
RAFT	Técnica de polimerização de transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization).

R^2	Coefficiente de determinação.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear.
S	Fator de seletividade específica.
SA	Substância Ativa.
SAM	Método da Adição de Padrão (Standard Addition Method).
SBSE	Extração sorptiva com barras de agitação (Stir Bar Sorptive Extraction).
SD	Desvio padrão residual da reta.
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (Scanning Electron Microscopy).
SFE	Extração com líquido supercrítico (Supercritical Fluid Extraction).
SPE	Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction).
SPME	Microextração em fase sólida (Solid Phase Microextraction).
T	Molécula molde (Template).
tbz	Terbutilazina.
TED	Dissulfureto de tetraetiltiocarbamoílo.
TEGDMA	Tetraetilenoglicol dimetacrilato.
TEM	Microscopia electrónica de transmissão (Transmission Electron Microscopy).
TFMAA	2-(trifluorometil) ácido acrílico (2- (trifluoromethyl) acrylic acid).
TGA	Análise termogravimétrica (Thermogravimetric Analysis).
tr	Tempo de retenção.
t_0	Tempo de retenção do solvente usado como marcador do volume morto.
UE	União Europeia.
UV	Ultravioleta.
V	Volume.
α	Fator de seletividade.
ΔK	Coefficiente de extinção específica.
\emptyset	Razão entre o volume da fase estacionária e o volume da fase móvel.

*Na maioria das abreviaturas usadas, manteve-se a designação anglo-saxónica dado o seu carácter universal; nesses casos a designação é apresentada entre parênesis.

Designações Anglo-Saxónicas

<i>Bleeding</i>	Termo usado para designar o fenómeno de sangramento de uma coluna cromatográfica.
<i>Bulk</i>	Termo usado para designar o tipo de polimerização via bulk.
<i>Controlled “living” radical polymerization</i>	Técnica de polimerização radicalar controlada.
<i>Iniferter</i>	Técnica de polimerização.
<i>In situ</i>	Técnica de polimerização.
<i>Of-line</i>	Sistema que contempla o empacotamento dos MIPs em cartuchos de SPE.
<i>On-line</i>	Sistema que contempla o empacotamento dos MIPs em colunas/ pré-colunas de HPLC.
<i>Salting-out</i>	Processo pelo qual as substâncias solúveis em água passam da fase aquosa para a fase orgânica pela adição de sais.
<i>Swelling</i>	Fenómeno de aumento de volume do MIP/ NIP.
<i>Tailing</i>	Fenómeno de arrastamento do pico cromatográfico.
<i>Tailor-made</i>	Feitos à medida.
<i>Vials</i>	Frascos de vidro de 1,5 mL.

1.Introdução Geral

O termo "Segurança Alimentar" começou a ser utilizado após o fim da Primeira Guerra Mundial, influenciado pela traumática experiência da guerra, vivida sobretudo na Europa. Deste modo, tornou-se claro que um país poderia dominar o outro controlando o seu fornecimento de alimentos. A alimentação seria, assim, uma poderosa arma, principalmente se aplicada por uma potência num país que não tivesse a capacidade de produzir os seus próprios alimentos de forma autossuficiente (Maluf e Menezes, 2000).

Com a evolução do homem, da sua alimentação e com o desenvolvimento da ciência, também o conceito de segurança alimentar foi evoluindo. Numa visão mais primitiva a “segurança alimentar” estava associada a um conhecimento empírico de forma a garantir a sobrevivência humana. Numa perspetiva mais recente, a segurança alimentar é um requisito fundamental dos consumidores, constituindo por isso, cada vez mais, uma prioridade para todos os intervenientes do sector agrícola, ao longo de toda a cadeia de abastecimento, isto é, desde o produtor até ao consumidor. Deste modo, a garantia de segurança alimentar permite transmitir confiança ao consumidor de que está a consumir um produto seguro.

A produção agrícola, principalmente à escala comercial, esteve sempre associada ao uso de pesticidas com a finalidade de evitar e combater pragas que geram enormes perdas na colheita. Os principais produtos fitofarmacêuticos usados comercialmente são fundamentalmente compostos orgânicos sintéticos com alta atividade biológica, que em geral são tóxicos, podendo ser cancerígenos e causadores de mutações (Wagner *et al.*, 2005; Nollet e Rathore, 2010), pelo que o seu uso tem de ser forçosamente regulamentado de forma a evitar a contaminação dos alimentos, o que pode ter efeitos nefastos na saúde dos consumidores.

Em concreto, a indústria do azeite tem vindo a assumir uma importância socioeconómica crescente fundamentalmente nos países mediterrânicos, sendo nesta região que se localizam os principais produtores. As propriedades benéficas para a saúde associadas ao seu consumo, tornou-o progressivamente um produto de consumo básico e componente essencial da dieta saudável devido aos elevados valores

nutricionais, compostos antioxidantes e alto teor de ácidos gordos monoinsaturados (García-González *et al.*, 2008). Nos últimos anos, o seu consumo tem-se estendido a países que não são produtores, em grande medida devido à consciencialização dos consumidores para as qualidades nutricionais e organoléticas deste produto natural.

Indubitavelmente, a “segurança alimentar” do azeite, em termos de assegurar que é um alimento isento de produtos fitofarmacêuticos, é um aspecto extremamente importante pelo que a garantia deste parâmetro é crucial. Assim torna-se imperativo controlar a presença de quaisquer substâncias residuais, resultantes dos tratamentos fitossanitários, utilizados para combater as diversas doenças, pragas e infestantes que atacam os olivais. Se eventualmente estas substâncias persistirem até à fase de colheita da azeitona e, atendendo a que o azeite é obtido a partir deste fruto por processos meramente físicos e/ ou mecânicos, estes contaminantes podem ser transferidos para o azeite, constituindo um sério risco para a saúde dos consumidores.

Nos últimos anos, a olivicultura tem sofrido grandes modificações, tendo-se assistido a uma intensificação da produção, sobretudo devido à conversão dos olivais tradicionais em sistemas de produção intensivo e super-intensivo, o que pressupõem uma maior utilização de pesticidas. Por outro lado, dado que os limites de pesticidas em produtos alimentares estipulados por lei (Regulamento (CE) n.º 396/2005) serão previsivelmente cada vez mais baixos, reveste-se de particular importância o desenvolvimento de metodologias analíticas fiáveis, precisas e com sensibilidade adequada à deteção e quantificação dos resíduos de produtos fitossanitários. No caso concreto do azeite, o desenvolvimento de metodologias adequadas para a deteção dos pesticidas representa um grande desafio analítico devido à inerente complexidade desta matriz alimentar. O elevado teor em compostos lipídicos, aliado ao facto, dos pesticidas apresentarem um carácter lipofílico, o que os torna solúveis neste tipo de matriz, dificulta o isolamento/ pré-concentração do analito alvo, podendo inviabilizar a sua deteção e quantificação com elevado rigor e precisão.

Neste contexto surge o presente trabalho, que tem como objetivo desenvolver uma nova metodologia analítica com capacidade para detetar e quantificar, de forma seletiva e específica, os resíduos de pesticidas no azeite, a qual englobará a implementação de uma etapa prévia de extração em fase sólida, de modo a isolar e/ ou pré-concentrar os analitos alvo, seguida da otimização de um método cromatográfico,

utilizando técnicas cromatográficas adequadas, para a sua deteção e quantificação. Com essa finalidade, será avaliada a utilidade de uma técnica extrativa baseada em Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs), a qual integrará a metodologia analítica a implementar no decurso deste trabalho. Estes materiais poliméricos são sintetizados de forma a apresentarem elevada afinidade e capacidade de reconhecimento molecular para os pesticidas alvo conferindo a esta abordagem um carácter bastante inovador e promissor. Atendendo à sua significativa aplicação no olival, neste trabalho serão selecionados como pesticidas alvo o dimetoato (dmt), a terbutilazina (tbz) e a deltametrina (dn). Mais concretamente, os MIPs seletivos para os pesticidas referidos anteriormente serão usados como adsorventes na otimização de técnicas de preparação de amostra baseadas em extração em fase sólida (SPE), vulgarmente denominada por MISPE (MIP-SPE), para a extração de cada um dos analitos em estudo, seguida da posterior análise cromatográfica, para a sua identificação e quantificação, recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A metodologia analítica implementada neste trabalho será aplicada na deteção da eventual presença de pesticidas em azeites comerciais de diferentes regiões (Alentejo, Beiras e Trás-os-Montes).

2.Revisão Bibliográfica

I.Pesticidas

1.1.Introdução	5
1.2.Resenha Histórica	6
1.3.Definição de Pesticidas	7
1.4.Composição dos Pesticidas	8
1.5.Legislação e Noções Básicas Referentes ao Uso de Pesticidas	8
1.6.Classificação dos Pesticidas	11
1.6.1.Grau de Toxicidade	12
1.6.2.Organismos Alvo	14
1.6.3.Via de Penetração	15
1.6.4.Modos de Ação	17
1.6.5.Classe Química	18
1.6.5.1.Organofosforados	18
1.6.5.1.1.Dimetoato	20
1.6.5.2.Piretróides	22
1.6.5.2.1.Deltametrina	25
1.6.5.3.Triazinas	28
1.6.5.3.1.Terbutilazina	30
1.7.Vantagens e Desvantagens Associadas ao Uso de Pesticidas	32
1.8.Principais Pesticidas Utilizados no Olival	35
1.9.Referências Bibliográficas	37

1.1.Introdução

Ao longo de toda a evolução humana, o homem desenvolveu uma grande aptidão para criar e transformar instrumentos e produtos, por forma a garantir a sua própria sobrevivência e subsistência. Desde cedo que se tem assistido a um enorme desenvolvimento das indústrias, do comércio, da ciência, e em paralelo ao crescimento da população. Como consequência deste desmesurado crescimento observou-se um enorme desenvolvimento, intensificação e modernização de toda a atividade agrícola (Cox *et al.*, 1979).

A utilização de pesticidas é um aspeto essencial para o desenvolvimento da agricultura, de forma a suprimir as necessidades alimentares de uma população em constante crescimento, e proporcionar enormes lucros económicos, aos países desenvolvidos e fundamentalmente aos que se encontram em desenvolvimento. No entanto, para além de todos os benefícios associados à utilização dos pesticidas na vertente agrícola, existem sérios problemas decorrentes do seu uso constante e sem critérios técnicos adequados, ou mesmo desnecessário, sendo de destacar o desenvolvimento de resistência por parte das pragas (Costa e Rei, 2014), o desenvolvimento de novas pragas, a morte de organismos benéficos para a cultura (Arenas *et al.*, 2006), bem como a persistência e a mobilidade dos pesticidas no meio ambiente (Ramos *et al.*, 2004), provocando profundos desequilíbrios no ecossistema e enormes riscos para a saúde humana (Vigna *et al.*, 2006).

Atualmente, o conhecimento dos diversos efeitos prejudiciais para a saúde humana, associado à utilização negligente de pesticidas, levou à implementação de uma regulamentação mais restritiva. Assim, com a evolução do conhecimento e o acesso à informação, as preocupações chegaram à esfera do consumo alimentar fomentando uma forte consciência do perigo que pode representar a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos (Popp *et al.*, 2013).

Neste capítulo são apresentados, de uma forma geral, alguns aspetos acerca dos pesticidas e da sua utilização no meio agrícola, dando especial ênfase às classes de pesticidas que são usadas com maior frequência na cultura do olival, e em particular aos pesticidas que serão alvo do presente estudo.

1.2. Resenha Histórica

A utilização de substâncias químicas, que hoje denominamos de pesticidas, remonta desde a antiguidade sendo o seu uso no controle de pragas indesejadas tão antigo quanto a própria agricultura (Casida e Quistad, 1998).

Há cerca de três mil anos atrás, as civilizações gregas, romanas e chinesas já conheciam a capacidade do sal comum (NaCl) para eliminar ervas daninhas, bem como do pó de enxofre para controlar os insetos que destruíam as suas culturas. Mais tarde foram ainda usados com os mesmos fins uma enorme variedade de materiais, nomeadamente, a água com sabão, a cal, o vinagre, o extrato de pimenta e o tabaco (Casida e Quistad, 1998).

O acetoarsenito de cobre mais conhecido como “Verde de Paris” foi o primeiro grande marco na história dos pesticidas sintéticos, tendo sido introduzido em 1867 no combate de pragas que atacavam as culturas, mais concretamente para combater o escaravelho-da-batateira nos Estados Unidos. No entanto, devido à sua extrema toxicidade para os mamíferos, o uso deste composto acabou por ser proibido para fins agrícolas (Aliferis e Jabaji, 2011).

Até ao início da Segunda Guerra Mundial o uso de inseticidas estava limitado à utilização de compostos inorgânicos, tais como o mercúrio, o arsénico e o cianeto, assim como de alguns produtos orgânicos de origem natural, nomeadamente a rotenona, as piretrinas e a nicotina (Nollet e Rathotore, 2010; Casida e Quistad, 1998).

O uso de pesticidas sintéticos para o controle de pragas, iniciou-se a partir do ano de 1939, quando o químico Paul Muller descobriu as propriedades inseticidas do DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis (*p*-clorofenil) etano), sintetizado pela primeira vez em 1874 pelo químico alemão Zeidler (Mellanby, 1992). Posteriormente, as indústrias químicas produziram uma vasta gama de substâncias ativas utilizadas principalmente como inseticidas, sendo na sua maioria pesticidas organoclorados. Contudo, devido à elevada persistência e ação residual destes compostos, houve a necessidade de se desenvolverem produtos menos persistentes, tendo assim sido sintetizados novos compostos pertencentes às classes dos organofosforados e dos carbamatos (Casida e Quistad, 1998).

Nos países industrializados, a Revolução Verde que ocorreu na década de 1960 aumentou significativamente a produtividade agrícola devido ao aumento das superfícies cultivadas, desenvolvimento da mecanização, plantação de culturas híbridas com rendimentos mais elevados e conseqüentemente ao controle das diversas pragas que atacavam as culturas através da utilização intensiva e descontrolada de pesticidas (Mnif *et al.*, 2011).

Como resposta à crescente intensificação da aplicação de pesticidas a que se assistia no momento, surgiu o livro de Rachel Carson, intitulado de "Silent Spring" (Carson, 1962), o qual chamou a atenção para o perigo do uso extensivo e generalizado de pesticidas para o meio ambiente, bem como para a saúde humana. Após a sua publicação assistiram-se a grandes modificações na política nacional dos EUA sobre a utilização de pesticidas, promovendo a proibição nacional de DDT bem como, de outros pesticidas (Mnif *et al.*, 2011).

A partir dos anos 80 têm-se realizado inúmeros esforços com o objetivo de maximizar os benefícios da utilização dos pesticidas na vertente agrícola e minimizar os riscos inerentes ao seu uso, ao nível da saúde pública, da agricultura e do meio ambiente por forma a conduzir a uma utilização racional e segura deste tipo de produtos.

Atualmente, o desafio consiste em desenvolver pesticidas cada vez mais seletivos e menos nocivos para o meio ambiente e para a saúde humana. Recentemente, têm-se realizado alguns esforços na tentativa de substituição dos pesticidas por agentes biológicos que possibilitem o controlo das pragas, ou ainda através do melhoramento genético das plantas. Contudo, apesar de todos os esforços que têm sido levados a cabo nesse sentido, assiste-se ainda nos nossos dias a um uso intensivo, desregrado e sem critérios técnicos da utilização dos pesticidas.

1.3. Definição de Pesticidas

O termo pesticida é definido pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura e pela Organização Mundial de Saúde (FAO/ OMS) como sendo qualquer substância ou mistura de substâncias (químicas, naturais ou de síntese) utilizadas na prevenção, bem como no controlo ou destruição de qualquer praga, infestantes, doenças ou animais indesejáveis que interfiram com a produção, transporte,

armazenamento, distribuição e transformação de géneros alimentícios, produtos agrícolas, madeira ou alimentos para animais. A definição exclui fertilizantes, aditivos ou drogas veterinárias (FAO, 1997). As denominações de produto fitofarmacêutico, agroquímico, produto fitossanitário e produto para proteção das plantas são também vulgarmente utilizadas para denominar os pesticidas.

Apesar do termo “praga” se encontrar essencialmente relacionado com qualquer grupo de insetos, ácaros, lesmas, caracóis e roedores que atacam as culturas podendo até comprometer a sobrevivência da planta, neste trabalho, com o intuito de simplificação esse conceito será mais abrangente, englobando ainda as plantas daninhas que competem diretamente com as culturas relativamente aos nutrientes e água disponíveis no solo, e ainda a alguns agentes que causam doenças nas plantas, tais como os fungos, os nemátodes, os vírus e as bactérias.

1.4.Composição dos Pesticidas

De um modo geral, os pesticidas são constituídos por uma ou mais substâncias ativas (SA) que são responsáveis pelo seu comportamento biológico, e ainda por um conjunto variável de outras substâncias vulgarmente denominadas de adjuvantes, que não possuem atividade biológica mas que conferem características e propriedades adequadas (estabilidade e aplicabilidade) ao produto formulado (Simões, 2005).

O termo formulação é geralmente utilizado para designar o processo de fabrico de um pesticida mas também, mais vulgarmente, para referir o modo como este se apresenta fisicamente. Deste modo podem destacar-se diferentes formulações, tais como sólidas (grânulos, pó molhável, pó polvilhável e pó solúvel), líquidas (concentrado para emulsão, emulsão água em óleo, emulsão óleo em água, solução concentrada e suspensão concentrada), entre outras (microgrânulos, pasta, pastilhas e gel para emulsão) (Amaro, 2003; Simões, 2005).

1.5.Legislação e Noções Básicas Referentes ao Uso de Pesticidas

A Comunidade Económica Europeia (CEE) deu início à regulamentação sobre as substâncias perigosas em 27 de Junho de 1967, através da Diretiva 67/548/CEE e à regulamentação específica dos pesticidas em 29 de Julho de 1978, pela Diretiva

78/631/CEE. Apesar da especificidade que os pesticidas possuíam, esta Diretiva (art. 6.º) determinou a utilização de frases de risco e de segurança, assim como de outros dados toxicológicos adotados na legislação das substâncias perigosas (Amaro, 2007).

Mais tarde, com a publicação da Diretiva 91/414/CEE, a 15 de Julho de 1991, teve início a política de redução dos riscos dos pesticidas agrícolas da União Europeia (UE), que tinha como principais objetivos a harmonização da homologação dos pesticidas agrícolas dos países membros, a reavaliação dos pesticidas então existentes na CEE, a ponderação dos riscos para a saúde humana e animal, para a água e para o meio ambiente, que deveria ser prioritária em relação à melhoria da produção, o recurso à análise do risco, bem como o fomento da proteção integrada. Assim, a implementação desta política teve um enorme contributo para o conhecimento das características toxicológicas e ecotoxicológicas dos pesticidas agrícolas e para a retirada do mercado de alguns dos pesticidas mais perigosos (Amaro, 2010).

Em Portugal, a homologação obrigatória dos pesticidas agrícolas foi imposta a 19 de Julho de 1967 pelo Decreto-Lei 47 802. Posteriormente, esta legislação evoluiu com rigor e eficiência nos primeiros 20 anos, contribuindo de forma decisiva para o progresso das atividades de investigação e extensão dos organismos centrais e regionais do Ministério da Agricultura, na área da proteção das plantas, bem como das empresas de pesticidas. Por sua vez com a publicação do Decreto-Lei 94/98 foi dado início em Portugal à adoção da política de redução dos riscos dos pesticidas agrícolas da UE (Amaro, 2007).

Nos últimos anos tem-se assistido a uma preocupação crescente relativamente à presença de resíduos de pesticidas nos alimentos. Deste modo, com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores, a Comunidade Europeia estabeleceu uma série de atos legislativos que regulam a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos (Amaro, 2007). Com particular destaque, o Regulamento (CE) n.º 396/2005 define o quadro legal para o estabelecimento de limites máximos de resíduos (LMR) de pesticidas no interior ou à superfície dos géneros alimentícios, que se encontram listados no seu Anexo I (Regulamento (UE) n.º 212/2013). Os Anexos II, III e IV do Regulamento (CE) n.º 396/2005 foram publicados pelos Regulamentos (CE) n.º 149/2008 e n.º 839/2008, que por sua vez foram alterados com a publicação do Regulamento (UE) n.º 750/2010. Mais precisamente nos anexos II e III constam os

limites máximos de resíduos harmonizados a nível da Comunidade Europeia e no anexo IV está disponível a lista de substâncias ativas para as quais não é necessário estabelecer LMR. As alterações a qualquer um destes Anexos são publicadas a nível comunitário através dos respetivos regulamentos. Para os pesticidas que não se encontrem explicitamente mencionados em nenhum dos anexos é fixado um LMR padrão de $0,01 \text{ mgkg}^{-1}$. Por outro lado, para os pesticidas não autorizados para uma determinada cultura o LMR é igual ao limite de quantificação da respetiva substância ativa. No que diz respeito aos produtos alimentares transformados, os seus limites máximos de resíduos são iguais aos estabelecidos na legislação para os produtos dos quais derivam. Por fim, no caso particular das fórmulas para lactentes e de transição, bem como os alimentos destinados a lactentes, bebés e crianças, aplica-se um LMR padrão de $0,01 \text{ mgkg}^{-1}$, exceto se existir um LMR específico mais baixo (EFSA, 2009).

A avaliação do risco resultante da ingestão de produtos alimentares contaminados com pesticidas para os consumidores é efetuada pela European Food Safety Authority (EFSA), a qual antecede o estabelecimento comunitário dos LMR (EFSA, 2014). Decorrida essa avaliação, os LMRs para diversos tipos de alimentos são determinados pelo *Codex Alimentarius*, estabelecidos pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ou pelo Ministério da Agricultura ou Saúde de cada país (Cunha, 2007).

De um modo geral, os LMRs representam a concentração máxima de um resíduo de pesticida legalmente permitida nos produtos alimentares, sendo definidos para cada binómio produto agrícola/ substância ativa e fixados de acordo com a dose de ingestão diária admissível (ADI), a qual corresponde à quantidade de pesticida que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem apresentar efeitos adversos significativos para o consumidor (Tadeo, 2008). É ainda de referir que a definição destes limites baseia-se em dados experimentais obtidos através da utilização de boas práticas agrícolas, nomeadamente o respeito pelas doses aplicadas, o intervalo de segurança, a frequência e o intervalo entre aplicações. Assim, uma vez estabelecidos estes parâmetros deverão ser criteriosamente respeitados pelos agentes económicos envolvidos no processo de produção e comercialização dos produtos agrícolas (Brussel, 2008), devendo cumprir rigorosamente os intervalos de segurança, definidos em função dos LMR, indicados para cada pesticida.

Os LMRs estabelecidos legalmente diferem de país para país o que se deve ao facto da existência de práticas agrícolas diferenciadas. No entanto, a maioria dos países mundiais segue os padrões internacionais da Comissão do *Codex Alimentarius* ou somente designado como Codex da FAO/ OMS. Em Portugal, os LMRs existentes são estabelecidos por lei e publicados em Diário da República com base na legislação da UE (Cunha, 2007).

1.6. Classificação dos Pesticidas

Durante as últimas décadas, a indústria agroquímica tem vindo a intensificar a sua investigação no desenvolvimento de pesticidas, proporcionando a disponibilização de uma vasta gama deste tipo de produtos ao sector agrícola. Apesar da dificuldade inerente à exaustiva compilação de todos os pesticidas disponíveis, resultante da enorme variedade existente, na figura 1 tentou-se de uma forma o mais abrangente possível esquematizar as diferentes classes de pesticidas.

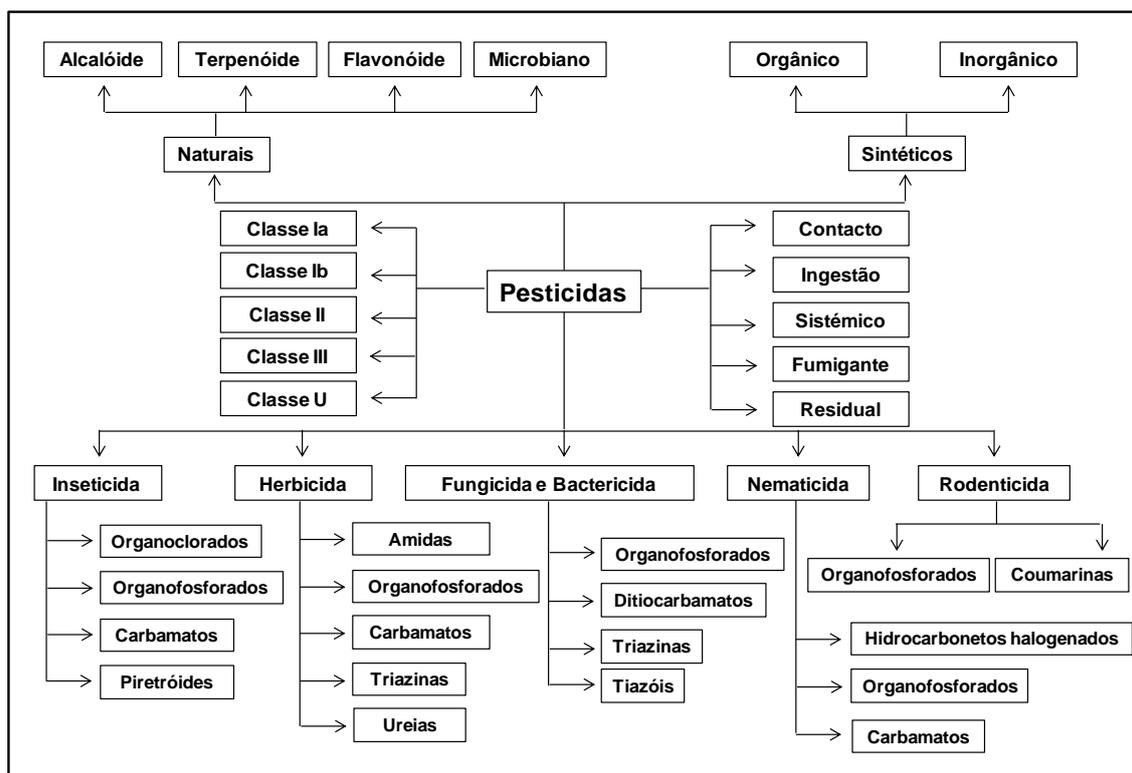


Figura 1. Representação esquemática das diferentes classes de pesticidas (Nollet e Rathore, 2010).

De um modo geral, os pesticidas podem ser classificados com base no seu grau de toxicidade, nos organismos alvo sob os quais atuam, via de penetração, modos de ação e ainda, de acordo com a sua classe química (Amaro, 2003). Para além dos critérios anteriormente enumerados, que serão abordados com maior detalhe nos tópicos seguintes, as substâncias ativas podem ainda ser classificadas de acordo com a sua origem ou natureza química, como naturais ou sintéticas. Por sua vez, os compostos sintéticos dividem-se em inorgânicos ou orgânicos. Nos pesticidas inorgânicos, a substância ativa tóxica é constituída por elementos de origem mineral (cobre, enxofre, alumínio, arsénio, ferro, cálcio, magnésio, mercúrio). Finalmente, os compostos orgânicos podem ser distinguidos em orgânicos de síntese, como por exemplo os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e triazinas e em orgânicos de origem vegetal, como a nicotina e a piretrina. De forma a tornar esta classificação mais informativa e abrangente, os pesticidas podem ainda ser agrupados atendendo a mais do que um dos critérios de classificação referidos anteriormente (Cox *et al.*, 1979; Nollet e Rathore, 2010).

1.6.1. Grau de Toxicidade

Os pesticidas, na sua essência, são considerados como substâncias tóxicas devido aos perigos que constituem para o ser humano. Geralmente, o risco tóxico está diretamente relacionado com o potencial tóxico da substância ativa, o seu grau de contaminação, o tempo de duração da exposição à mesma e a via de exposição (Simões, 2005).

De um modo geral, consoante a sua perigosidade, os pesticidas podem ser classificados em compostos muito tóxicos, tóxicos, nocivos, cancerígenos ou carcinogénicos, oncogénicos, teratogénicos, genotóxicos ou mutagénicos, que apresentam toxicidade para a reprodução e para o sistema endócrino, corrosivos, irritantes e sensibilizantes (Amaro, 2003). Embora raramente, alguns pesticidas podem ainda ser classificados como explosivos, extremamente inflamáveis, altamente inflamáveis e inflamáveis. A informação global da perigosidade, sob a forma de frases e símbolos adequados, tem que constar obrigatoriamente nos rótulos (Tomlin, 2000).

A toxicidade de um pesticida para o Homem depende da sua capacidade para interferir com os sistemas vitais do organismo humano, a qual é dependente da via de

exposição à substância ativa responsável pela ação tóxica. Assim, a via de exposição pode ser através da boca (oral), da pele e dos olhos (cutânea) e das vias respiratórias (inalação) (Amaro, 2003).

Por sua vez, atendendo à duração da exposição, a toxicidade de um determinado pesticida pode ser aguda, quando o indivíduo é exposto à substância ativa durante um período de tempo muito curto, geralmente 24 horas, subcrónica quando a exposição se estende a um período de tempo mais longo (por exemplo 1 a 3 meses) e crónica quando a exposição é repetida diariamente durante longos períodos de tempo (Amaro, 2003).

As classificações toxicológicas atualmente disponíveis fornecem sobretudo informações sobre a toxicidade aguda dos pesticidas (em função da sua substância ativa), sendo extremamente importantes para os operadores que manipulam estes produtos químicos, uma vez que são os mais expostos a uma possível intoxicação aguda (WHO, 2009). Esta classificação tem por base os resultados de ensaios laboratoriais que tentam estabelecer a dosagem letal do pesticida em 50 % dos animais testados (DL_{50}), de acordo com a via de administração. Para além da DL_{50} , a toxicidade aguda pode ainda ser expressa através da dose de ingestão diária admissível, que corresponde à dose que administrada uma única vez num dia, ou distribuída por várias doses ao longo de 24 horas, não provoca qualquer efeito adverso nos animais (WHO, 2009).

A classificação dos pesticidas nas diferentes classes de toxicidade aguda varia consoante as instituições e os países (por exemplo OMS, EPA nos EUA e União Europeia) e está sujeita a atualizações periódicas.

De acordo com a OMS, tendo em conta o seu grau de toxicidade aguda, os pesticidas podem ser divididos em cinco classes: a **classe Ia** que corresponde a um produto considerado extremamente tóxico para o ser humano; a **classe Ib** que representa um produto considerado altamente tóxico para o ser humano; a **classe II** que indica que o produto é considerado medianamente tóxico para o ser humano; a **classe III** que corresponde a um produto pouco tóxico para o ser humano e a classe **U** quando o produto aparentemente não deve apresentar perigo agudo para o ser humano (WHO, 2009).

Em Portugal utiliza-se a classificação toxicológica dos pesticidas adotada pela União Europeia, a qual é variável de acordo com a via de exposição (oral, cutânea, inalação) e a natureza sólida, líquida ou gasosa das respetivas substâncias ativas. Assim, em função do grau de toxicidade aguda, os pesticidas agrupam-se em quatro classes toxicológicas: muito tóxico, tóxico, nocivo e isento (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação toxicológica dos pesticidas adotada pela União Europeia (adaptado de Amaro, 2003).

Tipo de Pesticida	Classe toxicológica	Oral DL₅₀ (mgkg⁻¹) (rato)	Cutânea DL₅₀ (mgkg⁻¹) (coelho ou rato)	Inalação DL₅₀ (mgL⁻¹) (4 h) (rato)
Pesticida Sólido	Muito Tóxico	≤ 5	≤ 10	
	Tóxico	5-50	10-100	
	Nocivo	> 50-500	>100-1000	
	Isento	≥ 501	≥ 1001	
Pesticida Líquido	Muito Tóxico	≤ 25	≤ 50	
	Tóxico	25-200	50-400	
	Nocivo	> 200-2000	> 400-4000	
	Isento	≥ 2001	≥ 4001	
Pesticida Gasoso	Muito Tóxico			≤ 0,5
	Tóxico			0,5-2
	Nocivo			> 2-20
	Isento			≥ 21

1.6.2. Organismos Alvo

Os pesticidas podem também ser agrupados de acordo com a natureza do organismo a combater, podendo ser classificados de um modo geral em inseticidas, herbicidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, rodenticidas, acaricidas e moluscicidas (Amaro, 2003).

Os inseticidas são usados para o controlo de insetos e outros artrópodes, podendo ser aplicados no solo para matar as diversas pragas que nele habitam ou na parte aérea da planta. O uso desta classe de pesticidas é considerado de grande relevância para o aumento da produtividade agrícola, pois os insetos são responsáveis por perdas bastante significativas nas diversas culturas (Cox *et al.*, 1979).

Os herbicidas são utilizados para controlar e eliminar as plantas que crescem de forma espontânea em lugares onde não são desejadas. A sua aplicação é geralmente realizada no solo ou diretamente nas folhas das plantas e são normalmente absorvidos pelas raízes ou pelos tecidos foliares das mesmas. Por sua vez, os herbicidas podem ser totais quando destroem toda a vegetação ou seletivos quando controlam as plantas infestantes sem afetar a colheita. Estas substâncias químicas podem ainda ser aplicadas nas diferentes fases das culturas (em pré-sementeira ou pré- ou pós-emergência), de acordo com o tipo de planta que se pretende controlar (Tadeo, 2008).

Os fungicidas são usados para o controlo de fungos que atacam as culturas, podendo ser aplicados na pré- ou pós-colheita, no entanto a sua aplicação é realizada na maior parte das vezes durante a fase de pré-colheita, uma vez que as infeções por fungos nesta fase podem ser responsáveis por enormes perdas na produção (Ecobichon, 2001).

Esta classificação abrange também os bactericidas que são usados no controlo de bactérias que atacam as culturas, os nematocidas utilizados no controlo de nemátodes, os rodenticidas usados para controlar ratos e outros tipos de roedores, os acaricidas usados no controlo de ácaros e ainda os moluscicidas que são pesticidas usados no combate de pragas de moluscos, tais como os caracóis e as lesmas (Nollet *et al.*, 2010).

Adicionalmente, para além da designação mais geral, apresentada anteriormente, poderão ainda ser utilizadas classificações para grupos mais restritos de organismos, tais como os algicidas e os arbusticidas que são herbicidas usados no controlo de algas e arbustos, bem como os aficidas, formicidas, larvicidas e ovicida que são inseticidas usados no combate de afídeos, formigas, larvas e ovos de insetos, respetivamente (Amaro, 2003).

1.6.3. Via de Penetração

Uma das classificações pela qual os pesticidas podem ser agrupados está relacionada com o modo como penetram nos organismos alvo. Assim, com base nesta classificação, os pesticidas podem ser fundamentalmente denominados como pesticidas de contacto, ingestão, sistémicos, penetrantes, fumigantes e residuais (Simões, 2005).

Os pesticidas de contacto atingem diretamente o organismo alvo que se pretende controlar. No caso particular dos inseticidas, estes são aplicados na superfície do organismo a limitar penetrando através da cutícula e da traqueia, dos estigmas ou de zonas menos esclerotizadas do tegumento exercendo, posteriormente, o seu efeito tóxico. No caso dos herbicidas são aplicados sobre a superfície externa das plantas, afetando os tecidos em que contactam (Cox *et al.*, 1979).

Por sua vez, os pesticidas de ingestão atuam no interior dos organismos alvo, após serem adsorvidos durante a alimentação dos tecidos vegetais previamente tratados com o respetivo pesticida ou dos iscos.

Nos pesticidas de ação sistémica, após a penetração na planta através de múltiplas vias (raiz, folhas, caule e gemas), as SA são translocadas através do sistema vascular (floema e xilema), distribuem-se pelos tecidos e são neles armazenados, durante um período de tempo mais ou menos longo, onde exercem a sua ação fitotóxica, no caso dos herbicidas, ou tóxica nos insetos, quando estes se alimentam da seiva que contém quantidade suficiente de substância ativa, ou dos metabolitos resultantes da sua degradação, para uma ação tóxica (Amaro, 2003; Simões, 2005).

De acordo com a via de penetração, os pesticidas podem ainda ser classificados como penetrantes, os quais são sobretudo inseticidas e fungicidas. Em termos gerais, estes compostos atravessam a cutícula dos insetos ou a epiderme dos vegetais, contudo não são transportados nos vasos, uma vez que apenas têm capacidade, na fase de vapor, para atravessar algumas camadas de células, em torno do local de penetração (Amaro, 2003).

Os pesticidas classificados como fumigantes são utilizados essencialmente como inseticidas que penetram no corpo dos insetos através das aberturas do seu sistema respiratório.

Por fim, os pesticidas de ação residual persistem no solo ou na superfície das plantas, após a sua aplicação, sendo posteriormente absorvidos pela planta, ou penetrando no organismo dos insetos, quando estes entram em contacto com as respetivas substâncias ativas (Simões, 2005; Tadeo, 2008).

1.6.4. Modos de Ação

O modo de ação de um determinado pesticida consiste na natureza da interferência da sua SA ou dos metabolitos originados pela sua degradação, no alvo responsável por determinados processos fisiológicos ou bioquímicos do organismo que se pretende combater (Amaro, 2003).

De acordo com o seu mecanismo de ação, os inseticidas podem interferir na transmissão dos sinais do sistema nervoso, através da condução axonal no sistema nervoso central dos insetos, alterando a permeabilidade da membrana nervosa para as iões de sódio e potássio, ou através da interação com os poros da estrutura da lipoproteína do nervo do inseto, causando conseqüentemente a distorção e excitação da transmissão do impulso nervoso. Por sua vez, podem também atuar como inibidores da colinesterase (ACh), através da capacidade que possuem para fosforilar a enzima acetilcolinesterase, a qual é inibida de forma irreversível perdendo a capacidade de levar a cabo a sua função normal resultando na acumulação de ACh e, conseqüentemente, na perturbação do funcionamento normal do sistema nervoso (Tadeu, 2008). A nível do sistema nervoso, os inseticidas são ainda responsáveis pelo bloqueio do recetor colinérgico, atuam nos neurotransmissores octamina, glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) inibindo os respetivos recetores e, são fago-inibidores do sistema muscular, mediante o aumento do consumo de oxigénio na membrana dos músculos. Para além destes modos de ação, alguns inseticidas podem ainda originar a rutura da cutícula, atuar ao nível de hormonas que afetam o correto desenvolvimento do inseto, obstruem o estigma e a traqueia constituinte do sistema respiratório dos insetos e afetam a respiração na 3ª fase, ao inibirem a cadeia de transporte de eletrões na mitocôndria, ou na 4ª fase, onde ocorre a fosforilação oxidativa (Amaro, 2003).

Quanto ao modo de ação, os herbicidas podem ser fundamentalmente agrupados nas seguintes categorias: inibidores da síntese de aminoácidos, que ao atuarem sobre uma enzima específica, impedem a produção de certos aminoácidos, interferindo no crescimento e desenvolvimento normal das plantas; inibidores da divisão celular, que ao ligarem-se com a tubulina, uma proteína fundamental para a construção do citoesqueleto intracelular das células eucarióticas, interferem na sua divisão celular normal; atuam a nível da parede celular, inibindo a biossíntese de celulose e calose; afetam a respiração

na 4.^a fase através da perturbação da produção de ATP; existem ainda herbicidas que possuem diferentes mecanismos envolvidos na inibição da fotossíntese, tais como os geradores de radicais livres, os que interferem na transferência de elétrons, bem como os que inibem ou destroem os pigmentos protetores das plantas; e por fim alguns herbicidas podem ainda atuar na biossíntese de lípidos e ao nível dos cloroplastos, inibindo a síntese dos carotenóides (Amaro, 2003; Tadeo, 2008).

Do ponto de vista bioquímico, os fungicidas podem exercer a sua ação ao reagirem com os grupos sulfidrila das enzimas, afetando a estrutura e a função das membranas celulares, inibindo o sistema da enzima e conseqüentemente originando a formação de tumores nas mitocôndrias. Alguns fungicidas reagem com a tubulina inibindo assim a formação dos microtúbulos e, conseqüentemente, a divisão celular (Tadeo, 2008). Para além do conjunto de ações bioquímicas atrás enumeradas, os fungicidas podem ainda inibir a respiração, a mitose, a síntese proteica e a biossíntese de esteróis (ergosterol) e de giberelinas (Ecobichon, 2001).

1.6.5. Classe Química

De acordo com a sua estrutura química os pesticidas agrupam-se em classes de compostos cuja substância ativa é formada por estruturas moleculares semelhantes. Deste modo, cada um dos grupos de pesticidas referidos anteriormente pode ser classificado num conjunto de subgrupos. Assim, existem disponíveis comercialmente diversas classes de pesticidas, sendo de destacar os organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides, triazinas, amidas, compostos derivados das ureias, ditiocarbamatos, tiazoles e hidrocarbonetos halogenados. No entanto, tendo em conta o objetivo do presente trabalho, será dado particular ênfase às classes dos pesticidas que são aplicados com maior frequência no olival, tais como os organofosforados, os piretróides e as triazinas, que constituem os compostos alvo do presente estudo.

1.6.5.1. Organofosforados

Na agricultura são utilizados centenas de compostos organofosforados (OPP), sendo mesmo a classe de substâncias químicas mais amplamente utilizada, com uma enorme variedade de características físicas, químicas e propriedades biológicas (Wang *et al.*, 2008). Na sua maioria são inseticidas, embora haja também uma série de

compostos com ação herbicida, nematocida, fungicida e rodenticida. A sua utilização na agricultura aumentou drasticamente nos últimos anos devido ao facto dos compostos organoclorados terem sido retirados do mercado, em virtude da sua elevada persistência e poder residual (Kavvalakis e Tsatsakis, 2012).

Os pesticidas organofosforados, são compostos sintéticos normalmente ésteres, amidas, ou derivados tíois dos ácidos de fósforo (ácidos fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico, entre outros) (Tadeo, 2008) cuja fórmula estrutural geral está representada na figura 2.

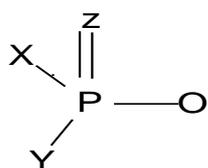


Figura 2. Representação da fórmula estrutural geral da classe dos organofosforados (X = O, S, N, ou C; Y = O, S, ou N; Z = O ou S) (Kavvalakis e Tsatsakis, 2012).

Dependendo dos diferentes elementos presentes na molécula (X,Y e Z), os quais conferem diferenças ao nível da natureza das ligações químicas existentes, os organofosforados podem ser ainda agrupados em várias subclasses, com diferentes propriedades químicas. Entre os mais importantes podem considerar-se os fosfatos, os fosfotionatos e os fosfoditionotiolatos (Luxton e Hart, 2005, citado por Cunha, 2007).

A maioria dos OPPs apresenta uma baixa solubilidade em água, degradam-se rapidamente por hidrólise, quando expostos à luz solar, ao ar e no solo, pertencendo assim à classe dos pesticidas não-persistentes, no entanto, possuem uma grande toxicidade aguda, o que representa sérios riscos para os indivíduos com elevada exposição a estes compostos (Tsatsakis *et al.*, 1996). A intoxicação por essas substâncias ativas pode ocorrer por inalação, ingestão ou pela absorção dérmica (WHO, 1986).

Os pesticidas pertencentes à classe dos organofosforados possuem um carácter lipossolúvel pelo que podem acumular-se nos tecidos gordurosos sendo potenciais contaminantes para diversos tipos de alimentos (Hoffmann e Papendorf, 2006).

A ação dos pesticidas pertencentes a esta classe é caracterizada pela inibição de várias enzimas do organismo, das quais se destaca a acetilcolinesterase que atua na

transmissão de impulsos nervosos em diversos órgãos e músculos, sendo que a sua inibição promove a libertação e posterior acumulação de acetilcolina nas sinapses nervosas desencadeando vários efeitos parassipaticomimético (Fussel *et al.*, 2004).

Alguns OPPs podem ainda atuar através da inibição das enzimas de esterase neurotóxica, tendo como efeito a paralisia irreversível dos músculos por ação neurotóxica retardada (Fussel *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, muitos estudos indicaram que os OPPs são mutagénicos, cancerígenos, citotóxicos, genotóxicos, teratogénicos e imunotóxicos (Sharma *et al.*, 2010). Alguns dos pesticidas deste grupo são também conhecidos por interferir na função do sistema reprodutivo, especialmente nos indivíduos do sexo masculino (Kavvalakis e Tsatsakis, 2012).

1.6.5.1.1. Dimetoato

De acordo com o objetivo do atual trabalho, será dado particular destaque ao dimetoato, visto tratar-se de um produto amplamente utilizado nos olivais portugueses como inseticida de contacto no combate de diferentes grupos de pragas, sendo que também é utilizado, embora com menor expressão, como acaricida. Quimicamente o dimetoato é um composto organofosforado derivado estruturalmente do ácido ditiofosfórico, pertencente à classe dos fosfoditionotiolato (Figura 3) (Amaral, 2007; Cunha, 2007).

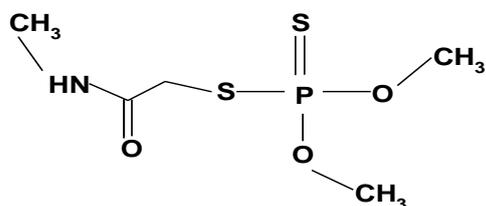


Figura 3. Representação geral da estrutura química do dimetoato.

O dmt é solúvel em água e bastante solúvel na maior parte dos solventes orgânicos. Quanto à sua estabilidade, é relativamente estável em água e em meios ácidos, no entanto é instável em soluções alcalinas (WHO, 2015). A tabela 2 apresenta de forma sucinta as principais características químicas, físicas e toxicológicas do dimetoato.

Tabela 2. Características químicas, físicas e toxicológicas do dimetoato (WHO, 2015).

Nome IUPAC	O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate
Formula Molecular	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
CAS RN	60-51-5
Massa molecular	229,2574 g mol ⁻¹
Massa específica	1,304 g cm ⁻³
Ponto de fusão	52-52,5 °C
Ponto de ebulição	117 °C/ 0,1 mmHg
Solubilidade em água	Ligeiramente solúvel (2,5 g/ 100 mL)
Estabilidade	Relativamente estável em meio aquoso (pH 2-7)
Símbolos de Perigo	Xn: Nocivo
Códigos de Risco	Toxico em contacto com a pele; Toxico por ingestão.
Descrição de segurança	Manter fora do alcance das crianças; Usar vestuário de proteção adequado; Usar luvas adequadas.
Toxicidade aguda	Toxicidade moderada (Classe II)
Intervalo de segurança	42 dias para o olival
Estado físico	Sólido
Odor	Mercaptano
Cor	Branco

Normalmente, o dimetoato é formulado como uma emulsão concentrada e surge atualmente no mercado com alguns dos seguintes nomes comerciais: Dimetal; Perfekthion; Damadim, Dafenil e Dimistar Progress; Rogor e Cha 3621-04 Dimistar Progress (DGAV, 2014b).

Quando aplicado às plantas, o dimetoato é rapidamente absorvido e decomposto, tanto na superfície como no seu interior, por hidrólise e oxidação, sendo que o tempo de meia-vida deste composto varia entre 2 a 5 dias. Por sua vez este composto degrada-se

completamente entre 15 a 30 dias após a sua aplicação, dependendo sobretudo da espécie da planta e das condições climáticas (WHO, 1988).

Como a maioria dos organofosforados, o dimetoato atua a nível da sinapse, inibindo a enzima acetilcolinesterase, o que conseqüentemente impede que a transmissão dos impulsos nervosos cesse, originando assim a morte do inseto por asfixia devido à paralisia dos músculos necessários à respiração. Deste modo, uma vez que este mecanismo é similar para todos os animais, é fácil de compreender que os pesticidas com este modo de ação podem implicar sérios riscos para os seres humanos (Catalá-Icardo *et al.*, 2012).

A Organização Mundial da Saúde define uma dose diária admissível (DDA) para o dimetoato de $0,002 \text{ mgkg}^{-1}$ de peso corporal (Catalá-Icardo *et al.*, 2012). Por sua vez, a dose letal oral para os seres humanos, tem sido estimada na gama de $50\text{-}500 \text{ mgkg}^{-1}$ de peso corporal (WHO, 1988).

1.6.5.2.Piretroídes

De um modo geral, os piretróides são compostos sintéticos derivados das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefoliu* e de algumas outras espécies pertencentes à mesma família, que foram inicialmente desenvolvidos com o objetivo de serem aplicados na agricultura para o controle de pragas, uma vez que apresentavam características inseticidas eficazes e uma baixa toxicidade para o ser humano (Nasuti *et al.*, 2003).

Existem relatos da utilização de piretrinas naturais na China que datam do século I a.C.. Estes compostos, constituintes ativos do piretro, foram então utilizados como inseticidas naturais durante muitos anos, devido à sua eficaz ação sob uma vasta variedade de insetos, associada à baixa toxicidade em mamíferos (Nollet e Rathore, 2010), quando em circunstâncias de uso adequado. Contudo, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade ao ar e à luz solar, diminuindo assim a sua eficácia no controle dos insetos que atacam as culturas agrícolas (Palmquist *et al.*, 2012).

A aplicação de piretróides sintéticos na agricultura teve início na década de 70 após a introdução de uma modificação estrutural nas piretrinas, modificando a sua

estrutura química por forma a obter substâncias com maior potencial inseticida e sobretudo com uma maior estabilidade (Soderlund *et al.*, 2002). Deste modo, a inserção de átomos de azoto, enxofre e de halogéneos na estrutura química das piretrinas permitiu ultrapassar os problemas de estabilidade que as substâncias naturais anteriormente utilizadas apresentavam, mantendo a baixa toxicidade aguda nos mamíferos e uma limitada persistência no solo (Heudorf e Angerer, 2001).

Do ponto de vista químico, os piretróides sintéticos (Figura 4) são constituídos por ésteres dos ácidos crisantêmico ou crisantêmico com substituintes halogenados, do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico ou ainda de alguns álcoois, nomeadamente a aletrolona e o álcool 3-fenoxibenzil (Tadeo, 2008). A estereoquímica destes compostos é extremamente importante para a sua eficácia, uma vez que os piretróides possuem diferentes formas isoméricas que lhes confere um distinto potencial tóxico e diferentes intensidades inseticidas, sendo que os isómeros *cis* são geralmente mais tóxicos que os *trans* (Casida *et al.*, 1983; Narahashi, 1996).

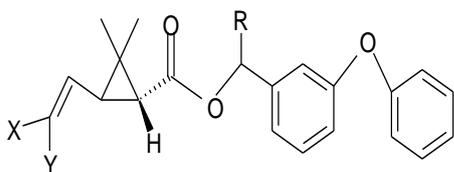


Figura 4. Representação da estrutura química de alguns piretróides (X = Cl, Br, ou -CH₃; Y = -CF₃, Cl, Br ou -CH₃; R = -CN ou H).

Os piretróides têm sido classificados em dois grupos (tipos I e II), de acordo com a sua resposta biológica, eletrofisiológica e ação no sistema nervoso. Os sintomas demonstrados após a aplicação do inseticida têm sido associados à ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo α -ciano na sua estrutura, o que aumenta a atividade inseticida destes compostos (Casida *et al.*, 1983). Quanto à sua toxicidade, os principais efeitos observados após a exposição via oral são o síndrome de tremor, que é causado pelos piretróides do tipo I que atuam preferencialmente nos nervos periféricos, enquanto os do tipo II atuam no sistema nervoso central originando sintomas como a falta de coordenação motora, convulsões, hiperatividade, careoatetose e aumento da salivação. Relativamente à exposição pela via dérmica, os piretróides podem causar irritação incluindo rubor e edema na pele (Soderlund, 2012). Estudos de toxicidade aguda e subaguda demonstraram a neuro-toxicidade e hipertrofia hepática em mamíferos (Beilshmidt, 1990). Os principais efeitos causados pela exposição crônica e subcrônica

aos compostos pertencentes à classe dos piretróides sintéticos são alergias, asma bronquítica, irritação das mucosas, hipersensibilidade, supressão do sistema imunitário, danos no sistema nervoso e ainda alterações a nível da reprodução (Beilschmidt, 1990).

Relativamente ao potencial mutagénico e carcinogénico dos piretróides, a literatura científica mostra que estes compostos podem originar mutações e são propensos para o aparecimento de vários tipos de cancro (Beilschmidt, 1990). De acordo com os resultados obtidos por Saito e seus colaboradores (Saito *et al.*, 2000) é ainda possível afirmar que alguns compostos pertencentes à classe dos piretróides apresentam efeitos estrogénicos, originando interferências hormonais no organismo dos mamíferos.

Os piretróides são considerados agentes de contato que atuam com rapidez sobre o sistema nervoso periférico ou central do inseto, causando imediatamente a sua paralisia seguida de morte, efeito de choque designado de “knock down” (Kavvalakis e Tsatsakis, 2012). Habitualmente, as formulações com piretróides, para além da substância ativa, possuem ainda um agente sinérgico (butóxido de piperonilo) que inibe as enzimas que os insetos possuem para metabolizar os piretróides (Casida *et al.*, 1983).

Relativamente ao modo de ação, os compostos pertencentes à classe dos piretróides sintéticos podem interagir com os canais iónicos de sódio, de potássio, de cloro e de cálcio, afetar o correto funcionamento do complexo neurotransmissor do GABA, podendo ainda originar a modulação da transmissão colinérgica nicotínica, o que aumenta a libertação de noradrenalina e serotonina. Contudo, as propriedades inseticidas destes compostos derivam fundamentalmente da sua capacidade para alterar a função dos canais de sódio (Casida *et al.*, 1983; Tatebayashi *et al.*, 1994; Soderlund *et al.*, 2002; Ray e Fry, 2006).

Em termos gerais, as células nervosas quando se encontram no estado normal de funcionamento têm uma determinada diferença de potencial. Todavia, quando a quantidade de iões que passa através dos canais de sódio é alterada gera uma despolarização da membrana nervosa, provocando a libertação de neurotransmissores, que por sua vez intervêm na comunicação entre as células. Como consequência, as mensagens elétricas enviadas entre os neurónios permitem ao organismo gerar uma determinada resposta a esse estímulo (por exemplo um determinado movimento).

Normalmente os canais de sódio encontram-se fechados, o que origina uma diferença de potencial na membrana neural. Quando esta fica despolarizada, uma fração dos canais de sódio abrem gerando um gradiente de corrente de sódio, processo que se designa por ativação dos canais de sódio e que depende do potencial da membrana (Vais *et al.*, 2001). Dessa forma, do ponto de vista bioquímico, os piretróides alteram a cinética dos canais de sódio através da diminuição da taxa de inativação, isto é, prolongando o tempo em que o respetivo canal se encontra aberto, e conseqüentemente aumentando o período de permeabilidade para o sódio na membrana retardando, inevitavelmente, a saída de potássio da célula. O resultado final é uma diminuição do potencial de ação e a geração de impulsos nervosos repetitivos, seguindo-se pela morte do organismo alvo (Narahashi, 1996; Narahashi *et al.*, 2007; Vais *et al.*, 2001).

Considera-se que a exposição humana aos piretróides ocorra principalmente através do contacto direto dos operadores que se encontram envolvidos no processo de aplicação destes compostos e através da contaminação dos alimentos com os seus resíduos (Heudorf e Angerer, 2001), os quais são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal após a sua administração oral (Soderlund *et al.*, 2002). Apesar das vantagens que apresentam, relativamente a outros inseticidas, devem ser tomados os mesmos cuidados, no que diz respeito à sua utilização, já que podem exercer graves efeitos neuro e cardiotoxicos (Cerdeira *et al.*, 2002).

1.6.5.2.1.Deltametrina

Das diversas substâncias ativas pertencentes à classe dos piretróides, é de destacar a deltametrina (Figura 5), devido à sua extensiva aplicação nos olivais portugueses, sendo, por isso, abordada com mais detalhe neste trabalho. Trata-se de um piretróide do tipo II, pertencente à quarta geração, que foi sintetizado pela primeira vez em 1974, através da inserção de um grupo substituinte α -ciano no grupo álcool 3-fenoxibenzilo, o que lhe confere um maior poder inseticida, maior estabilidade ao ar, à luz e à humidade, contudo é instável em meio alcalino (WHO, 1990).

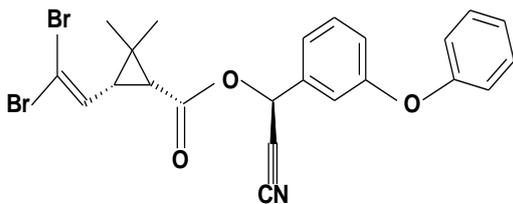


Figura 5. Estrutura química da deltametrina.

A deltametrina é um composto que apresenta um elevado carácter lipofílico, é praticamente insolúvel em água e bastante solúvel na maior parte dos solventes orgânicos, as suas moléculas são estáveis em solução aquosa a pH ácido e neutro, porém são suscetíveis de sofrer hidrólise a valores de pH básicos. Após a sua aplicação, a degradação das moléculas de deltametrina depende fundamentalmente da intensidade da radiação solar, sendo que o tempo de meia-vida deste composto é de aproximadamente 48 dias. Quanto à sua estabilidade e mobilidade é um composto relativamente estável e praticamente imóvel no solo (WHO, 2014). As principais características químicas, físicas e toxicológicas da deltametrina estão resumidas na tabela 3.

A deltametrina encontra-se disponível comercialmente sob a forma de emulsão ou suspensão concentrada, de pó seco, líquida diretamente aplicável ou ainda na forma de emulsão de óleo em água. Em termos de aplicação, pode ser usada individualmente ou em uso concomitante com outros pesticidas, com os quais não possui incompatibilidades. Geralmente, a substância ativa deltametrina encontra-se no mercado com os seguintes nomes comerciais: Decis; Deltaplan; K-obiol DP2; Jackpot; Deca; Delstar; Petra; Delta; entre muitos outros (DGAV, 2014b).

Tal como a maioria das substâncias ativas pertencentes à classe dos piretróides, a deltametrina atua por contato e ingestão. Bioquimicamente, estes compostos interagem essencialmente nos canais de sódio da membrana dos axônios dos insetos, provocando uma maior despolarização da membrana nervosa, o que origina a diminuição da amplitude do potencial de ação, originando repetitivas descargas sinápticas, e, por último, a morte do inseto (Casida, 1983). Assim, uma vez que este mecanismo é semelhante para todos os vertebrados, é possível depreender que os pesticidas com este modo de ação possam implicar sérios riscos para os seres humanos.

Tabela 3. Características químicas, físicas e toxicológicas da deltametrina (WHO, 2014).

Nome IUPAC	(<i>S</i>)-a-cyano-3-phenoxybenzyl (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Formula Molecular	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
CAS RN	52918-63-5
Massa molecular	505,24 g mol ⁻¹
Massa específica	0,5 g cm ⁻³ (20 °C)
Ponto de fusão	98-101 °C
Ponto de ebulição	Superior a 300 °C
Solubilidade em água	< 0,2 mg mL ⁻¹ (20 °C)
Estabilidade	Estável
Símbolos de Perigo	T: Tóxico; N: Perigo para o meio ambiente.
Códigos de Risco	Tóxico por inalação e por ingestão; Muito tóxico para os organismos aquáticos; Pode causar efeitos negativos a longo prazo no ambiente aquático.
Descrição de segurança	Manter fora do alcance das crianças; Usar vestuário de proteção adequado; Usar luvas adequadas.
Toxicidade aguda	Moderadamente tóxico (classe II)
Intervalo de segurança	7 dias para o olival
Estado físico	Sólido
Odor	Inodoro
Cor	Incolor

O Comité de Especialistas sobre Resíduos de Pesticidas (JMPR) órgão integrante da FAO/ OMS define uma dose diária admissível (DDA) para a deltametrina de 0,01 mg kg⁻¹ de peso corporal e uma dose aguda de referência de 0,05 mg kg⁻¹ de peso corporal (WHO, 2014).

1.6.5.3. Triazinas

As triazinas foram desenvolvidas no início da década de 50 pela empresa Geigy Química de origem Suíça, tendo sido desde então utilizadas como herbicidas seletivos no controlo de pré- e pós-emergência de plantas espontâneas em diversas culturas (Pacáková e Jiskra, 1996). Em termos gerais, estas substâncias são tóxicas, persistentes no meio ambiente e potencialmente carcinogénicas para o homem (Nimmo e MCEwen, 1994). Os herbicidas pertencentes a este grupo compreendem cerca de 30 % de toda a produção mundial de pesticidas (Cabral *et al.*, 2003).

Do ponto de vista químico, as triazinas constituem-se por um anel heterocíclico aromático de seis membros, no qual os átomos de carbono e azoto encontram-se simetricamente localizados, podendo conter diferentes substituintes nas posições 1-, 3- e 5- (Pacáková e Jiskra, 1996). Estruturalmente, as triazinas mais importantes são as *s*-triazinas, também denominadas de triazinas simétricas (Pinto e Jardim, 2000). Na figura 6 encontra-se representada a estrutura molecular geral de uma *s*-triazina.

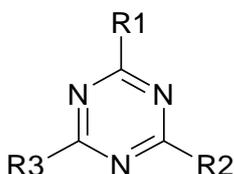


Figura 6. Representação da estrutura química geral de uma *s*-triazina (R1 = Cl, -OCH₃ ou -SCH₃; R2 e R3 = -NH₂).

As propriedades e os nomes comerciais dos compostos pertencentes à família das *s*-triazinas dependem basicamente dos substituintes da posição R1. De acordo com os diferentes substituintes, existem 3 grupos de *s*-triazinas, nomeadamente, as clorotriazinas, nas quais o substituinte é um átomo de cloro (Cl) e cujo nome comercial dos compostos químicos daí resultantes termina em -azina, as metoxitriazinas cujo substituinte é um grupo metoxi (-OCH₃), tendo o nome dos respetivos compostos químicos a terminologia -tona e ainda as metiltiotriazinas, sendo que neste caso o substituinte é um grupo metiltio (-SCH₃) e o nome dos compostos pertencentes a este grupo possui a terminologia -trina. Por sua vez, as posições 3 e 5 são normalmente ocupadas por grupos amina (Pinto e Jardim, 2000).

Os compostos pertencentes à classe das *s*-triazinas são bastante estáveis, pelo que apresentam uma elevada persistência no meio ambiente e uma grande capacidade de

bioacumulação nos tecidos gordos dos organismos vivos. Por outro lado, a sua absorção no solo é relativamente baixa, sendo assim facilmente arrastados para os diferentes compartimentos aquáticos e, conseqüentemente, para toda a cadeia alimentar (Balduini *et al.*, 2003).

Os processos de degradação das triazinas, tanto no solo como nos diferentes sistemas aquáticos, podem ser originados por ação física (fotólise), química (hidrólise e oxidação) e biológica (microrganismos). O mecanismo de degradação destes compostos é estritamente dependente do seu comportamento no solo, ou seja, a decomposição das moléculas de triazina é influenciada pela quantidade de matéria orgânica existente no solo, visto que esta favorece a adsorção e o desenvolvimento de microrganismos que aceleram a sua decomposição (Pacáková e Jiskra, 1996).

A ação dos compostos pertencentes a esta classe é caracterizada pelo bloqueio do início da via fotossintética, uma vez que as triazinas estão inseridas no grupo C1 (inibidores do fotossistema II), atuando na membrana do cloroplasto na qual ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente, no transporte de elétrons. Deste modo, as plantas sujeitas a aplicações destas substâncias apresentam clorose foliar, verificando-se a inibição do seu crescimento. Contudo, devido ao facto das plantas superiores metabolizarem as triazinas com uma velocidade mais elevada do que as plantas infestantes, faz com que sejam menos sensíveis à sua toxicidade (Baird, 1998).

A maioria dos pesticidas pertencentes à família das *s*-triazinas apresenta uma baixa toxicidade aguda. No entanto, a exposição a curto prazo a concentrações elevadas pode causar insuficiência cardíaca, pulmonar e renal, juntamente com baixos valores de pressão arterial, espasmos musculares, danos da glândula adrenal, perda de apetite e conseqüentemente perda de peso. Os efeitos a longo prazo variam entre a perda de peso, degeneração muscular, problemas cardiovasculares, podendo ainda, em casos mais graves, originar cancro (Steffensen, 2004). Os resultados dos estudos científicos que investigam a associação desses compostos com o desenvolvimento de cancro, tanto em animais como nos seres humanos ainda são alvo de alguma controvérsia, no entanto, alguns artigos de revisão sugerem que as triazinas podem ser potenciais causadores de cancro (Baranowska *et al.*, 2006; Clapp *et al.*, 2007; Mladinic *et al.*, 2012). Há ainda estudos que consideram que alguns compostos pertencentes à classe das triazinas são responsáveis pela disfunção do sistema reprodutor, provocam danos no sistema nervoso

central (Safe, 2004) e são suspeitos de causar modificações nas funções hormonais (Cai *et al.*, 2004; Baranowska *et al.*, 2006).

A família das *s*-triazinas compreende uma série de substâncias ativas que apresentam um elevado espectro de ação herbicida, sendo de destacar a atrazina, a simazina, a propazina e ainda a terbutilazina, entre outras (Sahid e Teoh, 1994). A substância ativa atrazina tem sido um dos principais herbicidas mais utilizados em todo o mundo. Os potenciais efeitos negativos que advém da utilização da atrazina, quer a nível ambiental quer para a saúde humana, têm fomentado a sua substituição por outros herbicidas, nomeadamente pela terbutilazina, a qual tem vindo a ser gradualmente mais usada em diversos países da Europa (Caracciolo *et al.*, 2005).

1.6.5.3.1. Terbutilazina

Dado o objetivo do presente estudo, a terbutilazina (tbz) será alvo de destaque, por ser um dos principais herbicidas aplicados no olival, como forma de controlar as plantas infestantes que competem diretamente com a cultura do olival, relativamente aos nutrientes e à água disponíveis no solo.

A terbutilazina (Figura 7) é uma substância ativa pertencente à família das *s*-triazinas e ao grupo das clorotriazinas, que possui um modo de ação não seletivo (Sanlavielle *et al.*, 1996). De acordo com a via de penetração é classificado como um pesticida residual e sistémico, que é absorvido sobretudo pelas raízes das plantas, sendo posteriormente armazenado nos seus tecidos, durante um período de tempo mais ou menos prolongado, onde exercem a sua ação fitotóxica, a qual consiste essencialmente na inibição da taxa fotossintética (WHO, 1998). Na tabela 4 apresentam-se as principais características químicas, físicas e toxicológicas deste pesticida.

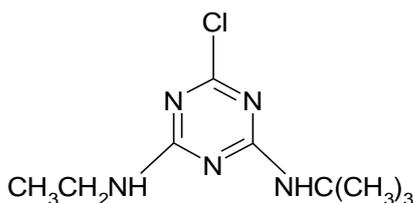


Figura 7. Representação da estrutura química da terbutilazina.

Tabela 4. Características químicas, físicas e toxicológicas da terbutilazina (WHO, 1998).

Nome IUPAC	N2-tert-butyl-6-chloro-N4-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
Formula Molecular	C ₉ H ₁₆ Cl ₅
CAS RN	5915-41-3
Massa molecular	229,7 g mol ⁻¹
Massa específica	1,188 g cm ⁻³ (20 °C)
Ponto de fusão	177-179 °C
Ponto de ebulição	373,1 °C a 760 mmHg
Solubilidade em água	8,5 mg L ⁻¹ (20 °C)
Estabilidade	Estável
Símbolos de Perigo	Xn: Nocivo; N: Perigoso para o Ambiente.
Códigos de Risco	Tóxico por ingestão; Muito tóxico para os organismos aquáticos.
Descrição de segurança	Manter fora do alcance das crianças; Usar vestuário de proteção adequado; Usar luvas adequadas.
Toxicidade aguda	Pouco Tóxico (Classe III)
Intervalo de segurança	Não indicado devido à época de aplicação
Estado físico	Sólido
Odor	Inodoro
Cor	Branco ligeiramente amarelado

Atualmente a terbutilazina é utilizada em diversos produtos fitofarmacêuticos como por exemplo no Arpax TER, Aspect, Folar 525 FW e Glitz, Primextra Gold Star. Relativamente aos tipos de formulações, podem encontrar-se disponíveis comercialmente na forma de suspensão concentrada, suspo-emulsão, dispersão em óleo ou ainda na forma de suspensão concentrada em óleo (DGAV, 2014a).

No que diz respeito ao mecanismo de degradação da terbutilazina no solo, é possível afirmar que este fenómeno ocorre sob uma vasta variedade de condições ambientais, sendo que a velocidade de decomposição deste composto é fortemente influenciada por diversos fatores, tais como: a temperatura, o teor de humidade, a atividade microbiana, assim como o pH do solo. Por sua vez, a degradação da tbz em água depende essencialmente da presença de sedimentos e da atividade biológica que existe no respetivo sistema aquático. As moléculas de tbz apresentam, em média, um tempo de meia-vida de 3 meses quando expostas à radiação solar (Green, 1991, citado por WHO, 1998). Adicionalmente, a frequente ocorrência de contaminações tanto em águas superficiais como subterrâneas, juntamente com as suas intrínsecas propriedades toxicológicas, podem representar sérios riscos para a saúde humana (EFSA, 2011; Mladinic *et al.*, 2012).

A Organização Mundial da Saúde define uma dose diária admissível para a terbutilazina de $2,2 \mu\text{gkg}^{-1}$ de peso corporal (WHO, 1998).

1.7.Vantagens e Desvantagens Associados ao Uso de Pesticidas

De modo a suprirem-se as necessidades crescentes da população mundial, a produção intensiva, em larga escala, de alimentos agrícolas é uma realidade. Todavia, essa intensificação tem contribuído para o aumento dos problemas fitossanitários associados a pragas e doenças, cuja limitação nas culturas tem sido realizada sobretudo com recurso à luta química utilizando pesticidas de síntese (Cox *et al.*, 1979).

As principais vantagens associadas ao uso de pesticidas são perceptíveis de forma direta, ao evitarem elevadas perdas nas colheitas, através da limitação das diversas doenças, pragas e ervas infestantes que atacam as culturas. Dessa forma é possível permitir às plantas, que expressem todo o seu potencial produtivo, permitindo manter a regularidade das produções, para o contínuo abastecimento dos mercados, permitindo uma produção economicamente rentável e socialmente aceite (Fenik *et al.*, 2011; Popp *et al.*, 2013).

Ao longo do tempo, os pesticidas sofreram uma enorme evolução, permitindo obter produtos cada vez mais eficazes e seletivos, contudo, apesar dos progressos no seu desenvolvimento e otimização, uma parte residual das quantidades usadas pode

permanecer nas plantas e no meio ambiente, contaminando os meios terrestres e aquáticos, e consecutivamente toda a cadeia alimentar (Amaro, 2003).

A contaminação por pesticidas ocorre tanto pontualmente nos locais de aplicação, como nas áreas adjacentes, podendo assim atingir locais distantes do ponto onde foram aplicados, pelo que, dependendo das suas características, podem acumular-se em diferentes compartimentos ambientais, tais como a atmosfera, o solo e as águas superficiais e subterrâneas. À superfície do solo, os pesticidas podem ser transferidos para a atmosfera através do processo de volatilização ou arrastados para cursos de água, por escoamento superficial ou pela ação da erosão. Ainda neste compartimento ambiental os pesticidas podem ser adsorvidos por componentes orgânicos ou minerais do solo, lixiviados ou absorvidos pelas plantas e, consecutivamente, o risco de contaminação pode ser ampliado ao longo de toda a cadeia alimentar até atingir o homem (Nimmo e MCEwen, 1994; Matsadiq *et al.*, 2011).

De acordo com os dados obtidos pela Organização Mundial de Saúde verifica-se que ocorram mundialmente milhões de intoxicações agudas causadas por pesticidas, originando milhares de mortes todos os anos. Os trabalhadores que se encontram expostos a estes produtos, quer seja de forma direta como indireta, são geralmente os mais afetados relativamente aos seus efeitos tóxicos, contudo, a contaminação de alimentos tem originado um número considerável de intoxicações (Moral *et al.*, 2006). Por sua vez, existem autores que afirmam que a exposição a resíduos de pesticidas através da alimentação é considerada como uma das principais vias de exposição, sendo cinco vezes superior à exposição por outras vias, como por exemplo a água potável e o ar (Juraske *et al.*, 2009).

Neste contexto, a exposição aos pesticidas, quer seja aguda ou crónica, acarreta vários efeitos negativos para a saúde humana. O espectro de efeitos é bastante amplo e está diretamente relacionado com a ação biológica de cada uma das substâncias ativas que fazem parte da composição dos pesticidas, por outro lado, tendo em conta que os pesticidas são substâncias biologicamente ativas, a longo prazo, podem originar sérios problemas para a saúde humana. Ao longo do tempo vários estudos de âmbito científico têm procurado demonstrar o impacto destes produtos no homem, em particular alguns trabalhos destacam o seu potencial carcinogénico, mutagénico (Goldmith, 1998; Gabbianelli *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2005; Sarabia *et al.*, 2009), citotóxico (Wagner

et al., 2005), genotóxico (Rahman *et al.*, 2002; Çakir e Sarikaya, 2005; Matsadiq *et al.*, 2011), teratogénico (Kang *et al.*, 2004) e imunotóxico (Yeh *et al.*, 2005). Os pesticidas podem também ser responsáveis por inúmeras desordens neuro-comportamentais e pela neuro-degenerescência do cérebro, as quais podem estar associadas ao desenvolvimento da doença de Parkinson (Ascherio *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). Foi também demonstrado que os pesticidas podem interferir na reprodução, afetando a fertilidade tanto dos seres pertencentes ao sexo masculino como feminino (Gabbianelli *et al.*, 2003; Gabbianelli *et al.*, 2004; Sarabia *et al.*, 2009). Por sua vez os pesticidas podem ainda causar danos irreversíveis ao longo da formação do feto e, em casos extremos, originar a morte fetal (WHO, 1990; Gabbianelli *et al.*, 2004; Ritter *et al.*, 2006). Com efeito, os fetos e as crianças pertencem a um grupo de risco particularmente elevado, pois são mais sensíveis e suscetíveis que os adultos aos efeitos tóxicos dos pesticidas, visto possuírem menos defesas enzimáticas para degradarem as substâncias ativas responsáveis por esses efeitos, e ainda devido ao facto de ingerirem uma maior quantidade de alimentos por kg de peso corporal. Apesar da suscetibilidade ser variável em função do agente tóxico, as exposições precoces a estes produtos químicos têm sido fortemente associadas a várias doenças neurológicas (Bruckner, 2000; Peres e Moreira, 2003; Ritter *et al.*, 2006).

Em suma, apesar do facto dos pesticidas serem considerados agentes responsáveis não só pelos desequilíbrios que provocam a nível dos diferentes compartimentos do ecossistema, como também pelo seu potencial risco patogénico para o homem, atualmente os especialistas afirmam que a erradicação destes compostos não é uma solução viável, dado que poderia comprometer a subsistência de toda a população mundial. Por sua vez, a organização internacional FAO considera que a solução para garantir a “segurança alimentar” dos consumidores, relativamente à contaminação dos produtos agrícolas com resíduos de produtos fitofarmacêuticos, consistirá no uso adequado e criterioso dos pesticidas, a par da monitorização da sua presença nos alimentos, de modo a evitar problemas económicos a nível mundial e sérios riscos para a saúde das populações.

1.8.Principais Pesticidas Usados no Olival

No caso concreto do olival, a sua produção é frequentemente afetada por diversos fatores biológicos, tais como pragas e doenças, cuja limitação é essencial para a manutenção da sua rentabilidade. Mais especificamente, no caso das pragas que podem ser responsáveis por enormes quebras na produção e que podem afetar a qualidade da mesma, destacam-se a mosca-da-azeitona (*Bactrocera oleae*) e a traça-da-oliveira (*Prays oleae*). São ainda de salientar outras pragas, tais como as cochonilhas, com especial destaque para a cochonilha-negra (*Saissetia oleae*), o tripe-da-oliveira (*Liothrips oleae*) e o algodão-da-oliveira (*Euphyllura olivina*), que em determinadas circunstâncias, sobretudo em olivais jovens, podem atingir elevados níveis populacionais sendo necessário intervir com meios de luta químicos adequados. Contudo, para este grupo de pragas, geralmente a presença de antagonistas e a realização de práticas culturais corretas podem ser suficientes para limitar o seu desenvolvimento. Nos últimos anos, tem ainda sido registada a ocorrência de novas pragas, nomeadamente a euzofera (*Euzophera pinguins*) e a traça-verde (*Palpita unionalis*), que nalgumas regiões do país têm sido muito problemáticas. No que diz respeito às doenças que afetam a cultura do olival considera-se que a gafa, causada por fungos do género *Colletotrichum Spp.*, é sobretudo responsável por afetar negativamente a qualidade do azeite, enquanto que o olho-de-pavão (*Spilocaea oleagina*) e a cercospirose, causada pelo fungo *Pseudocercospora cladosporioides*, podem ser responsáveis por grandes desfoliações das árvores e, desta forma, contribuir para elevadas perdas na produção de azeitona (Mendes e Cavaco, 2009).

Tendo em conta os efeitos negativos que os inimigos do olival podem trazer para a cultura e conseqüentemente para o agricultor, por forma a reduzirem-se os prejuízos causados por estes ataques, tem-se verificado a aplicação generalizada de vários pesticidas. Assim, relativamente à luta química, deve ser tido em conta que os produtos fitofarmacêuticos utilizados devem obedecer às exigências do tipo de produção adotada, como por exemplo a produção convencional, integrada ou até mesmo a produção biológica. Por sua vez, a utilização destes compostos químicos deve ser realizada de acordo com as instruções descritas no rótulo que se encontra na embalagem do respetivo produto, nomeadamente no que diz respeito à sua finalidade, dose ou concentração homologadas, número de aplicações, intervalo entre aplicações, classificação

toxicológica e sobretudo ao intervalo de segurança, período que decorre entre o momento da aplicação até à fase da colheita, o qual deve ser criteriosamente respeitado, a fim de evitar a contaminação das azeitonas no momento da colheita.

Com base nos produtos fitofarmacêuticos e nas respetivas substâncias ativas que se encontram atualmente homologadas para a cultura da oliveira, são de destacar o dimetoato, a deltametrina e o spinosade para o combate da mosca-da-azeitona, o óleo de verão para o controlo da cochonilha-negra, a lambda-cialotrina, a deltametrina e o dimetoato para a limitação da traça-da-oliveira, sendo o dimetoato ainda utilizado contra o algodão-da-oliveira, o gorgulho, a traça-verde e o tripe-da-oliveira. Para combater alguns fungos, tais como a gafa, o olho de pavão e a cercosporiose, recorre-se essencialmente ao cobre. Quanto aos herbicidas que são aplicados na cultura do olival para o combate de algumas plantas, mono e dicotiledóneas, que competem diretamente com a cultura relativamente aos nutrientes e à água disponível no solo, recorre-se essencialmente ao diurão, glifosato, terbutilazina e a misturas de amitrol com terbutilazina e tiocianato, bem como de glifosato com terbutilazina, entre outros (Mendes e Cavaco, 2009; DGAV, 2012).

De acordo com a informação anteriormente referida, caso não sejam respeitadas as normas de aplicação dos produtos fitofarmacêuticos, as suas SA podem ficar depositadas nas azeitonas e, caso persistam até à fase da colheita, podem ser transferidas para o azeite. É neste ponto, em particular, que reside a pertinência deste estudo, dado que o azeite é exclusivamente obtido a partir das azeitonas por meios meramente mecânicos e/ ou físicos (Kandyliis *et al.*, 2011) sem estarem envolvidos quaisquer processos químicos de purificação. Por esse motivo reveste-se da maior relevância o desenvolvimento e a consequente implementação de metodologias analíticas que permitam detetar e quantificar, com elevada seletividade e especificidade, quantidades vestigiais dos pesticidas, em matrizes alimentares com elevada complexidade como é o caso do azeite.

1.9.Referências Bibliográficas

Aliferis K. A., Jabaji S. (2011). Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **100**, 105-117.

Amaral E. H. (2007). Resíduos de Agrotóxicos Organofosforados: Validação de Método de Cromatografia a Gás e Quantificação em Produtos Agrícolas. Tese de pós-graduação. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG.

Amaro P. (2003). A Protecção Integrada. ISA/Press, Cadaval, 1-447.

Amaro P. (2007). A política de redução dos riscos dos pesticidas em Portugal. ISA/Press, Cadaval, 1-176.

Amaro P. (2010). A Deficiente Informação Aumenta os Riscos dos Pesticidas em Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, 272-284.

Arenas L. T., Simon N. M., Gushikem Y., Costa T. M. H., Lima E. C., Benvenuti E. V. (2006). A water soluble 3-n-propyl-1-azonia-4-azabicyclo [2.2. 2] octanechloride silsesquioxane grafted onto Al/SiO₂ surface: chromium adsorption study. *Eléctrica Quimica*, **31**, 53-58.

Ascherio A., Chen H., Weisskopf M. G., O'Reilly E., McCullough M. L., Calle E. E., Schwarzschild M. A., Thun M. J. (2006). Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. *Annals of Neurology*, **60**, 197-203.

Baird C. (1998). Environmental Chemistry. 2ª Edição. H.W Freeman and Company, New York, EUA.

Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istambouliea G., Piletsky S., Piletska E., Ait-Ichoub I., Ait-Addib E., Noguera T., Rouillona R. (2012). Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, **734**, 99-105.

Baldwin M. P., Stephenson D. B., Thompson D. W. J., Dunkerton T. J., Charlton A. J., O'Neill A. (2003). Stratospheric Memory and Skill of Extended-Range Weather Forecasts. *Science*, **301**, 636-640.

Baranowska I., Barchańska H., Pacak E. (2006). Procedures of trophic chain samples preparation for determination of triazines by HPLC and metals by ICP-AES methods. *Environmental Pollution*, **143**, 206-211.

Beilshmidt D. M. (1990). Toxicology and Environmental Fate of Synthetic Pyrethroids. *Journal of pesticide Reform*, **10**, 32-37.

Bruckner J. (2000). Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: The NAS panel report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **31**, 280-285.

Brussel. (2008). Commission Staff Working Document - Monitoring of Pesticides Residues in Products of Plant Origin. Commission of the European Communities Press, European Union, 1-40.

Cabral M. F., De Souza D., Alves C. R., Machado S. A. S. (2003). Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida deltametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. *Eclética Química*, **28**, 41-47.

Cai Z., Wang D., Ma W. (2004). Gas chromatography/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters by an isotope dilution technique. *Analytica Chimica Acta*, **503**, 263-270.

Caracciolo A. B., Giuliano G., Grenni P., Cremisini C., Ciccoli R., Ubaldi C. (2005). Effect of urea on degradation of terbuthylazine in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 1035-1040.

Carson R. (1962). *Silent Spring*. Houghton Mifflin; Boston, MA, USA.

Casida J. E., Gammon D. W., Glickman A. H., Lawrence L. J. (1983). Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **23**, 413-38.

Casida J. E., Quistad G.B. (1998). Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annual Reviews Entomology*, **43**, 1-16.

Catalá-Icardo M., López-Paz J. L., Choves-Barón C., Peña-Bádena A. (2012). Native vs photoinduced chemiluminescence in dimethoate determination. *Analytica Chimica Acta*, **710**, 81-87.

Cerda E., Navarro-Polanco R. A., Sánchez-Chapula J. A. (2002). Modulation of Cardiac Action Potential and Underlying Ionic Currents by the Pyrethroid Insecticide Deltamethrin. *Archives of Medical Research*, **33**, 448-454.

Clapp R., Jacobs M. M., Loechler E.L. (2007). Environmental and Occupational Causes of Cancer – New Evidence, 2005-2007. Lowell Center for Sustainable Production. University of Massachusetts. Acedido através do site: <http://www.sustainableproduction.org/downloads/EnvandOccCausesofCancer-2007Update-DownloadVersion.pdf>, último acesso a 19 de Dezembro de 2014.

Costa L. T., Rei F. T. (2014). A resistência da mosca-da-azeitona ao dimetoato e a sua expansão em Portugal. *Vida Rural*. Outubro 2014, **1801**, 30-34.

Cox G. W., Atkins M. D. (1979). *Agricultural Ecology. An Analysis of World Food Production Systems*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

Cunha S. (2007). Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas: Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1-394.

Çakir S., Sarikaya R. (2005). Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*, **43**, 443-450.

DGAV. (2009). Produtos Fitofarmacêuticos – Homologação – Toxicidade. Acedido através do site: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3666144&generico=3666163&cboui=3666163#3>, último acesso a 26 de Março de 2015.

DGAV. (2012). Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos. Lista do Produtos com Venda Autorizada. Acedido através do site: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=3666304&cboui=3666304> último acesso a 26 de Dezembro de 2014.

DGAV. (2014a). Herbicidas com venda autorizada. Acedido através do site: http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/lista/Introd_lista/herbicidas_lista.htm, último acesso a 5 de Dezembro de 2014.

DGAV. (2014b). Insecticidas e acaricidas com venda autorizada. Acedido através do site: http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/lista/Introd_lista/insec_acar_lista.htm, último acesso a 5 de Dezembro de 2014.

Ecobichon D. J. (2001). Toxic Effects of Pesticides. in: Klaassen C. D., Amdur M. O., Doull J. (Eds.) Casarett & Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons. 6ª Edição. McGraw-Hill Companies, New-York, 499-532.

EFSA. (2009). European Food Safety Authority. 2007 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) n.º 396/20051 Prepared by Pesticides Unit (PRAPeR) of EFSA (Question No EFSA-Q-2008-714). *EFSA Scientific Report*, **305**, 1-106.

EFSA. (2011). European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbuthylazine. *EFSA Journal*, **9**, 1-133.

EFSA. (2014). European Food Safety Authority. Acedido através do site: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides.htm>, ultimo acesso a 3 de Janeiro de 2015.

FAO. (1997). Food and Agricultural Organization of the United Nation. Acedido através do site: <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/i/fulltext/fao07/fao07.pdf>, último acesso a 10 de Janeiro de 2015.

Fenik J., Tankiewicz M., Biziuk M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, **30**, 814-826.

Fussel R. J., Patel K., Macarthur R., Goodall D. M., Keely B. J. (2004). Method validation of resistive heating – gas chromatography with flame photometric detection for the rapid screening of organophosphorus pesticides in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1046**, 225-234.

Gabbianelli R., Nasuti C., Falcioni G., Cantalamessa F. (2004). Lymphocyte DNA Damage in Rats Exposed to Pyrethroids: Effect of Supplementation With Vitamins E and C. *Toxicology*, **203**, 17-26.

García-González D. L., Aparicio-Ruiz R., Aparicio R. (2008). Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 602–60.

Goldmith D. F. (1998). Epidemiology research prospects linking pesticide exposures and cancer risks. In: Kuhr R. J., Motoyama N. Pesticides and the future. Minimizing chronic exposure of humans and the environment. IOS Press, Amsterdam, 17-36.

- Heudorf U., Angerer J. (2001). Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environmental Health Perspectives*, **109**, 213-217.
- Hoffmann U., Papendorf T. (2006). Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate. *Intensive Care Medicine*, **32**, 464-468.
- Juraske R., Mutel C. L., Stoessel F., Hellweg S. (2009). Life Cycle Human Toxicity Assessment of Pesticides: Comparing Fruit and Vegetable Diets in Switzerland and the United States. *Chemosphere*, **77**, 939-945.
- Kandylis P., Vekiari A. S., Kanellaki M., Kamoun N. G., Msallem M., Kourkoutas Y. (2011). Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 1333-1341.
- Kang H. G., Jeong S. H., Cho J. H., Kim D. G., Park J. M., Cho M. H. (2004). Chlropyrifos-methyl shows anti-androgenic activity without estrogenic activity in rats. *Toxicology*, **199**, 219-230.
- Kavvalakis M. P., Tsatsakis A. M. (2012). The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides exposure. *Forensic Science International*, **218**, 111-122.
- Maluf R. S., Menezes F. (2000). Caderno “Segurança Alimentar”. Acedido através do site: http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/seguranca+alimentar_000gvxlxe0q02wx7h.a0g934vgwlj72d2.pdf, último acesso 10 de Janeiro de 2015.
- Matsadiq G., Hua H. L., Renb H. B., Zhou Y.W., Liu L., Cheng J. (2011). Quantification of multi-residue levels in peach juices, pulps and peels using dispersive liquid-liquid microextraction based on floating organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography B*, **879**, 2113-2118.
- Mellanby K. (1992). *The DDT Story*. British Crop Protection Council. Hampshire, United Kingdom.
- Mendes F., Cavaco M. (2009). Manual de proteção fitossanitária para proteção integrada e agricultura biológica do olival. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Lisboa.
- Mladinic M., Zeljezic D., Shaposhnikov S. A., Collins A. R. (2012). The use of FISH-comet to detect c-Myc and TP 53 damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran. *Toxicological Letters*, **211**, 62-69.
- Mnif W., Hassine A. I. H., Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B. (2011). Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **8**, 2265-2303.
- Moral A., Sicilia M. D., Rubio S., Pérez-Bendito D. (2006). Sodium dodecyl sulphate-coated alumina for the extraction/preconcentration of benzimidazolic fungicides from natural waters prior their quantification by liquid chromatography/fluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, **569**, 132-138.

- Narahashi T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*, **79**, 1-14.
- Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Nagata K., Yeh J. Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & Experimental Toxicology*, **26**, 361-366.
- Nasuti C., Cantalamessa F., Falcioni G., Gabbianelli R. (2003). Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*, **191**, 233-244.
- Nimmo D. R., MCEwen L. C. (1994). Pesticides. In Handbook of Ecotoxicology, P. Caloww (Ed.), Blackwell Scientific Publication, Oxford, 155-203.
- Nollet L. M. L., Rathore H. S. (2010). Handbook of Methods of Pesticide Residues Analysis Pesticides – Methods of Pesticide Residuos Analysis. CRC Press, Taylor e Francis Group, New York, 1-597.
- Pacáková V., Jiskra J. (1996). High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. *Journal of Chromatography A*, **754**, 17-31.
- Palmquist K., Salatas J., Fairbrother A. (2012). Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology, In Insecticides - Advances in Integrated Pest Management. Farzana Perveen, Intech, Croatia, 251-278.
- Peres F., Moreira J. C. (2003). É Veneno ou é Remédio? Agrotóxicos, Saúde e Ambiente. Fiocruz, Rio de Janeiro, 21-101.
- Pinto G. M. F., Jardim I. C. S. F. (2000). Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. *Journal of Chromatography A*, **869**, 463-469.
- Popp J., Pető K., Nagy J. (2013). Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **33**, 243-255.
- Rahman M. F., Mahboob M., Danadevi K., Saleha B., Grover P. (2002). Assessment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research*, **516**, 139-147.
- Ramos J. J., González M. J., Ramos L. (2004). Miniaturised sample preparation of fatty foodstuffs for the determination of polychlorinated biphenyls. *Journal of Separation Science*, **27**, 595-601.
- Ray D. E., Fry J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology Therapeutics*, **111**, 174-193.
- Regulamento (CE) n.º 149/2008 da Comissão de 29 de Janeiro de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ao criar os anexos II, III e IV que fixam limites máximos de resíduos para os produtos abrangidos pelo anexo I do mesmo regulamento.

Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Fevereiro de 2005, relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal, e que altera a Directiva 91/414/CEE do Conselho.

Regulamento (CE) n.º 839/2008 da Comissão de 31 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos anexos II, III e IV relativos aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície de determinados produtos.

Regulamento (UE) n.º 212/2013 da Comissão de 11 de março de 2013 que substitui o anexo I do Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere a aditamentos e alterações respeitantes aos produtos abrangidos por esse anexo.

Regulamento (UE) n.º 750/2010 da Comissão de 7 de Julho de 2010 que altera os anexos II e III do Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos limites máximos de resíduos de determinados pesticidas no interior e à superfície de certos produtos.

Ritter L., Goushreff N. C. I., Arbuckle T., Cole D., Raizenne M. (2006). Addressing the linkage between exposure to pesticides and human Health effects - research trends and priorities for research. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, **9**, 441-456.

Safe S. H. (2004). Endocrine disruptors and human health: is there a problem? An Update. *Toxicology*, **108**, 487-493.

Sahid I. B., Teoh S. S. (1994). Persistence of Terbutylazine in Soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **52**, 226-230.

Saito K., Tomigahara Y., Ohe N., Isobe N., Nakatsuka I., Kaneko H. (2000). Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms. *Toxicological Sciences*, **57**, 54-60.

Sanlaville Y., Guittonneau S., Mansour M., Feicht E. A., Meallier P., Kettrup A. (1996). Photosensitized Degradation Of Terbutylazine In Water. *Chemosphere*, **33**, 353-362.

Sarabia L., Maurer I., Bustos-Obregon E. (2009). Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 663-668.

Settle R. F. (1983). Evaluating the economic benefits of pesticide usage. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **9**, 173-185.

Sharma D., Nagpal A., Pakade Y. B., Katnoria J. K. (2010). Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A Review. *Talanta*, **82**, 1077-1089.

Simões J. S. (2005). Utilização de produtos fitofarmacêuticos na agricultura. Agricultura e Ambiente, Sociedade Portuguesa de Inovação, Acedido através do site: http://www2.spi.pt/agroambiente/docs/Manual_II.pdf, último acesso a 27 de Dezembro de 2014.

- Soderlund D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Review. *Archives of Toxicology*, **86**, 165-181.
- Soderlund D. M., Clark J. M., Sheets L. P., Mullin L. S., Piccirillo V. J., Sargent D., Stevens J. T., Weiner M. L. (2002). Mechanisms of Pyrethroid Neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. **171**, 3-59.
- Steffensen M. B. (2004). Methods for the Synthesis of Compositionally Diverse Dendrimers Using Chemoselective Routes. Texas A&M University, College Station, Texas, 22-61.
- Tadeo J. L. (2008). Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples. CRC Press, Taylor e Francis Group, New York, 1-34.
- Tatebayashi H., Narahashi T. (1994). Differential mechanism of action of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxinsensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **270**, 595-603.
- Tomlin C. D. S. (2000). The pesticide manual, a world compendium. 12.º Ed., BCPC, British Crop Protection Council, Farnham, 1250.
- Tsatsakis A. M., Aguridakis P., Michalodimitrakis M. N., Tsakalov A. K., Alegakis A. K., Koumantakis., Troulakis G. (1996). Experiences with acute organophosphate poisonings in Crete. *Veterinary and Human Toxicology*, **38**, 101-107.
- Vais H., Williamson M. S., Devonshire A. L., Usherwood P. N. (2001). The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Management Science*, **57**, 877-888.
- Vigna C. R. M., Morais L. S. R., Collins C. H., Jardim I. C. S. F., (2006). Poly(Methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. *Journal of Chromatography A*, **1114**, 211-215.
- Wagner E. D., McMillan S. M., Plewa M. J. (2005). Cytotoxicity of Organophosphorus Ester (OP) Insecticides and Cytotoxic Synergism of 2-Acetoxyacetylaminofluorene (2AAAF) in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **75**, 329-334.
- Wang A., Costello S., Cockburn M., Zhang X., Bronstein J., Ritz B. (2011). Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *European Journal of Epidemiology*, **26**, 547-555.
- Wang L. G., Liang Y. C., Jiang X. (2008). Analysis of eight organophosphorus pesticide residues in fresh vegetables retailed in agricultural product markets of Nanjing, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **81**, 377-382.
- WHO. (1986). Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. EHC 63. Geneva. Acedido através do site: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>, último acesso a 6 de Fevereiro de 2015.
- WHO. (1988). Dimethoate: health and safety guide. Geneva: World Health Organization. Acedido através do site: <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg020.htm>, último acesso a 4 de Janeiro de 2015.

WHO. (1990). Environmental Health Criteria 97 – Deltamethrin. Geneva: International Programme on Chemical Safety – IPCS. Acedido através do site: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm>, último acesso a 12 de Março de 2015.

WHO. (1998). Terbutylazine (TBA) in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization, Geneva. Acedido através do site: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/terbutylazine.pdf, último acesso a 24 de Dezembro de 2014.

WHO. (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Germany, 1-12.

WHO. (2014). WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides Deltamethrin, 1-101. Acedido através do site: http://www.who.int/whopes/quality/Deltamethrin_eval_specs_WHO_May_2014.pdf?ua=1, último acesso a 24 de Novembro 2014.

WHO. (2015). WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides Dimethoate, 1-33. Acedido através do site: http://www.who.int/whopes/quality/en/Dimethoate_eval_specs_WHO_June_2012.pdf?ua=1, último acesso a 16 de Março de 2015.

Yeh S. P., Sung T. G., Chang C. C., Cheng W., Kuo C. M. (2005). Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture*, **243**, 383-392.

II.Azeite

2.1.Introdução	46
2.2.Resenha Histórica	46
2.3.A Oliveira, a Azeitona e o Azeite	48
2.4.Composição Química do Azeite	55
2.5.O Azeite e a Saúde	56
2.6. Possível Contaminação do Azeite com Produtos Agrotóxicos	58
2.7. Referências Bibliográficas	61

2.1.Introdução

O azeite é considerado um alimento antigo, clássico da culinária contemporânea, de uso regular na dieta mediterrânica, conferindo à comida um sabor e aroma peculiares.

Para além da elevada importância nutricional que este produto apresenta, o azeite possui ainda um grande valor sociocultural e económico, pelo que atualmente a sua produção constitui, em muitas regiões e principalmente nos países da bacia do Mediterrâneo, um importante suporte da atividade económica (Kandyliis *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, tem vindo a assistir-se a uma crescente procura deste produto alimentar, a qual tem sido essencialmente motivada pelos inúmeros efeitos benéficos associados ao consumo de azeite para a saúde dos consumidores, aliada a outros aspetos relevantes, tais como as suas excecionais qualidades gastronómicas, bem como, a importância económica que a sua produção representa. A produção internacional de azeite tem vindo a dinamizar-se devido ao enorme aumento na área de plantação de olival, não só nos países tradicionalmente produtores, mas também em países onde a cultura do olival não se encontrava até então enraizada (Luchetti, 2002).

Atualmente, pode afirmar-se que o azeite foi “redescoberto” tendo-se convertido num dos pilares da cozinha moderna e saudável.

Neste capítulo da tese são abordados, de um modo geral, os aspetos mais relevantes acerca da matriz alimentar azeite, sendo tratados alguns temas que mostram a importância do azeite e que justificam o facto de ter sido selecionado como produto alvo do presente estudo.

2.2.Resenha Histórica

Uma possível afirmação de que a oliveira teve a sua origem na Europa pode ser explicada através do mito grego alusivo à luta entre Poseidon e Atena para o controlo de Atenas. De acordo com a antiga história grega, Poseidon, deus do mar, e Atena, deusa da paz e da sabedoria, discutiram ferozmente sobre o nome que deveria ser atribuído à cidade recém-construída na terra de Attica. Com o objetivo de por fim a essa discórdia, foi decidido que seria atribuído à cidade o nome de quem oferecesse o presente mais precioso aos cidadãos. Poseidon bateu com o seu tridente sobre uma

rocha e começou a fluir água de nascente e por sua vez, Athena atingiu o chão com a sua lança e esta transformou-se numa oliveira. Foi então decidido que a oliveira era mais valiosa para o povo de Attica, e a cidade recebeu o nome de Atenas em honra de Atena (Kiritsakis, 1992).

A oliveira, símbolo da imortalidade, é considerada a árvore mais antiga cultivada pelo homem. A sua origem continua até aos dias de hoje desconhecida, contudo a sua história coincide e funde-se com a expansão das civilizações do Mediterrâneo, que durante séculos governaram o destino da humanidade. Existem relatos que sugerem que as oliveiras surgiram em tempos pré-históricos no sul da Ásia Menor, onde hoje existem abundantes florestas de oliveiras selvagens, tendo posteriormente difundindo-se a partir da Síria para a Grécia através da Anatólia (Luchetti, 2002). Outras teorias também historicamente aceites defendem que esta é proveniente da Síria, do Líbano ou mesmo de Israel, por fim existem ainda defensores de que é originária do Baixo Egito ou da Etiópia (Böhm, 2013).

A domesticação e cultivo da oliveira para a obtenção de azeitonas, que por sua vez eram já nesse tempo esmagadas com o intuito de obter azeite, teve início nas épocas do paleolítico e neolítico, muito possivelmente na zona do Médio Oriente conhecida como o “Crescente Fértil” da Mesopotâmia (Percussi, 2006). Esta cultura foi depois difundida para o Egito, e posteriormente às ilhas da Ásia Menor e à Grécia continental, mais tarde espalhou-se pela Assíria e propagou-se por toda a bacia do Mediterrâneo (Böhm, 2013).

A expansão do azeite ao longo do Mediterrâneo Ocidental é atribuída aos Fenícios que o levaram para o Norte de África e Sul de Espanha e ainda aos Gregos, que o transportaram para Itália (Luchetti, 2002).

Em Portugal, a cultura da Oliveira perde-se nos mais remotos tempos. Segundo relatos antigos, os Visigodos já a deviam ter herdado dos Romanos e estes, possivelmente, tinham-na encontrado na Península Ibérica. Posteriormente, os Árabes mantiveram a cultura e fizeram-na prosperar, sendo que a palavra Azeite tem origem no vocábulo árabe az-zait, que significa “sumo de azeitona” (Böhm, 2013).

Os primeiros documentos sobre olivicultura remontam ao século XII, os quais relatam que Coimbra, Santarém, Beja e Torres Novas já possuíam nas suas terras plantações de oliveiras e lagares de azeite, sendo estes de relevante importância para o comércio. A partir do século XIII, o azeite era já um dos principais produtos de exportação, por exemplo para a Inglaterra, no reinado de Henrique II. Ao longo da evolução da história do condado portugalense existem ainda muitas mais alusões tanto ao olival como à produção de azeite, sugerindo que desde muito cedo, o comércio de azeite encontrava-se regulamentado, tal como comprovam vários alvarás referentes às taxas de direitos de plantação, passagem, comercialização e sobretudo de exportação. Mais tarde, já no século XVI, na época dos descobrimentos, com as expedições marítimas dos portugueses e espanhóis, a oliveira e consequentemente a produção de azeite acabou por ser propagada um pouco por todo o mundo (Böhm, 2013).

A partir de 1986, com a entrada de Portugal na Comunidade Europeia, os olivais nacionais são reconvertidos, sofrendo alguma modernização, face à escassez de mão-de-obra a que se assistia no momento. Por sua vez, já no final do século XX Portugal passou a dispor de ajudas comunitárias o que permitiu plantar milhares de novos hectares de olival e consequentemente produzir quantidades bastante consideráveis de azeite (Gouveia *et al.*, 2002). No início do século XXI, sensivelmente a partir de 2005, Portugal assistiu a um acréscimo bastante significativo da área de olival cultivada, fundamentalmente com grande incidência na região do Alentejo, fruto de grandes investimentos em novos olivais sobretudo do tipo intensivo e super-intensivo.

2.3.A Oliveira, a Azeitona e o Azeite

A origem da oliveira, embora perdida no tempo, coincidiu e difundiu-se com a expansão das civilizações do Mediterrâneo que durante séculos governaram o rumo da humanidade e deixaram uma marca bem vincada na cultura ocidental. Ao longo do tempo, a partir do leste da bacia mediterrânica as oliveiras foram disseminadas para o oeste por toda a área do Mediterrâneo, assim como para a Grécia, Itália, Espanha, Portugal e França (Winifred, 1967).

A oliveira é uma espécie emblemática que representa uma das fruteiras mais importantes da bacia do Mediterrâneo (Loumou e Giourga, 2003). Na sua forma cultivada destina-se à produção de azeitonas, quer sejam para a produção de azeite quer

sejam para a obtenção de azeitona de mesa. Quanto à sua taxonomia e classificação botânica, pertence ao reino Plantae, classe Magnoliopsida, subclasse VI Asteridae, ordem Scrophulariales, família Oleaceae, à subfamília Oleoideae, tribo Oleaceae, gênero *Olea* L., espécie *Olea europaea* L. e subespécie *Olea europaea sativa* L. ou somente *Olea europaea* subsp. *europaea* (Bartolini e Petruccelli, 2002).

Atualmente, existem mais de 2000 cultivares na bacia do Mediterrâneo que exibem uma enorme diversidade, se se considerar a morfologia das próprias plantas, folhas, flores, frutos e ainda do caroço, uma vez que esta estrutura, assim como a camada externa de exina do grão de pólen, dão um contributo fundamental para a caracterização morfológica das cultivares de oliveira, permitindo a sua distinção, visto cada uma delas possuir uma assinatura única (Ganino *et al.*, 2006). Esta grande variedade genética resultou do constante melhoramento por multiplicação das melhores cultivares ao longo do tempo e da posterior migração de material vegetativo, pertencente a plantas cultivadas em zonas culturalmente avançadas. Por sua vez, a seleção das características desejadas, juntamente com a polinização cruzada interespecífica, melhoraram significativamente a qualidade das azeitonas obtidas (Böhm, 2013).

A cultura do olival é bastante versátil, uma vez que a oliveira é uma planta xerófita que se adapta a condições ambientais extremas, como a seca e temperaturas elevadas, requer preferencialmente solos arejados, embora se adapte com alguma facilidade a outros tipos de solos e resista, ainda, a temperaturas inferiores a 0 °C (Barranco *et al.*, 2008). Em termos botânicos, é uma árvore de porte médio, que pode atingir até cerca de 20 metros de altura e as suas raízes até 6 metros, permitindo que explorem uma grande porção do solo o que as torna bastante resistentes (Casa do Azeite, 2015). As suas folhas são estreitas, pontiagudas, simples, apresentam uma coloração verde-escura na página superior e prateada na inferior e são folhas persistentes, tratando-se assim, de uma planta perene que apresenta um crescimento lento, no entanto relativamente constante ao longo de todo o ano. Dependendo da área geográfica em que se encontra distribuída, a floração dá-se entre o fim de Abril e o princípio de Junho, sendo que em cada inflorescência encontram-se entre 10 a 40 flores, de cor branca ou amarelada, e hermafroditas, podendo, porém, ser funcionalmente monossexuadas. Após a polinização das flores formam-se os frutos, a azeitona, que em

média é fundamentalmente constituída por água (50 %), azeite (22 %), açúcar (19 %), celulose (5,8 %) e proteínas (1,6 %), sendo que as suas características qualitativas, quantitativas e organoléticas são bastante variáveis dependendo do tipo de cultivar (Barranco *et al.*, 2008; Chiappetta e Muzzalupa, 2012).

O azeite que se encontra presente na composição da azeitona não é mais do que uma gordura que é sintetizada naturalmente por estes frutos e que funciona como substância de reserva, contribuindo para assegurar a proliferação da espécie, isto é, em termos biológicos permite a disponibilidade de energia necessária durante o período em que a azeitona permanece no solo até germinar e dar origem a uma nova planta (Casa do Azeite, 2015).

O produto que é obtido a partir do fruto da azeitona, denominado de azeite, é produzido desde tempos imemoriais. Ao longo dos tempos, o processo de extração do azeite tem vindo a ser alvo de sucessivos e constantes aperfeiçoamentos tecnológicos, no sentido de se obter uma maior eficácia na separação do mosto oleoso do restante fruto (Gouveia *et al.*, 2002).

Em termos de obtenção e produção, o azeite é extraído recorrendo meramente a processos mecânicos que não alterem o azeite, não sofrendo durante a sua extração quaisquer tratamentos além da lavagem da azeitona, decantação, centrifugação e filtração (sem recurso a qualquer agente químico) (COI, 2014).

De um modo genérico, o processo de produção de azeite envolve fundamentalmente cinco etapas (Figura 8), tais como a apanha e o transporte das azeitonas para o lagar, algumas operações preliminares (limpeza, lavagem e pesagem dos frutos), a moenda da azeitona (preparação da pasta) e a extração do azeite. A apanha da azeitona pode realizar-se manualmente, recorrendo a varas largas e flexíveis e, mais modernamente, utilizando meios mecânicos de vibração da árvore. De seguida, as azeitonas são transportadas para o lagar onde são laboradas, porém deve salientar-se que as azeitonas apanhadas do solo não devem ser transportadas juntamente com as que são colhidas da árvore e que o transporte deve ser feito em caixas rígidas abertas, a fim de evitar fermentações indesejáveis. Ao entrar no lagar as azeitonas devem ser classificadas em função da sua variedade, proveniência do solo ou da árvore e se estão sãs ou atacadas por agentes patogénicos, com a finalidade de serem laboradas

separadamente consoante a respetiva classe. Posteriormente, as azeitonas são sujeitas a um mecanismo de ventilação com corrente de ar para separar as folhas que as acompanham e, em seguida, se necessário, são lavadas com água corrente. Para se obter um azeite de qualidade, as azeitonas não devem ser armazenadas mais do que 24 horas após a colheita. O processo de produção do azeite propriamente dito, inicia-se com a moenda, que consiste na trituração da azeitona, até formar uma pasta, a qual é subsequentemente batida e aquecida, de modo a aumentar o rendimento de extração, facilitando a separação da fase sólida (bagaço) das fases líquidas (azeite e água russa) (Ramon, 2003; Firestone, 2005; Boskou, 2009), como ilustrado na figura 8.

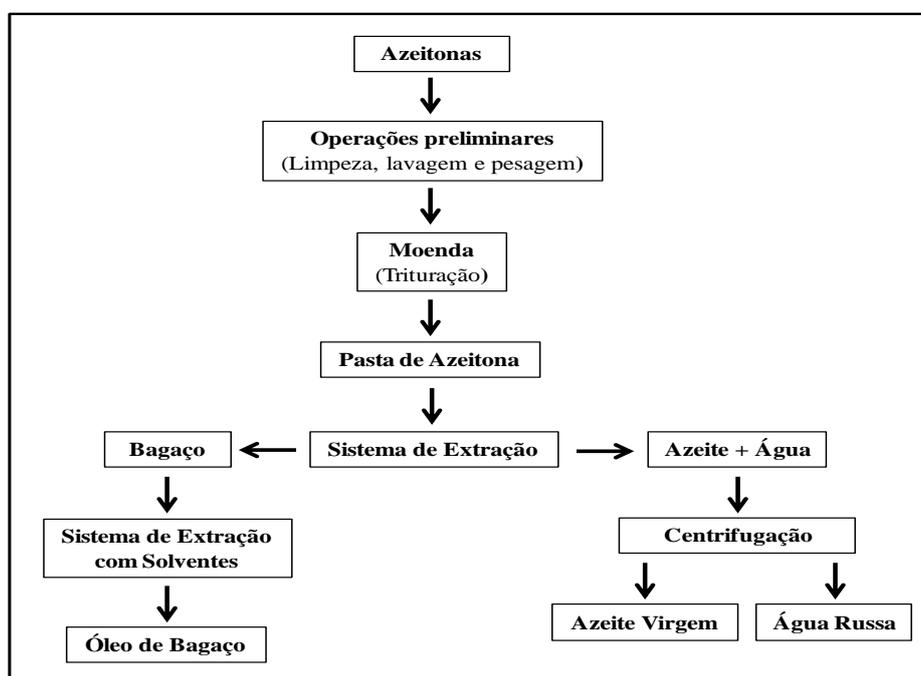


Figura 8. Representação esquemática das diferentes etapas usadas durante o processo usualmente utilizado para a obtenção de azeite (adaptado de Firestone, 2005).

A operação de extração do azeite é sobretudo realizada pelos sistemas de pressão (clássico) ou por centrifugação (contínuo). No sistema clássico, a massa é submetida a elevadas pressões para separar o mosto oleoso, de seguida, por diferença de densidades, o óleo e o mosto obtidos são separados por decantação (Firestone, 2005). No caso da extração a nível industrial, recorre-se a um sistema contínuo que pode ser de duas ou três fases. Em particular, no sistema de três fases adiciona-se uma grande quantidade de água à pasta de azeitona (10-100 L/ 100 Kg de pasta) e por centrifugação (centrifugadora horizontal) é separada a parte sólida do restante mosto oleoso, o qual

por sua vez passa por uma centrifugadora vertical, onde se separa o azeite da água russa. Contudo, o processo de adição de água afeta a distribuição dos compostos fenólicos entre o óleo e a fase aquosa, favorecendo a sua migração para esta última fase, pelo que diminui a qualidade do azeite. Aponta-se ainda a este sistema uma maior produção de águas russas, efluente líquido do lagar, que pode constituir um problema ambiental e acarreta custos adicionais para o seu tratamento. No sistema de duas fases, o procedimento de extração é semelhante ao anterior, contudo não se adiciona água à pasta de azeitona, sendo que a água existente no sistema sai juntamente com a fase sólida. Este sistema tem a vantagem, em relação ao sistema de três fases, de produzir azeites com superiores teores em antioxidantes naturais como, por exemplo, os polifenóis (Godoy-Caballero *et al.*, 2014) e gerar menores quantidades de efluentes.

Deste modo, o azeite é um dos poucos óleos de origem vegetal que pode ser consumido logo após a sua extração, sem ser sujeito a qualquer tratamento de refinação, desde que possua uma qualidade adequada ao seu consumo (Böhm, 2013).

É de salientar que, atendendo às inúmeras etapas envolvidas na produção do azeite, as quais englobam operações mais preliminares, tais como a produção da azeitona, as operações de colheita, o transporte e a limpeza das azeitonas e, posteriormente, a sua extração assim como a etapa final de armazenamento do azeite, a sua qualidade depende indubitavelmente da globalidade de todos estes fatores. Assim, a qualidade do produto final poderá ficar irremediavelmente comprometida, caso não seja assegurado o estrito cumprimento de todas as normas, quer as que estão mais relacionadas com a produção e apanha da azeitona, quer as que se relacionam com as etapas posteriores de extração e armazenamento.

Os azeites são classificados em diferentes categorias com base em diferentes parâmetros objetivos e quantificáveis, os quais incluem a determinação de vários parâmetros físico-químicos específicos, tais como a acidez, o índice de peróxidos, os coeficientes de extinção específica K_{232} , K_{270} e ΔK e o teor em ceras, complementados com a realização de provas sensoriais. Assim, atendendo aos valores dos parâmetros referidos anteriormente, os azeites classificam-se em: Azeite Virgem Extra, Azeite Virgem, Azeite Lampante, Azeite Refinado e ainda algumas misturas de azeites de qualidade superior com azeites refinados (Regulamento (UE) n.º 1348/2013). Na tabela

5 encontram-se sumarizados os atributos identificados durante as provas sensoriais e as principais características físico-químicas das diferentes categorias de azeites comerciais.

Tabela 5. Classificação do azeite com base na análise sensorial e alguns parâmetros químicos da qualidade.

Categoria de Azeite	M.D.¹	M.F.²	Acidez (%)	I.P.³ (mEq O₂/Kg)	K₂₃₂	K₂₇₀	ΔK	Ceras (mgKg⁻¹)
Azeite Virgem Extra	= 0	> 0	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,5	≤ 0,22	≤ 0,01	≤ 150
Azeite Virgem	≤ 3,5	> 0	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,6	≤ 0,25	≤ 0,01	≤ 150
Azeite Lampante	> 3,5 ⁴	-	> 2,0	-	-	-	-	≤ 300 ⁵
Azeite Refinado	-	-	≤ 0,3	≤ 5	-	≤ 1,10	≤ 0,16	≤ 350
Misturas de A. Refinados e A. Virgens	-	-	≤ 1,0	≤ 15	-	≤ 0,90	≤ 0,15	≤ 350

¹Mediana de defeitos; ²Mediana de frutados; ³Índice de peróxidos; ⁴Ou quando a mediana dos defeitos for superior a 3,5 ou a mediana dos defeitos for inferior ou igual a 3,5 e a mediana do frutado igual a 0. ⁵Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mgkg⁻¹ e 350 mgkg⁻¹ são considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mgkg⁻¹ ou se a percentagem de eritrodíol e uvaol for inferior ou igual a 3,5 % (Adaptado do Regulamento (UE) n.º 1348/2013).

É de referir que a análise sensorial constitui uma ferramenta crucial na avaliação da qualidade dos azeites virgens uma vez que através da perceção dos seus atributos sensoriais (negativos/ defeitos e positivos) possibilita a classificação do azeite nas diferentes categorias comerciais. Obviamente que os atributos sensoriais estão dependentes de uma enorme diversidade de fatores, nomeadamente as condições climáticas ao longo da maturação da azeitona, o período da colheita e a maturação do fruto, a existência de pragas e doenças, o manuseamento da azeitona durante a colheita e o seu armazenamento, bem como das condições durante a extração e armazenamento do azeite (Aparicio *et al.*, 1994). Para a realização da análise sensorial deverá recorrer-se a um painel de provadores treinado e reconhecido pelo COI e a prova deverá obedecer às

condições específicas requeridas no Regulamento Europeu (Regulamento (UE) 1348/2013), elaborado atendendo à regulamentação do COI.

Por último, a rotulagem do azeite obedece a requisitos legais devidamente definidos pelo que o rótulo apresenta, de um modo geral, os valores da acidez, do índice de peróxidos, dos coeficientes de extinção específica (K_{232} , K_{270} e ΔK) e do teor em ceras. Adicionalmente, para alguns mercados internacionais é ainda obrigatória a inclusão da informação nutricional, a qual abrange o teor calórico, em lípidos totais, composição em ácidos gordos, proteínas, açúcares, sal e fibras (Casal *et al.*, 2014).

Atualmente existem várias regiões que beneficiam do estatuto de denominação de origem protegida (DOP) permitindo a produção de azeites DOP. Por conseguinte, a origem destes azeites pode ser perfeitamente atribuída a uma área geográfica delimitada, com solos e clima característicos, sendo que estes azeites são elaborados com azeitonas de variedades específicas, pelo que a conjugação destes fatores, aliada às condições de apanha e transporte para o lagar, bem como às condições de produção conferem a este produto características químicas e sensoriais específicas. Em Portugal existem seis denominações de origem protegidas para os azeites- os Azeites de Moura, Azeites do Norte Alentejano, Azeites do Alentejo Interior, Azeites de Trás-os-Montes, Azeites do Ribatejo e Azeites da Beira Interior (Gouveia *et al.*, 2002; Casa do Azeite, 2014).

Em Portugal, a olivicultura desempenha um papel fundamental tanto a nível económico como a nível social, uma vez que a cultura do olival encontra-se atualmente distribuída por todo o território nacional ocupando uma vasta área que ronda sensivelmente os 335 841 hectares. Concretamente, este tipo de cultura está presente em cerca de 40 % das explorações agrícolas e ocupa quase metade da superfície destinada às culturas permanentes. De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), relativamente às estatísticas agrícolas referentes ao período 2011 - 2013, a produção de azeitonas destinadas à obtenção de azeite variou entre 510733 a 634209 toneladas em Portugal. Tendo por base a mesma fonte, verificou-se que o ano agrícola de 2012/ 2013 saldou-se por aumentos de produção das principais culturas agrícolas, nomeadamente na produção de azeite, que atingiu o nível mais elevado dos últimos cinquenta anos, com uma produção de 999,9 mil hectolitros (INE, 2013). Segundo dados oficiais, da produção total de azeite, a nível nacional, a principal região produtora

é o Alentejo (71,6 %), seguindo-se o norte (15,2 %) e a região centro do país (7,7 %) (SIAZ, 2014).

Nos últimos anos, a olivicultura tem sofrido grandes mudanças, destacando-se a adoção de novos compassos de plantação, a utilização de novas cultivares, a implementação de rega, o aparecimento de máquinas de colheita mecânica de azeitona e, em paralelo com a intensificação da produção, tem-se assistido a um aumento da utilização de pesticidas.

2.4.Composição Química do Azeite

A composição química do azeite depende de uma complexidade de fatores como a(s) cultivar(es) utilizada(s), a zona de produção (latitude, clima), as técnicas agronómicas e de produção, e a época de colheita das azeitonas, bem como de todos os fatores que interferem com todo o processo de fabrico, isto é, desde a produção da azeitona até à obtenção do produto final (Aparicio *et al.*, 1994).

Do ponto de vista químico, e de um modo geral, os componentes do azeite podem dividir-se fundamentalmente em duas frações distintas, a fração saponificável (que permite a formação de sabões) e a insaponificável (solúvel em água) (Barranco, 2004). A primeira fração, também denominada de fração maioritária, constitui cerca de 98,5 a 99,5 % do peso total do azeite, e é basicamente composta por triacilglicéris, por uma pequena fração de outros glicéridos (mono e diglicéridos) e ainda por ácidos gordos livres, que são responsáveis pela acidez do azeite (Boskou *et al.*, 2006). Genericamente, os ácidos gordos podem ser saturados, monoinsaturados ou polinsaturados, contudo o ácido oleico (monoinsaturado) é o principal ácido gordo que se encontra presente no azeite, representando 53 a 83 % dos ácidos gordos totais (Boskou, 2009). Apesar do azeite apresentar um perfil de ácidos gordos característico, onde predomina o ácido oleico, encontram-se também presentes, em quantidades significativas, o ácido palmítico, o ácido palmitoleico, o ácido esteárico e o ácido linoleico. O facto de o azeite virgem apresentar como componente maioritário dos ácidos gordos o ácido oleico, faz com que ocupe uma posição impar, relativamente aos outros óleos vegetais, uma vez que este ácido é menos suscetível à oxidação do que os ácidos linoleico e linolénico (Boskou, 2009).

Por sua vez, a fração insaponificável (minoritária), que compreende apenas uma pequena percentagem da composição total do azeite (0,5-1,5 %), é maioritariamente composta por hidrocarbonetos, tocoferóis, esteróis, álcoois gordos, compostos fenólicos, pigmentos, fosfolípidos, compostos voláteis, diacilgliceróis e ceras (Sánchez *et al.*, 2001; Boskou, 2009). Embora minoritários, estes compostos possuem uma elevada importância, tanto do ponto de vista nutricional, como da qualidade sensorial e da estabilidade deste produto, sendo que esta fração é a principal responsável pelo valor biológico e nutricional do azeite, pelas suas características organolépticas e, ainda, pela sua resistência à oxidação. Dada a sua elevada especificidade, os componentes minoritários são frequentemente usados como marcadores dos vários critérios de qualidade e até mesmo da autenticidade do azeite (Boskou, 2009).

2.5.O Azeite e a Saúde

Na literatura, encontra-se amplamente referenciada a contribuição da dieta mediterrânica, caracterizada por uma elevada ingestão de frutas, legumes, frutos secos, azeite, peixe e um relativamente baixo consumo de gordura saturada (Wahrburg *et al.*, 2002), para uma melhor saúde e qualidade de vida dos indivíduos que a consomem (Tur *et al.*, 2004). Apesar de esta dieta ser característica da maioria dos países da bacia do Mediterrâneo, atualmente em alguns países tem-se verificado um aumento do consumo de produtos de origem animal e de gorduras saturadas. No entanto, o azeite persiste como a principal gordura alimentar nesta região, o que pode explicar a baixa prevalência de doenças cardiovasculares nesses países (Psaltopoulou *et al.*, 2004).

De um modo geral, os benefícios que advêm do consumo de azeite para a saúde estão diretamente relacionados com a sua composição química, nomeadamente com o seu teor em ácidos gordos, em particular pela elevada percentagem de ácido oleico e também pela presença de compostos com atividade antioxidante, nomeadamente compostos fenólicos, tocoferóis e pigmentos (Visioli e Galli, 1998; Owen *et al.*, 2000; García-González *et al.*, 2008; Schwingshackl e Hoffmann, 2014). Consequentemente, o azeite, devido à sua composição química, assume uma posição privilegiada e de destaque entre todos os óleos e gorduras comestíveis.

Assim, uma alimentação rica em azeite tem elevados benefícios para a saúde humana, principalmente devido à presença de ácido oleico na sua composição, visto

tratar-se da principal gordura monoinsaturada (MUFA) existente no azeite (Psaltopoulou *et al.*, 2004). Além disso, o ácido oleico desempenha também a ação de reduzir o risco de vários tipos de câncros, incluindo o cancro da mama, do ovário, e os carcinomas gástricos (Menendez e Lupu, 2006). Por sua vez, Machowetz e seus colaboradores (Machowetz *et al.*, 2007), estabeleceram várias associações entre o consumo elevado de azeite e a diminuição do risco de cancro da mama, cólon, reto, oral, faringe, laringe e ainda do esôfago. Para além destes benefícios para a saúde, alguns estudos que comparam diferentes níveis de consumo de azeite evidenciaram que a presença deste composto diminui o risco de incidência de doenças cardiovasculares e coronárias, reduz ainda a pressão arterial e previne problemas de aterosclerose (Psaltopoulou *et al.*, 2004; López-Miranda *et al.*, 2010).

Atualmente, existem também vários estudos que demonstram que a substituição da gordura saturada, da dieta, por gordura monoinsaturada contribui para a diminuição dos níveis de colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade ou vulgarmente designado de “mau colesterol”) e aumento dos níveis de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidade ou “bom colesterol”) no plasma sanguíneo (Huang e Sumpio, 2008).

O Azeite, pelo seu alto teor em ácidos gordos monoinsaturados, é também aconselhado a doentes que sofram da doença de diabetes, visto que influencia positivamente os valores de açúcar e gordura no sangue (López-Miranda *et al.*, 2010).

Outra das propriedades biológicas dos azeites está relacionada com a presença de compostos antioxidantes, tais como fenóis, tocoferóis e pigmentos. De entre os compostos fenólicos são de destacar os ácidos cafeico, tirosol e hidroxitirosol, assim como outros compostos mais complexos, dos quais se destacam a oleuropeína, os secoiridóides e as lignanas (Fabiani *et al.*, 2006). Para além do facto dos compostos fenólicos estarem estritamente relacionados com a estabilidade do azeite, sendo os principais responsáveis pela resistência do azeite à auto-oxidação e à foto-oxidação, e possuírem um papel bastante importante para a manutenção das suas características organolépticas até ao fim do prazo de validade, estes compostos são ainda considerados como os principais compostos com atividade antioxidante permitindo reduzir os efeitos potencialmente nocivos dos radicais livres responsáveis pelo envelhecimento celular, prevenindo os efeitos prejudiciais da idade sobre as funções cerebrais e o envelhecimento dos tecidos e órgãos em geral (Machowetz *et al.*, 2007).

Numa recente revisão bibliográfica é referida a sua ação em diversos parâmetros fisiológicos, nomeadamente nas lipoproteínas do plasma, no stress oxidativo, na atividade antimicrobiana e ainda na formação óssea, ao favorecer a mineralização, estimulando o crescimento e favorecendo a absorção do cálcio. Por sua vez, os efeitos protetores dos compostos fenólicos do azeite podem ainda explicar algumas das diferenças na incidência de cancro entre as populações do Mediterrâneo e outras populações do mundo. Nesta compilação são também mencionados os efeitos anti-inflamatórios destes compostos o que complementado com outras propriedades biológicas anteriormente referidas pode ainda explicar a baixa taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares degenerativas e certos tipos de cancro em populações que residem na região do Mediterrâneo (Cicerale *et al.*, 2010).

Os tocoferóis são importantes devido ao seu valor nutricional e às suas propriedades antioxidantes uma vez que protegem os componentes lipídicos presentes no azeite de fenómenos de oxidação. O α -tocoferol, que corresponde a cerca de 95 % dos tocoferóis totais do azeite virgem, é considerado como o antioxidante mais importante. Estes compostos são associados à ação preventiva contra as espécies reativas de oxigénio (radicais livres) em sistemas biológicos, tais como plasma, membranas e tecidos (Boskou, 2009).

Os carotenóides têm um papel importante no grau de oxidação de alimentos processados, devido às suas propriedades antioxidantes. Estes compostos em conjunto com os tocoferóis e os compostos fenólicos contribuem para a estabilidade oxidativa do azeite e têm um efeito antioxidante sinérgico (Boskou, 2009).

2.6. Possível Contaminação do Azeite com Pesticidas

A fim de suprimir as necessidades de produção a nível mundial tem vindo a verificar-se uma progressiva evolução do cultivo tradicional do olival para uma produção moderna, através da plantação de olival em regime intensivo e super-intensivo (Proietti *et al.*, 2012). Contudo, usualmente, neste tipo de sistemas de produção, recorre-se a uma abundante utilização de pesticidas de forma a garantir uma alta produtividade.

Apesar das evidentes vantagens que a utilização dos produtos agroquímicos oferecem para a melhoria do rendimento e qualidade da produção, a eventual

persistência deste tipo de compostos químicos ao longo de todo o processo de produção e a sua subsequente transferência para o azeite representa, devido aos inerentes efeitos tóxicos associados à sua ingestão, um enorme risco para a saúde dos consumidores (Bakas *et al.*, 2012).

Estudos recentes evidenciaram que a presença de resíduos de pesticidas em alimentos, até mesmo quando estes se encontram presentes em quantidades vestigiais, pode acarretar sérios danos para a saúde humana (Sharma *et al.*, 2010; Fenik *et al.*, 2011). Assim, tornou-se imperativo a imposição, por parte de autoridades competentes, de limites legais para a presença destes compostos em diversos produtos alimentares, as quais culminaram na implementação de diretrizes regulamentares que estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) por tipo de alimento (Garcia *et al.*, 2011). Em concreto, nas diretrizes europeias que regulamentam a presença de pesticidas em azeitonas destinadas à produção de azeite encontram-se estabelecidos os LMR para diversos pesticidas, nomeadamente para o dimetoato (2 mg Kg^{-1}) (Regulamento (CE) n.º 1097/2009), a deltametrina (1 mg Kg^{-1}) (Regulamento (CE) n.º 839/2008) e a terbutilazina ($0,05 \text{ mg Kg}^{-1}$) (Regulamento (CE) n.º 149/2008), pesticidas que constituem o alvo do presente estudo.

Ciente dos efeitos nefastos para a saúde dos consumidores associados à ingestão de produtos alimentares contaminados com pesticidas, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) promoveu em 2012 um estudo sobre o controlo de resíduos de pesticidas num total de doze matrizes alimentares de origem vegetal e animal nos países da Comunidade Europeia, Noruega e Islândia (EFSA, 2014). Estes estudos permitiram o cálculo da exposição alimentar a pesticidas por via da ingestão dos alimentos contaminados, bem como o estabelecimento dos riscos associados. Nos 12 tipos de matrizes alimentares analisadas foi controlada a presença de 205 pesticidas diferentes, tendo o estudo evidenciado que 0,9 % das amostras numericamente excedem os LMR (92 no total de 10 235 amostras) sendo que destas, aproximadamente 0,5 % das amostras não cumprem os limites legais estabelecidos, se for tida em conta a incerteza associada à sua determinação. Por outro lado, em 59,9 % das amostras (6 771 amostras) não foram detetados resíduos de pesticidas (isto é, os teores encontram-se abaixo do limite de quantificação), contudo para 39 % das amostras (3 992 amostras) os resíduos de pesticidas apresentam-se dentro dos limites legalmente permitidos. É de salientar

ainda que os resultados evidenciaram que, de entre os 12 produtos alimentares em análise neste estudo, alguns apresentaram taxas que excediam os LMR para determinados pesticidas, nomeadamente bróculos (2,8 % das amostras excedem os LMR), couve-flor (2,2 %), uvas de mesa (1,8 %), pimentão (1,4 %), beringelas (1,0 %), bananas (0,7 %), trigo (0,7 %), ervilhas sem vagem (0,1 %) e azeite (0,1 %), por sua vez nas amostras de sumo de laranja, manteiga e ovos de galinha os teores de pesticidas eram inferiores aos LMR. Em concreto, no caso do azeite das 794 amostras analisadas, não foram detetados resíduos de pesticidas em 619 amostras, porém 175 amostras continham um ou vários pesticidas em concentrações mensuráveis. No total, foram detetados nas amostras de azeite em estudo 26 pesticidas distintos, sendo que os mais frequentemente encontrados foram o clorpirifos e a terbutilazina, os quais foram detetados em 14,1 % e 12,0 % das amostras testadas, respetivamente. Adicionalmente, verificou-se ainda que alguns destes pesticidas encontravam-se presentes em algumas das amostras com teores acima do LMR, sendo de destacar a terbutilazina que foi detetada em 4 amostras de azeite e o fentião presente em 3 amostras. Finalmente, a título de exemplo, o dimetoato foi também detetado em 11 amostras de azeite e a deltametrina em 3 amostras, contudo estes pesticidas estavam presentes em quantidades abaixo dos LMR.

Neste contexto, atendendo aos baixos LMR impostos pela União Europeia, pela Comissão do *Codex Alimentarius* e ainda pela Organização Mundial da Saúde, é fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente fiáveis e sensíveis para a deteção e quantificação de resíduos de pesticidas no azeite (Garcia *et al.*, 2011).

2.7.Referências Bibliográficas

- Aparício R., Ferreiro L., Alonso V. (1994). Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil. *Analytica Chimica Acta*, **292**, 235-241.
- Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istambouliea G., Piletsky S., Piletska E., Ait-Ichoub I., Ait-Addib E., Noguera T., Rouillona R. (2012). Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, **734**, 99-105.
- Barranco D. (2004). Variedades Y Patronos. In: El cultivo del olivo. Mundi-prensa, Córdoba, 65-91.
- Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. (2008). El cultivo del Olivo. 6ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 846.
- Bartolini G., Petruccelli R. (2002). Classification, origin, diffusion and history of the olive. Ed. FAO, Rome, 74.
- Böhm J. (2013). O Grande Livro da Oliveira e do Azeite - Portugal Oleícola. Dinalivro, Portugal, 12-120.
- Boskou D. (2009). Olive Oil. Minor Constituents and Health. CRC Press Taylor e Francis Group, Boca Raton, 629.
- Boskou D., Blekas G., Tsimidou M. (2006). Olive Oil Composition. Olive Oil Chemistry and Technology. 2ª Edición. AOCS Publishing, 41-76.
- Casa do Azeite. (2014). Azeite. Denominação de origem protegida. Acedido através do site: <http://www.casadoazeite.pt/Azeite/Denomina%C3%A7%C3%B5es-de-origem-protegida>, último acesso a 10 de Dezembro de 2014.
- Casa do Azeite. (2015). Azeite- Como se Produz. Acedido através do site: <http://www.casadoazeite.pt/Azeite/Como-se-produz>, último acesso a 26 de Janeiro de 2015.
- Casal S., Rodrigues N., Pereira J. A. (2014). Qualidade do Azeite: Como se mede? Voz do campo. Agrociência. Acedido através do site: http://www.agrociencia.pt/1/upload/1_pag_24_25.pdf, último acesso a 17 de Maio de 2015.
- Chiappetta A., Muzzalupo I. (2012). Botanical Description, Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy, Dr. Innocenzo Muzzalupo (Ed.). InTech, DOI: 10.5772/51836. Acedido através do site: <http://www.intechopen.com/books/olive-germplasm-the-olive-cultivation-table-olive-and-olive-oil-industry-in-italy/botanical-description>, último acesso a 5 de Junho 2015.
- Cicerale S., Lucas L., Keast R. (2010). Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 458-479.
- COI. (2014). International Olive Council. Olive Oil. Acedido através do site: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/83-designations-and-definitions-of-olive-oils>, último acesso a 16 de Janeiro de 2015.

Commission Regulation (EC) n.º 1097/2009 of 16 November 2009, amending Annex II to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for dimethoate, ethephon, fenamiphos, fenarimol, methamidophos, methomyl, omethoate, oxydemeton-methyl, procymidone, thiodicarb and vinclozolin in or on certain products.

Commission Regulation (EC) n.º 839/2008 of 31 July 2008, amending Regulation (EC) n.º 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products.

Commission Regulation (EC) n.º 149/2008 of 29 January 2008, amending Regulation (EC) n.º 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto.

EFSA. (2014). The 2012 European Union Report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, **12**, 3942.

Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P., Servili M., Selvaggini R., Montedoro G., Di Saverio C., Morozzi G. (2006). Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *The Journal of Nutrition*, **136**, 614-619.

Fenik J., Tankiewicz M., Biziuk M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, **30**, 814-826.

Firestone D. (2005). Chapter 7: Olive Oil. In: Shahidi F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. John Wiley & Sons, Inc. volume 2- Edible oil and fat products: edible oils. 303-331.

Ganino T., Bartolini G., Fabbri A. (2006). The classification of olive germoplasm. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **81**, 319-334.

García-González D. L., Aparicio-Ruiz R., Aparicio R. (2008). Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 602-60.

Garcia R., Cabrita M. J., Freitas A. M. C. (2011). Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Pesticide Residues in Food - A Highly Selective and Innovative Approach. *American Journal of Analytical Chemistry*, **2**, 16-25.

Godoy-Caballero M. P., Aceda-Valenzuela M. I., Galeano-Díaz T., Goicoechea H., Calzoni M. J. (2014). Olive Oil: Production and Nutritional Properties. In: Leonardis A. Virgin Olive Oil. Production, Composition, Uses and Benefits for Man. Food and Beverage Consumption and Health. Nova Science Publishers, Inc., New York, 143-163.

Gouveia J. M. B., Saldanha J. L. P., Martins A. S., Sobral V. (2002). O azeite em Portugal. Edições Inapa. Lisboa.

Huang C. L., Sumpio B. (2008). Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. *Journal of the American College of Surgeons*, **207**, 407-416.

INE. (2013). Instituto Nacional de Estatística. Estatísticas Agrícolas 2013. Edição 2014. ISSN 0079-4139.

- Kandyli P., Vekiari A. S., Kanellaki M., Kamoun N. G., Msallem M., Kourkoutas Y. (2011). Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 1333-1341.
- Kiritsakis A. K. (1992). *El aceite de oliva*, Ed. A. Madrid Vicente, Madrid, 306.
- López-Miranda J., Pérez-Jiménez F., Ros E., De Caterina R., Badimón L., Covas M. I., Escrich E., Ordovás J. M., Sorriquer F., Abiá R., Alarcón de la Lastra C., Battino M., Corella D., Chamorro-Quirós J., Delgado-Lista J., Giugliano D., Esposito K., Estruch R., Fernandez-Real J. M., Gaforio J. J., La Vecchia C., Lairon D., López-Segura F., Mata P., Menéndez J. A., Muriana F. J., Osada J., Panagiotakos D. B., Paniagua J. A., Pérez-Martinez P., Perona J., Peinado M. A., Pineda-Priego M., Poulsen H. E., Quiles J. L., Ramírez-Tortosa M. C., Ruano J., Serra-Majem L., Solá R., Solanas M., Solfrizzi V., de la Torre-Fornell R., Trichopoulou A., Uceda M., Villalba-Montoro J. M., Villar-Ortiz J. R., Visioli F., Yiannakouris N. (2010). Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba, (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **20**, 284-294.
- Loumou A., Giourga C. (2003). Olive groves: The life and identity of the Mediterranean. *Agriculture and Human Values*, **20**, 87-95.
- Luchetti F. (2002). Importance and future of olive oil in the world market—an introduction to olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 559-563.
- Machowetz A., Poulsen H., Gruendel S., Weimann A., Fito M., Marrugat J., Torre R., Salonen J., Nyyssonen K., Mursu J., Nascetti S., Gaddi A., Kiesewteter H., Baumler H., Selmi H., Kaikkonen Zunft F., Covas M., Koebnick C. (2007). Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and southern Europeans. *The FASEB Journal*, **21**, 45-52.
- Menendez J., Lupu R. (2006). Mediterranean Dietary Traditions for the Molecular Treatment of Human Cancer: Anti-Oncogenic Actions of the main olive oil's monounsaturated fatty acid oleic acid (18:1n-9). *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **7**, 495-502.
- Owen R. W., Giacosa A., Hull W. E., Haubner R., Würtele G., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*, **1**, 107-112.
- Percussi L. (2006). *Azeite. História, Produtores, Receitas*. Editora Senac São Paulo, Brasil, 228.
- Proietti P., Nasini L., Ilarioni L. (2012). Photosynthetic behavior of Spanish Arbequina and Italian Maurino olive (*Olea europaea* L.) cultivars under super-intensive grove conditions. *Photosynthetica*, **50**, 239-246.
- Psaltopoulou T., Naska A., Orfanos P., Trichopoulos D., Mountokalakis T., Trichopoulou A. (2004). Olive oil, Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 1012-1018.
- Ramon A. J. H. (2003). *Manual del aceite de oliva*. Mundi-prensa, Madrid, 614.
- Regulamento (UE) n.º1348//2013 da comissão de 16 de Dezembro de 2013, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.

- Sánchez J. L., Carretero A. S., Gutiérrez A. F. (2001). Composición del aceite de oliva. In *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario I*. Omega 3 & F. Puleva (Eds.), Granada, 195-224.
- Schwingshackl L., Hoffmann G. (2014). Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids in Health and Disease*, **13**, 154-169.
- Sharma D., Nagpal A., Pakade Y. B., Katnoria J. K. (2010). Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta*, **82**, 1077-1089.
- SIAZ. (2014). Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa. Inquérito aos Lagares de Azeite na Campanha 2013-2014. Acedido através do site: <http://www.gpp.pt/estatistica/SIAZ/SIAZ.AZEITE.2013-14.1.ApresentaResultados.pdf>, último acesso a 13 de Maio de 2015.
- Tur J., Romaguera D., Pons A. (2004). Food consumption patterns in a Mediterranean region: does the Mediterranean diet still exist? *Annals of Nutrition and Metabolism*, **48**, 193-201.
- Visioli F., Galli C. (1998). Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4292-4296.
- Wahrburga U., Kratzb M., Cullenc P. (2002). Mediterranean diet, olive oil and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 698-705.
- Winifred W. (1967). Fray Junipero Serra and the California Conquest. Charles Scribner's Sons, New York, 154-155.

III. Metodologias de Preparação de Amostra: Aplicação na Detecção e Quantificação de Pesticidas no Azeite

3.1. Introdução	66
3.2. Técnicas de Preparação de Amostra	70
3.3. Polímeros Molecularmente Impressos	79
3.3.1. Síntese Química	81
3.3.2. Caracterização Química e Morfológica	90
3.3.3. Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular	92
3.4. Metodologia de Preparação de Amostra Baseada na Utilização de Polímeros Molecularmente Impressos	102
3.4.1. Aplicação como Adsorventes de Extração em Fase Sólida	105
3.4.1.1. Detecção e Quantificação de Pesticidas no Azeite Utilizando a Metodologia MISPE	110
3.5. Referências Bibliográficas	114

3.1.Introdução

A análise quantitativa de um determinado analito envolve a implementação de uma metodologia analítica que, geralmente, engloba uma etapa prévia de preparação de amostra, seguida da detecção e quantificação recorrendo a técnicas analíticas apropriadas. A etapa da preparação de amostra permite, por um lado, a pré-concentração ou isolamento do analito e, por outro lado, a eliminação de interferentes que podem influenciar drasticamente a fiabilidade dos resultados e, até mesmo, danificar o sistema cromatográfico. Idealmente, a etapa de preparação da amostra deverá permitir isolar os compostos a analisar da restante amostra de um modo rápido e eficiente, com perdas mínimas dos analitos e baixo custo de análise (Lambropoulou e Albanis, 2007; Tadeo, 2008). É de salientar que, apesar de, o passo da preparação de amostra constituir uma etapa preliminar reveste-se de enorme relevância, particularmente em amostras muito complexas, uma vez que determinados compostos presentes na amostra podem interferir na quantificação levando à obtenção de resultados erróneos, pelo que a otimização desta etapa torna-se crucial. De seguida, procede-se à detecção e quantificação do analito mediante a utilização de técnicas analíticas que permitam determinar, com rigor e precisão, os teores da substância em estudo (Tadeo, 2008; Gilbert-López *et al.*, 2009; Nollet e Rathore, 2010). Nos últimos anos tem vindo a assistir-se a um crescente desenvolvimento da instrumentação analítica impulsionado, em grande medida, pelos novos desafios colocados à ciência pelo que, atualmente, a comunidade científica dispõe de instrumentos cada vez mais sofisticados, fiáveis, precisos, robustos e expeditos. De entre as técnicas analíticas, a cromatografia assume um papel de destaque dada a sua aplicabilidade na análise de uma enorme diversidade de substâncias químicas numa vasta gama de aplicações.

Como referido anteriormente, em amostras cuja composição química é muito complexa torna-se imperativo que a análise química dos analitos seja precedida por uma etapa prévia de preparação de amostra. Em particular e, atendendo ao objetivo deste trabalho, a pré-concentração ou isolamento dos resíduos de pesticidas em amostras de azeite é uma das etapas mais críticas do processo analítico e, caso não seja corretamente implementada pode comprometer, irremediavelmente, a sua quantificação. Em concreto, o processo extrativo associado a este tipo de amostras encontra-se condicionado por uma grande diversidade de fatores, tais como as quantidades vestigiais em que estes

analitos se encontram presentes na matriz azeite, a complexidade em termos da composição química da matriz, nomeadamente a presença de elevadas quantidades de substâncias com carácter lipídico às quais podem estar ligados os analitos alvo e a dificuldade em extrair os analitos sem extrair simultaneamente compostos polares presentes na amostra. Além da seleção da metodologia de preparação de amostra se encontrar extremamente dependente da natureza e complexidade da amostra, tal como abordado anteriormente, deverá também ser tida em conta a natureza química do analito a analisar, dado que os resíduos de pesticidas bem como os respetivos metabolitos pertencem a diversas classes químicas (García-Reyes *et al.*, 2007; Gilbert-López *et al.*, 2009). Para além de todos estes fatores, a seleção criteriosa da metodologia de preparação de amostra deverá ainda basear-se no método de deteção a utilizar na posterior quantificação do analito (Gilbert-López *et al.*, 2009).

Geralmente, para a determinação de pesticidas em matrizes alimentares recorre-se à cromatografia em fase gasosa (GC), à cromatografia líquida ou à eletroforese capilar, sendo que a escolha de cada uma destas técnicas se encontra condicionada, nomeadamente pela polaridade, volatilidade, e estabilidade térmica dos compostos que se pretendem analisar (Torres *et al.*, 1996; Picó *et al.*, 2004; Juan-Garcia *et al.*, 2005; Robledo e Smyth, 2009; Sharma *et al.*, 2010). Em particular, nos últimos anos, a análise de resíduos de pesticidas em amostras de azeite foi efetuada recorrendo a técnicas de cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC/MS) (Yagié *et al.*, 2005; Guardia-Rubio *et al.*, 2006; Frenich *et al.*, 2007). Mais recentemente, a introdução de pesticidas de natureza química polar levou à intensificação da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detetores que permitem a quantificação com elevada precisão, rigor e reprodutibilidade, tais como os detetores de fotodíodos (DAD) e o espectrómetro de massa (MS) (Hernando *et al.*, 2007; García-Reyes *et al.*, 2007; Gilbert-López *et al.*, 2009). No caso concreto de se recorrer à cromatografia líquida para a deteção e quantificação dos compostos de interesse presentes em matrizes vegetais com elevado teor de gordura, a utilização de técnicas de preparação de amostras eficientes no isolamento dos analitos alvo dos restantes compostos interferentes é considerada extremamente importante para o sucesso do processo analítico. Porém, esta etapa é bastante complicada devido à inerente dificuldade em extrair os analitos alvo sem extrair simultaneamente compostos de natureza polar. Deste modo, a matriz influencia consideravelmente a forma como a

análise é conduzida, bem como a qualidade dos resultados obtidos, pois a eventual presença de compostos interferentes no extrato obtido durante o processo de extração dos analitos alvo (co-extração), podem afetar a exatidão e a precisão do processo analítico, fenómeno vulgarmente designado de efeito de matriz. Mais precisamente, os problemas podem surgir quando as substâncias interferentes competem com os analitos alvo durante o processo de ionização por electrospray, o que conseqüentemente origina a supressão de iões e a diminuição da resposta do analito (Gilbert-López *et al.*, 2009). Em suma, o efeito de matriz pode induzir problemas analíticos sendo que o impacto se repercute nas respostas analíticas e na subsequente quantificação dos analitos.

De um modo geral, em matrizes vegetais com elevado teor de gordura, têm vindo a ser utilizadas diversas técnicas de preparação de amostra, das quais se destacam a Extração Líquido-Líquido (LLE), a Extração com Líquido Supercrítico (SFE), a Extração com Líquido Pressurizado (PLE), a Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), a Extração Assistida por Micro-Ondas (MAE), a Extração em Fase Sólida (SPE), a Dispersão de Matriz em Fase Sólida (MSPD), a Microextração em Fase Sólida (SPME), a Extração Sorptiva com Barras de Agitação (SBSE) e, mais recentemente, foi implementada uma metodologia denominada como “rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro” vulgarmente designada por QuEChERS (García-Reyes *et al.*, 2007; Gilbert-López *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Ao longo dos últimos anos tem vindo a ser estudada a possibilidade de aplicar algumas das técnicas referidas anteriormente na extração de resíduos de pesticidas do azeite, as quais têm vindo a ser utilizadas em separado ou numa forma combinada, na tentativa de obter técnicas de preparação de amostra com elevada capacidade extrativa com perdas mínimas de analito, de modo expedito e menos dispendioso. Dada a relevância das técnicas de preparação de amostra, estas serão abordadas em detalhe na secção 3.2., realçando-se aquelas que foram aplicadas no caso particular da matriz azeite.

Contudo, estas técnicas de preparação de amostra apresentam algumas limitações, nomeadamente no que diz respeito ao elevado volume de solventes utilizados, elevado manuseamento das amostras, morosidade e à ausência de seletividade para os analitos alvo. Deste modo, a implementação de uma metodologia de preparação de amostra que apresente uma elevada seletividade e especificidade para os pesticidas em estudo permitindo, de forma seletiva, a pré-concentração ou isolamento

unicamente dos analitos alvo presentes em quantidades vestigiais, e consequentemente, minimizando os efeitos da matriz, pode ser considerada como uma abordagem altamente promissora. Previsivelmente, devido ao incremento na seletividade, estas novas metodologias permitirão ultrapassar algumas das limitações inerentes às técnicas convencionais de preparação de amostra, contudo o seu desenvolvimento representa um enorme desafio analítico.

Muito recentemente, a introdução da tecnologia de impressão molecular que possibilita o desenvolvimento de materiais porosos com uma estrutura tridimensional polimérica, a qual apresenta locais de reconhecimento molecular específicos complementares em forma, tamanho e grupos funcionais com o analito alvo, designados como polímeros molecularmente impressos (MIPs) e, que permitem a ligação, de modo seletivo e específico, dos analitos de interesse, minimizando os efeitos da matriz (Selligren, 2001a; Garcia *et al.*, 2011) tornou-se uma área emergente.

Assim, os MIPs podem ser encarados como recetores sintéticos (Ye e Mosbach, 2008; Bui e Haupt, 2010) uma vez que apresentam sítios de ligação molecular produzidos artificialmente e com uma seletividade e especificidade pré-definida para um determinado analito alvo (Vasapollo *et al.*, 2011), permitindo a sua ligação preferencial mesmo em presença de outros compostos interferentes presentes em matrizes complexas.

De entre a vasta gama de aplicação dos MIPs é de destacar a sua promissora utilização na área da preparação de amostra, em particular como adsorventes de extração em fase sólida (SPE), vulgarmente denominada de MISPE (Baggiani *et al.*, 2007; Beltran, 2010; Caro *et al.*, 2006; Lasákova e Jandera, 2009; Martin-Esteban, 2013; Pichon, 2007).

Neste capítulo aborda-se detalhadamente a temática relacionada com as metodologias de preparação de amostra utilizadas para a extração de pesticidas em matrizes alimentares, desenvolvidas até à data, focando-se particularmente nas aplicadas à matriz azeite. Atendendo ao objetivo do presente trabalho, será dado especial ênfase à temática dos Polímeros Molecularmente Impressos e da sua emergente aplicação na área da preparação de amostra evidenciando-se, em detalhe, a sua integração como adsorventes seletivos na etapa de extração em fase sólida.

3.2. Técnicas de Preparação de Amostra

Em geral, os protocolos analíticos que visam a análise química quantitativa de um determinado componente de uma amostra compreendem a etapa prévia de preparação da amostra, seguida da identificação e quantificação dos analitos alvo mediante a utilização de técnicas cromatográficas. Contudo, o sucesso da análise cromatográfica é influenciado pela eficiência da técnica de preparação da amostra que é utilizada, essencialmente, com o objetivo de isolar os analitos de interesse dos potenciais interferentes presentes na matriz (Gilbert-López *et al.*, 2009). Para além desta etapa possibilitar o isolamento dos analitos contribui, adicionalmente, para a sua pré-concentração, o que do ponto de vista da subsequente quantificação pode ser considerado como altamente vantajoso (Hernando *et al.*, 2007; Tadeo, 2008).

A eliminação de eventuais compostos interferentes da matriz é outro fator de extrema relevância dado que a sua presença nos extratos aquando da análise cromatográfica pode acarretar graves danos para o sistema cromatográfico, tais como o bloqueamento das diversas tubagens existentes no sistema, a contaminação do detetor e, ainda, possíveis danos nas colunas cromatográficas (Hernando *et al.*, 2007; Tadeo, 2008).

A complexidade da composição química do azeite, aliada às reduzidas concentrações em que os pesticidas se encontram, previsivelmente, presentes nesta matriz torna crucial e imperativo o desenvolvimento de metodologias de preparação de amostra altamente eficientes, de forma que o posterior sucesso da análise cromatográfica não fique comprometido.

De um modo geral, na maioria dos métodos para a análise de pesticidas, recorre-se à extração líquido-líquido (Figura 9) para isolar os analitos de interesse. Contudo, esta técnica apresenta inúmeras desvantagens, das quais se destacam o facto de ser uma técnica bastante morosa, que utiliza grandes volumes de solventes orgânicos e que requer um grande manuseamento das amostras, podendo dar origem a consideráveis perdas do analito alvo. Na tentativa de contornar algumas destas limitações foram introduzidos alguns métodos de preparação de amostra mais simples e rápidos para a análise de resíduos de pesticidas em amostras alimentares, tais como o SFE, o PLE e o MAE (Zhang *et al.*, 2012).

O SFE é uma técnica de preparação de amostras que permite uma rápida extração dos analitos alvo a partir de amostras sólidas mediante a utilização de um fluido supercrítico, em alternativa aos convencionais solventes orgânicos (Lehotay, 1997; Martín *et al.*, 2011). A literatura revela que o dióxido de carbono (CO₂) é o fluido supercrítico mais frequentemente utilizado na análise de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares, devido à sua moderada temperatura e pressão crítica, não-inflamabilidade, baixa toxicidade, alta pureza, reduzido custo e fácil evaporação dos extratos obtidos (Stefani *et al.*, 1997; Castro e Jimeénez-Camnona, 2000). Esta técnica foi aplicada na extração de pesticidas de amostras de azeite (Zougagh *et al.*, 2008), no entanto verificou-se que o CO₂ é apenas eficaz na extração de compostos não-polares ou de baixa polaridade, pelo que pode remover os compostos interferentes de natureza não-polar presentes nas amostras em estudo, sendo portanto pouco eficiente no isolamento de pesticidas polares. A utilização desta técnica para a extração de pesticidas polares ou moderadamente polares envolve a adição de solventes orgânicos de forma a incrementar a polaridade dos solventes de extração que são vulgarmente utilizados em SFE (Zhang *et al.*, 2012).

A extração com líquido pressurizado, vulgarmente denominada de extração acelerada por solvente (ASE), é também mencionada na literatura, como uma técnica utilizada para a extração de pesticidas de matrizes alimentares complexas contudo, até à data, esta técnica não foi aplicada para a extração de pesticidas em amostras de azeite. Esta técnica é baseada numa extração que ocorre sob uma temperatura e pressão bastante elevadas durante curtos períodos de tempo (Richter *et al.*, 1996; Blasco *et al.*, 2005). A temperatura constitui um fator muito importante pois, ao induzir uma diminuição da viscosidade dos solventes promovendo a difusão dos analitos para os solventes, permite incrementar a eficiência da extração dos analitos. Experimentalmente, a amostra é dispersada num sólido dispersante (por exemplo terra de diatomáceas, sílica ou alumina acídica) de forma a prevenir a agregação das partículas da amostra, possibilitando uma eficiente extração dos analitos. Uma característica muito interessante desta técnica é a possibilidade de uma completa automatização, aliada ao facto de permitir uma redução significativa no consumo de solventes e no tempo de operação, apresentando uma elevada eficiência de extração. No entanto, a sua eficiência é drasticamente influenciada pela pressão de extração e pelas condições de temperatura, sendo que as elevadas temperaturas podem originar a

degradação de compostos termicamente lábeis e, além disso, geralmente obtêm-se extratos que possuem uma enorme concentração de substâncias interferentes (Carabias-Martínez *et al.*, 2005; Gilbert-López *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

Por sua vez, a MAE foi desenvolvida com a finalidade de obter uma técnica de extração rápida em alternativa às técnicas até então implementadas, tendo sido aplicada pela primeira vez em 1986 na extração de alguns compostos poluentes orgânicos (Ganzler *et al.*, 1986). Mais recentemente, tem sido utilizada para a análise de uma ampla gama de pesticidas em várias matrizes alimentares complexas, das quais se destaca o azeite (Fuentes *et al.*, 2008). De um modo geral, os analitos de interesse são aquecidos por micro-ondas e transferidos a partir da amostra para os solventes orgânicos. A utilização de micro-ondas acelera o processo extrativo conduzindo a elevadas taxas de recuperação dos analitos, contudo a utilização de altas potências pode resultar na degradação de alguns pesticidas e, conseqüentemente em baixas taxas de recuperação. As principais vantagens desta técnica são a possibilidade de utilizar baixas temperaturas, a completa automatização, a extração simultânea de diferentes tipos de analitos, bem como a elevada eficiência de extração. Contudo, a MAE apresenta uma reduzida seletividade, resultando na co-extração de inúmeros compostos interferentes, pelo que exige a aplicação prévia de técnicas de extração intermédias antes da determinação cromatográfica, revelando-se ainda ineficiente no isolamento de compostos não-polares (Zhang *et al.*, 2012).

Em alternativa à LLE pode ainda recorrer-se à cromatografia de permeação em gel (GPC) (Figura 9) que apresenta elevadas taxas de recuperação para alguns pesticidas, no entanto, uma vez que esta técnica apenas permite a separação dos compostos de acordo com as suas massas moleculares, apresenta conseqüentemente uma baixa especificidade. Para além deste inconveniente, esta técnica tem como desvantagens o facto de ser bastante morosa, envolver a utilização de equipamentos apropriados, os quais possuem um elevado custo, o grande consumo de solventes orgânicos e a obtenção de extratos que contêm uma elevada quantidade de substâncias interferentes, provenientes fundamentalmente da fração lipídica, dificultando a deteção e a posterior quantificação dos pesticidas alvo (Sannino *et al.*, 1999; Barrek *et al.*, 2003; Ballesteros *et al.*, 2006; García-Sánchez *et al.*, 2006; Guardia-Rubio *et al.*, 2006).

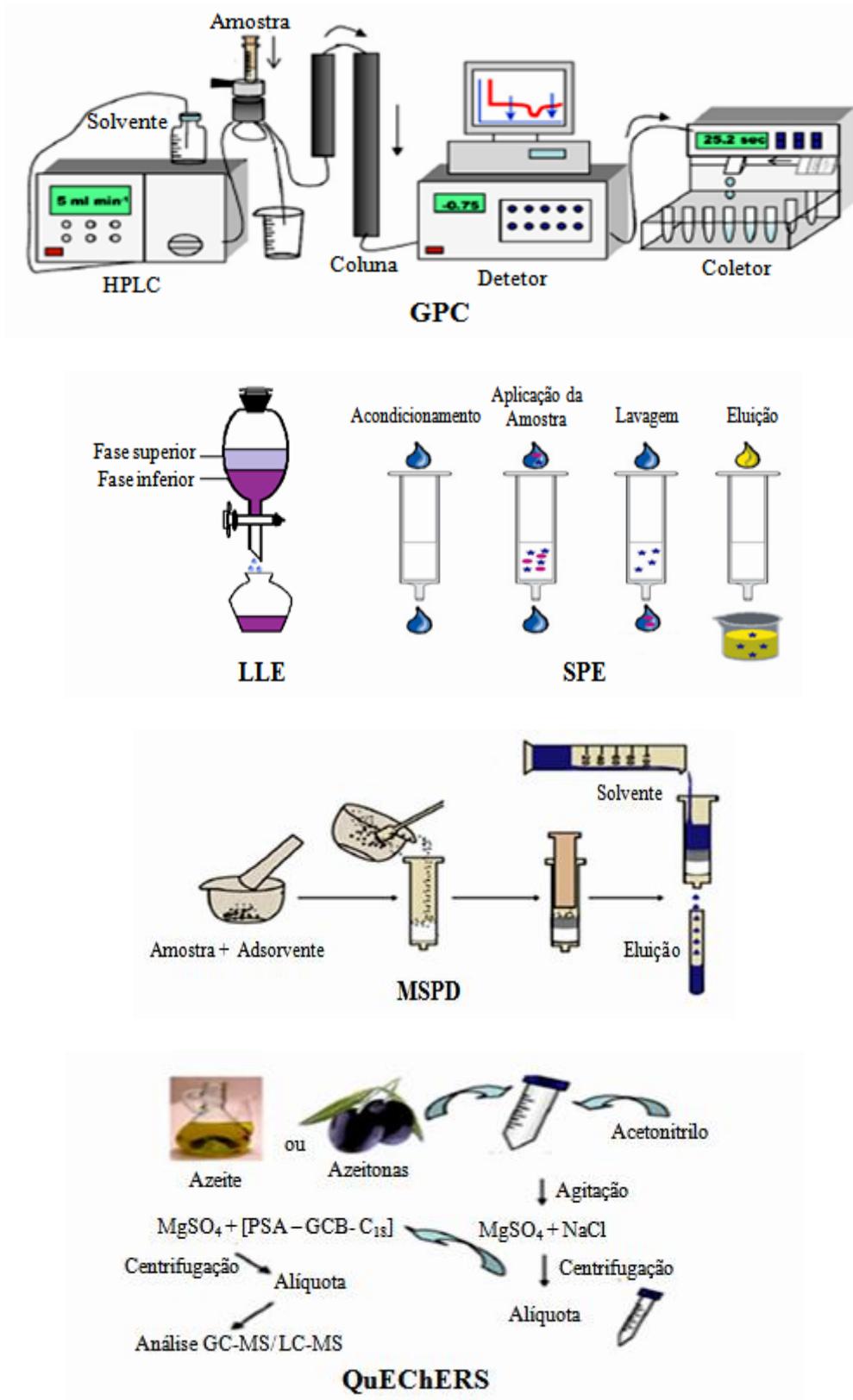


Figura 9. Técnicas de preparação de amostra amplamente utilizadas na extração de pesticidas em amostras de azeite (adaptado de Gilbert-López *et al.*, 2009).

Na tentativa de contornar algumas das limitações associadas à LLE foi ainda introduzida a técnica de extração em fase sólida (Sabik *et al.*, 2000), a qual tem vindo a ser amplamente utilizada como uma técnica de preparação de amostras devido à inerente simplicidade na sua execução, facilidade de automatização e utilização de reduzidos volumes de solventes, comparativamente à LLE. O procedimento de SPE (Figura 9) inicia-se com a etapa prévia de acondicionamento (utilizando água e/ ou solventes orgânicos) dos cartuchos, os quais contêm um adsorvente sólido, seguindo-se a aplicação da amostra dissolvida num solvente apropriado, ficando os analitos alvo retidos na fase sólida adsorvente. De seguida, procede-se à remoção dos compostos interferentes mediante um passo intermédio denominado de lavagem, em geral através da utilização de solventes orgânicos e, por último, os analitos de interesse são eluídos com solventes apropriados (Gilbert-López *et al.*, 2009). Dado que esta técnica contempla um passo de lavagem possibilitando a remoção de alguns interferentes provenientes da matriz, mediante uma escolha criteriosa dos solventes utilizados, tem vindo a ser aplicada a uma gama alargada de matrizes alimentares complexas, nomeadamente as que apresentam um elevado teor em gordura, como por exemplo o azeite (Fuentes *et al.*, 2008). No entanto, esta técnica não permite ultrapassar completamente os problemas associados à inerente complexidade de matrizes com elevado teor lipídico, como é o caso particular do azeite, visto obterem-se frequentemente extratos com uma elevada quantidade de compostos interferentes (Picó *et al.*, 2007), que poderão comprometer a posterior análise cromatográfica do analito. Por outro lado, os cartuchos de SPE não podem ser reutilizados, tornando esta técnica relativamente dispendiosa (Zhang *et al.*, 2012).

A otimização de vários adsorventes ou de combinações destes (florisil, alumina, C₁₈, sílica gel, GCB (carvão ativo grafitizado) e PSA (amina primária-secundária), entre outros) utilizados na fase estacionária, bem como dos solventes utilizados nas diferentes etapas do método convencional de SPE, originou inúmeras publicações que propunham várias metodologias de extração e que avaliavam a sua eficiência na remoção dos compostos interferentes presentes em matrizes com elevado teor em gordura (Schenck *et al.*, 2002; Anastassiades *et al.*, 2003; Lehotay *et al.*, 2005; Yagüe *et al.*, 2005; He e Liu, 2007a; Hernando *et al.*, 2007; Shimelis *et al.*, 2007). Porém, os resultados demonstraram que, embora para alguns dos adsorventes sólidos anteriormente referidos fossem obtidas taxas de recuperação razoáveis para determinadas classes de pesticidas,

para uma diversificada lista de pesticidas, alguns dos adsorventes de SPE revelaram-se ineficientes na remoção dos interferentes e inadequadas para uma extração eficaz do pesticida (Cairns *et al.*, 1995; Gilbert-López *et al.*, 2009).

De entre as técnicas de preparação de amostra utilizadas, até à data, na extração de pesticidas em matrizes vegetais com elevado teor em gordura, a estratégia aplicada com mais frequência resulta da combinação de várias técnicas de preparação de amostra, consistindo na utilização de LLE com solventes orgânicos, seguida de uma etapa de limpeza com SPE ou GPC (Torres *et al.*, 1996; Amvrazi e Albanis, 2008; Gilbert-López *et al.*, 2009). No entanto, tal como foi referido anteriormente, a LLE é apenas eficaz para o isolamento de compostos não-polares, uma vez que possui uma baixa eficiência para a extração de pesticidas polares. Por outro lado, a elevada quantidade de solventes orgânicos requeridos para a extração, aliada à dificuldade de automatização constituem as principais desvantagens destas combinações de técnicas de preparação de amostra (Lentza-Rizos *et al.*, 2001; Picó *et al.*, 2007).

Nos últimos anos tem vindo a assistir-se ao desenvolvimento de inúmeras técnicas de preparação de amostra que têm por base a extração em fase sólida, nomeadamente a microextração em fase sólida (SPME) (Kataoka *et al.*, 2000; Tsoutsi *et al.*, 2006), a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (Barker, 2007; Sobhanzadeh *et al.*, 2011; Deme *et al.*, 2014) e ainda a extração sorptiva com barras de agitação (SBSE) (Gilbert-López *et al.*, 2010).

A técnica de MSPD foi introduzida por Barker e seus colaboradores em 1989 (Barker *et al.*, 1989). De um modo geral e como ilustrado na figura 9, esta técnica de preparação de amostra consiste em introduzir a matriz em estudo num recipiente (geralmente um almofariz) contendo um material sólido adsorvente procedendo-se, de seguida, à sua moagem e homogeneização. Posteriormente, a mistura sólida é transferida para uma coluna de extração em fase sólida vazia e, por fim, mediante a utilização de um solvente apropriado procede-se à eluição dos analitos alvo (Zhang *et al.*, 2012).

Ao contrário da técnica de SPE em que a amostra é solubilizada num solvente apropriado e aplicada ao cartucho de SPE contendo o material adsorvente, na técnica de MSPD a fase estacionária que constitui as colunas de extração consiste numa mistura da

amostra com um material adsorvente. Assim, esta técnica de preparação de amostra difere substancialmente da técnica de SPE clássica, essencialmente nos seguintes aspetos: trituração da amostra e obtenção de partículas de dimensões reduzidas proporcionando um aumento da área superficial o que facilita a posterior extração dos analitos; o analito a extrair encontra-se disperso ao longo da fase estacionária da coluna de MSPD permitindo um aumento da capacidade extrativa, enquanto que nas colunas de SPE a amostra é aplicada no topo da coluna. A técnica de MSPD permite, através da seleção de solventes apropriados, isolar analitos com diferentes polaridades o que a torna potencialmente útil na extração sequencial dos diferentes compostos em análise utilizando a mesma amostra (Barker, 2007).

A técnica de MSPD tem sido amplamente aplicada na extração de inúmeros pesticidas em amostras alimentares complexas, nomeadamente em amostras de azeite (Gilbert-López *et al.*, 2010). As vantagens associadas à aplicação desta técnica encontram-se relacionadas fundamentalmente com o facto de permitir a realização da extração e remoção de interferentes numa única etapa, o uso de pequenas quantidades de amostra, bem como a utilização de reduzidos volumes de solventes orgânicos. No entanto, a MSPD apresenta a desvantagem de envolver vários passos, o que a torna relativamente morosa e laboriosa. Por outro lado, a eventual extração de compostos lipídicos da matriz (Ferrer *et al.*, 2005), bem como a dificuldade em garantir a repetibilidade do processo de moagem e homogeneização, uma vez que estas operações são realizadas manualmente, pode originar erros experimentais (Zhang *et al.*, 2012).

Mais recentemente, Anastassiades e os seus colaboradores (Anastassiades *et al.*, 2003) introduziram uma nova metodologia de preparação de amostra, a qual designaram pelo acrónimo QuEChERS, que representa a sigla em inglês para Quick (rápido), Easy (fácil), Cheap (económico), Effective (eficiente), Rugged (robusto) e Safe (seguro) e que tem sido amplamente utilizado com sucesso na deteção de resíduos de pesticidas em matrizes vegetais complexas e com um elevado teor de gordura, tais como as azeitonas e o azeite (Cunha *et al.*, 2007; Lambropoulou e Albanis, 2007; Hernando *et al.*, 2007; Gilbert-López *et al.*, 2009; Gilbert-López *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da metodologia QuEChERS resulta da tentativa de reunir numa só etapa as vantagens extrativas associadas à LLE com as dos sistemas mais recentes que utilizam adsorventes sólidos, como o MSPD e o SPE. Como

esquematizado na figura 9, o procedimento geral de extração envolve essencialmente duas etapas, sendo que a primeira consiste em adicionar a um tubo contendo uma alíquota da amostra em estudo, uma quantidade adequada de solvente orgânico (usualmente acetoneitrilo), um agente exsiccante (por exemplo o sulfato de magnésio) e um sal (por exemplo o cloreto de sódio), seguindo-se de uma agitação forte e subsequente centrifugação. A utilização de cloreto de sódio nesta etapa prende-se com o facto de este promover o *salting-out* possibilitando uma eficiente separação de fases (orgânica e aquosa) permitindo a recolha de uma alíquota da fase orgânica, a qual será sujeita a um posterior processo de extração. A segunda etapa da metodologia QuEChERS compreende um segundo passo de limpeza, executada de forma similar à primeira recorrendo a operações como a agitação e a centrifugação, na qual uma alíquota do extrato obtido na primeira etapa é sujeita à ação de várias substâncias sólidas com carácter adsorvente, tais como o PSA, a sílica C₁₈ ou o GCB, as quais se destinam a adsorverem os compostos interferentes da matriz, sendo que os analitos de interesse são transferidos para o extrato. Por fim, a alíquota do extrato, que é obtida após a centrifugação, é filtrada e submetida à análise cromatográfica (García-Reyes *et al.*, 2007; Tadeo, 2008). É de referir que os adsorventes anteriormente referidos são cruciais para a obtenção de extratos contendo menores teores de compostos interferentes, sendo que cada um deles é utilizado com uma finalidade de purificação específica. Em particular, o PSA retém os ácidos gordos e outros ácidos orgânicos de natureza polar presentes na matriz (Furlani *et al.*, 2011), o C₁₈ é essencialmente aplicado em amostras com elevado teor em gordura, dado que possui a capacidade para reter compostos lipídicos (Lehotay *et al.*, 2010) e, finalmente, a utilização de GCB permite também a redução do teor de gordura, bem como a remoção de alguns pigmentos (por exemplo as clorofilas) e esteróis presentes na amostra (Gilbert-López *et al.*, 2010).

A metodologia QuEChERS apresenta inúmeras vantagens, quando comparada com os procedimentos de extração convencionais, uma vez que permite a obtenção de extratos com menores teores de compostos interferentes e a recuperação dos analitos de interesse com taxas elevadas (> 85 %). São ainda de destacar a redução da quantidade de material usado e a diminuição do uso de solventes orgânicos, devido ao facto de não necessitar da prévia etapa de ativação do adsorvente nem da etapa de eluição, visto que os processos de extração e purificação ocorreram em simultâneo (Lambropoulou e Albanis, 2007; García-Reyes *et al.*, 2007; Lambropoulou e Albanis, 2007).

As vantagens associadas à utilização desta técnica constituem um importante avanço no campo das técnicas de preparação de amostra, no entanto, a escolha dos materiais adsorventes tem vindo a revelar-se como uma etapa crucial na metodologia QuEChERS, constituindo assim algumas das limitações associadas a este método, em particular quando é aplicado a matrizes vegetais com elevado teor em gordura. A título de exemplo, é citado na literatura que apesar da utilização de PSA em combinação com o C₁₈, possibilitar a extração de alguns interferentes, tais como os ácidos gordos, continua a ser ainda uma questão problemática, uma vez que a capacidade do adsorvente PSA para reter estes compostos é altamente dependente do condicionamento e dos protocolos de eluição que são utilizados. Por outro lado, a utilização dos adsorventes GCB juntamente com o PSA, reduz a capacidade do PSA relativamente à remoção dos ácidos gordos da matriz (García-Reyes *et al.*, 2007).

Em suma, a análise de resíduos de pesticidas em matrizes vegetais que possuem um elevado teor em gordura, como é o caso particular do azeite, é uma tarefa ainda bastante difícil, em virtude da inerente complexidade da matriz. Deste modo, o desenvolvimento de estratégias alternativas para isolar ou extrair os pesticidas alvo a partir da totalidade da matriz azeite de modo a evitar todas as desvantagens associadas aos métodos comuns de preparação da amostra, referidos anteriormente, é de grande relevância a fim de garantir a “segurança alimentar” do consumidor. Assim, a implementação de uma metodologia alternativa altamente seletiva e com elevada afinidade para os pesticidas alvo, que permita a sua deteção e quantificação (usualmente em quantidades vestigiais), minimizando os efeitos de matriz representa um grande desafio.

Recentemente, os polímeros molecularmente impressos (MIPs) têm vindo a despertar um grande interesse, fundamentalmente quando utilizados como adsorventes na extração em fase sólida, por apresentarem características bastante promissoras na extração seletiva de diversos compostos de diferentes matrizes (Pichon, 2007; Pichon e Chapuis-Hugon, 2008; Lasakova e Jandera, 2009; Martín-Esteban, 2013). Deste modo, prevê-se que a utilização destes materiais adsorventes na implementação de técnicas de preparação de amostra permita solucionar os problemas associados à extração de resíduos de pesticidas em matrizes complexas com elevadas quantidades de matéria gorda, como é o caso particular da matriz azeite, que será alvo do presente estudo.

3.3. Polímeros Molecularmente Impressos

A tecnologia de impressão molecular é considerada como uma aproximação que possibilita a síntese de materiais sintéticos com capacidade de reconhecimento molecular, dada a presença na sua estrutura de locais de ligação seletivos para uma dada molécula ou para os seus análogos estruturais. Estes materiais sintéticos mimetizam os sistemas de reconhecimento biomolecular de vários processos biológicos, nomeadamente a replicação do ADN, as interações antígeno-anticorpo, as interações enzima-substrato, entre outros mecanismos envolvendo recetores que ocorrem naturalmente nos organismos vivos. Nestes sistemas, as macromoléculas biológicas possuem locais de ligação específicos, os quais apresentam capacidade para reterem de forma seletiva uma dada molécula, mesmo em presença de outras com estruturas químicas muito semelhantes (Alexander *et al.*, 2006; Ye e Mosbach, 2008; Poma *et al.*, 2010).

Apesar das vantagens inerentes à utilização destes materiais biológicos, as quais se encontram intimamente relacionadas com a elevada afinidade e seletividade, torna-se relevante realçar algumas limitações, tais como: o elevado custo de produção, a dificuldade de obtenção, a instabilidade em condições que diferem do seu meio nativo e, ainda, a inerente necessidade de purificação (Sellergren, 1997). Com o intuito de ultrapassar algumas destas limitações têm vindo a ser exploradas algumas estratégias de síntese com vista ao “design” e desenvolvimento de materiais sintéticos, que mimetizam os fenómenos de reconhecimento molecular associados aos recetores biológicos, baseados no mecanismo de impressão molecular, pelo que são vulgarmente designados como recetores sintéticos.

A utilização destes materiais sintéticos como adsorventes sólidos no desenvolvimento de técnicas de preparação de amostra, em particular na área da química analítica, constitui uma alternativa bastante promissora comparativamente às técnicas convencionais de preparação de amostras, devido ao facto de permitirem um incremento significativo na seletividade, tornando-as especialmente apropriadas para aplicações que envolvem matrizes de elevada complexidade química.

O conceito de impressão molecular surgiu com base na teoria proposta por Pauling para descrever a formação dos anticorpos, na qual um antígeno era utilizado

como uma molécula que servia de molde para a cadeia polipeptídica dos anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respetiva cadeia (Fischer, 1964; Pauling, 1940; Yan e Ramström, 2005). Assim, com base neste mecanismo, surgiu a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional, denominada de polímero, ao redor de uma molécula molde, que tivesse a capacidade de atuar de forma similar ao anticorpo, mantendo a elevada especificidade e seletivo reconhecimento molecular análogo ao dos materiais biológicos. Usualmente, estes materiais são denominados de Polímeros Molecularmente Impressos, ou somente pela sigla MIP que advém do inglês “Molecularly Imprinted Polymers” (Masqué *et al.*, 1998; Tamayo *et al.*, 2005).

Os trabalhos pioneiros desenvolvidos por Polyakov na década de 30 utilizando matrizes de sílica são considerados, de acordo com a literatura, a primeira abordagem à impressão molecular (Alexander *et al.*, 2006). Contudo, a tecnologia de impressão molecular só foi proposta pela primeira vez em 1972 por Wulff e Sarhan, quando estes investigadores descreveram a síntese de um polímero com locais de reconhecimento seletivo para a separação de enantiômeros de uma mistura racêmica de açúcares. Após o início da década de 80, esta tecnologia foi expandida fundamentalmente devido ao esforço de Mosbach e dos seus colaboradores (Andersson *et al.*, 1984; Mosbach e Ramström, 1996; Yan e Ramström, 2005) e, desde então, estes materiais têm sido alvo de grande interesse com uma vasta gama de aplicabilidade (Whitcombe *et al.*, 2014).

De um modo geral, os MIPs são obtidos através de um mecanismo de polimerização que ocorre na presença de uma molécula molde (analito de interesse) ou de uma molécula que possua uma estrutura química análoga, dos monómeros funcionais, de um agente de ligação cruzada e de um iniciador radicalar em solução num solvente apropriado. Durante a polimerização forma-se uma estrutura rígida polimérica tridimensional em redor da molécula molde, de seguida esta molécula é removida, deixando os locais de ligação ativos, que são complementares em tamanho e forma à da molécula molde. Esta estratégia possibilita a obtenção de um polímero que permite a interação reversível com a molécula alvo, o que consequentemente facilita a separação da mesma a partir de uma matriz complexa, minimizando assim a influência dos interferentes existentes na amostra (Bui e Haupt, 2010; Garcia *et al.*, 2011).

Para além da elevada afinidade e seletividade que os MIPs apresentam no reconhecimento das moléculas de interesse, estes materiais apresentam ainda as

vantagens de possuírem uma fácil preparação, um custo associado relativamente baixo e a elevada estabilidade em presença de ácidos, bases, iões metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e pressões elevadas, pelo que usualmente lhe são atribuídas propriedades como uma grande robustez física, estabilidade e resistência térmica. Outra característica muito interessante é o facto de estes materiais adsorventes poderem ser reutilizados e armazenados durante longos períodos de tempo, mantendo a sua elevada capacidade de reconhecimento molecular (Svenson e Nicholls, 2001; Lavignac *et al.*, 2004; Piletsky *et al.*, 2006; Vasapollo *et al.*, 2011), o que torna a sua aplicação muito vantajosa comparativamente com os tradicionais adsorventes de SPE.

Atualmente, a tecnologia MIP é considerada como extremamente versátil e promissora dada a sua aplicabilidade na síntese de materiais poliméricos seletivos para uma ampla variedade de aplicações. Nos últimos anos, estes materiais têm sido aplicados com sucesso em inúmeros campos da ciência, nomeadamente, na separação e purificação de diversos compostos (Masque *et al.*, 2000; Sellegren, 2001; Wei e Mizaikoff, 2007; Tamayo *et al.*, 2007; Pichon e Chapuis-Hugon, 2008; Lasáková e Jandera, 2009), em cromatografia (Ansell *et al.*, 1996; Spivak *et al.*, 1997), na tecnologia de sensores químicos (Ansell *et al.*, 1996; Haupt e Mosbach, 2000; Piletsky *et al.*, 2006), de anticorpos biológicos (Bossi *et al.*, 2007), como recetores (Longo e Vasapollo, 2008), na libertação controlada de fármacos (Byrne *et al.*, 2008), e ainda na catálise enzimática (Wulff, 2002; Li e Li, 2007), o que demonstra a elevada versatilidade desta tecnologia.

3.3.1. Síntese Química

O conceito de impressão molecular associado à síntese de polímeros molecularmente impressos encontra-se esquematicamente ilustrado na figura 10, onde se representam as diversas etapas e as diferentes entidades envolvidas na síntese destes materiais poliméricos.

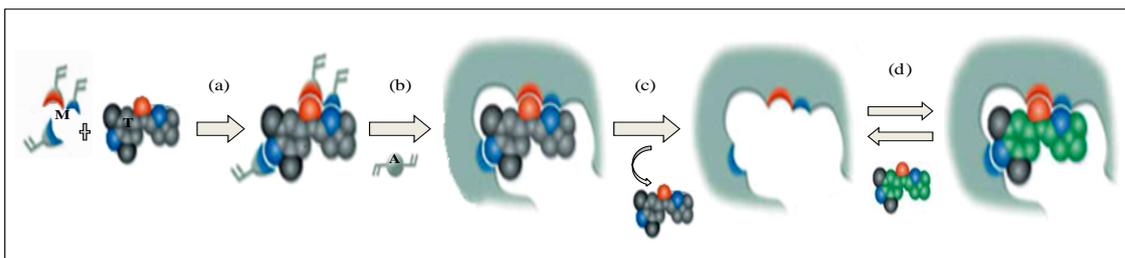


Figura 10. Representação esquemática do processo de síntese do MIP. (a) Etapa de pré-polimerização na qual se verifica a formação do complexo entre a molécula molde (T) e os monómeros funcionais (M); (b) Etapa de polimerização que resulta da adição de um agente de ligação cruzada (A) e um iniciador radicalar ao sistema; (c) Extração da molécula molde dos locais de ligação; (d) Obtenção do polímero com locais de ligação específica (com carácter reversível) para o analito alvo (Adaptado de Sigma-Aldrich, 2015).

Como ilustrado na figura 10, o processo de síntese dos polímeros molecularmente impressos é geralmente iniciado através da mistura de um monómero funcional com a molécula molde, em solução, utilizando um solvente porogénico (Bui e Haupt, 2010). Nesta primeira etapa da síntese, genericamente denominada de pré-polimerização, ocorrem interações reversíveis entre os grupos funcionais ligantes da molécula molde e os grupos funcionais dos monómeros, por meio de ligações covalentes, não-covalentes, semi-covalentes ou ainda por ligações mediadas por metais, dando origem a um complexo estável (T-M) (Spivak, 2005; Moreno-Bondi *et al.*, 2008). Numa etapa posterior, são adicionados ao meio o agente de ligação cruzada que promove as ligações cruzadas no polímero a fim de formar uma matriz tridimensional polimérica, de seguida, a polimerização é induzida através da adição de um iniciador radicalar, por meio da ação térmica ou da radiação ultravioleta (UV) na ausência de oxigênio (Moreno-Bondi *et al.*, 2008; Martín-Esteban, 2013). Por fim, após a etapa de polimerização estar concluída, a molécula molde é removida da matriz polimérica através da utilização de um solvente específico ou, quando necessário, por meio de uma clivagem química, no caso particular da molécula estabelecer uma ligação covalente com o monómero (Augusto *et al.*, 2010). Com a remoção da molécula molde, o polímero resultante possuirá microcavidades capazes de reter seletivamente as moléculas molde (analitos de interesse) presentes numa amostra complexa (Beltran *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2011; Martín-Esteban, 2013). Geralmente, em paralelo com a

síntese dos MIPs são também produzidos polímeros não molecularmente impressos (NIPs), também denominados de polímeros de controlo, os quais são sintetizados de modo idêntico ao MIP, contudo sem adição da molécula molde. Deste modo, dada a ausência da molécula molde, os NIPs não possuem locais de ligação (cavidades) na sua matriz polimérica, pelo que, não têm capacidade para reter seletivamente os analitos alvo. Os NIPs são utilizados durante a caracterização dos respetivos MIPs, com a finalidade de avaliar a sua seletividade e especificidade.

É de salientar que, a especificidade e seletividade dos MIPs para uma dada molécula alvo ou para os seus análogos estruturais dependem fundamentalmente do sucesso do método de polimerização selecionado para a obtenção dos polímeros, assim como, de uma escolha criteriosa de todas as entidades envolvidas na formação destas matrizes poliméricas. Consequentemente, um conhecimento aprofundado de todas as entidades envolvidas e o papel que desempenham em cada uma das etapas do processo de polimerização, tais como a estrutura e a natureza química e a concentração da molécula molde e dos monómeros funcionais, a razão estequiométrica entre a molécula molde e os monómeros funcionais (T-M), a natureza das interações que são estabelecidas entre estas duas entidades, o tipo e a quantidade do solvente porogénico, o tipo de agente de ligação cruzada e de iniciador radicalar e as condições reacionais torna-se crucial para o “design” destes recetores sintéticos (Kloskowski *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2009; Piletska *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013).

A conceção destes materiais poliméricos é efetuada com vista ao isolamento/pré-concentração de um dado analito alvo, pelo que “à priori”, já se encontra pré-determinado qual a molécula molde a utilizar no processo de síntese, daí que aos MIPs lhe seja associada a expressão de “feitos à medida” (do inglês “tailor-made”). Usualmente é utilizado como molde o analito de interesse, o qual deve ser quimicamente inerte, estável ao aquecimento e/ ou à radiação UV (dependendo das condições de reação), devendo ser solúvel no solvente porogénico utilizado na síntese (Cormack e Elorza, 2004) e, ainda, possuir grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monómeros, de modo a formar um complexo T-M estável (Pichon e Chapius-Hugon, 2008). No entanto, em determinadas situações, quando a molécula molde é insolúvel no solvente porogénico, não é resistente às condições em que decorre a síntese, não se encontra disponível comercialmente ou é excessivamente cara, pode-se

recorrer a moléculas que possuam estruturas químicas similares às do analito alvo. Por sua vez, a natureza e a estrutura química, em particular os grupos funcionais, da molécula molde determinam o tipo de monómeros que serão utilizados e, conseqüentemente definem as propriedades dos locais de ligação (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008).

Por outro lado, o reconhecimento molecular destes materiais poliméricos seletivos encontra-se fortemente dependente da natureza e estrutura química do monómero funcional utilizado no mecanismo de impressão molecular, dado que estas entidades são fundamentalmente responsáveis pelas interações que se estabelecem nos locais de ligação existentes no polímero (Hu *et al.*, 2007). Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente vários monómeros funcionais, com diversas estruturas químicas e diferentes polaridades (Moreno-Bondi *et al.*, 2008; Vasapollo *et al.*, 2011). A escolha do monómero depende essencialmente da natureza da molécula molde, ou seja, os analitos que possuem na sua composição grupos básicos interagem mais facilmente com monómeros que contenham grupos ácidos, como por exemplo o ácido metacrílico (MAA), por outro lado, os analitos de natureza ácida interagem preferencialmente com monómeros com carácter básico, como é o caso da 4-vinilpiridina (Andersson *et al.*, 1984; Martín-Esteban, 2001). Contudo, o MAA é referenciado como o monómero utilizado com maior frequência na síntese de polímeros molecularmente impressos (Beltran *et al.*, 2010).

A obtenção de um complexo estável entre as moléculas molde e os monómeros funcionais depende da interação que é estabelecida entre estas duas entidades. Assim, considerando que esta interação ocorre através de um processo de equilíbrio químico, são adicionadas ao sistema quantidades (em termos de moles) superiores de monómero relativamente à molécula molde, geralmente na proporção de 1:4 ou mais, em sistemas de impressão não-covalentes, com o intuito de deslocar o equilíbrio no sentido de formar um maior número de complexos molécula molde-monómero (Umpleby II *et al.*, 2001b; Spivak, 2005; Chen e Xu, 2011).

O sistema de impressão molecular é frequentemente classificado de acordo com a natureza das interações que são estabelecidas entre os monómeros funcionais e a molécula molde durante a etapa de pré-polimerização. Deste modo, os principais métodos de polimerização aplicados para a preparação dos MIPs são baseados em

sistemas de impressão covalente, não-covalente, semi-covalente ou mediada por metais (Mayes e Whitcombe, 2005 Alexander *et al.*, 2006; Moreno-Bondi *et al.*, 2008).

De um modo geral, a primeira abordagem, tal como o próprio nome indica, envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre a molécula molde e os monómeros funcionais antes da etapa de polimerização (Beltran *et al.*, 2010). Por sua vez, os polímeros que são obtidos através deste procedimento possuem, em geral, uma grande seletividade, a qual advém da elevada estabilidade das interações que são estabelecidas entre as respetivas entidades. Assim, o polímero obtido possui um maior número de locais de ligação homogéneos, apresentando um reduzido número de sítios de ligação não específicos (Martín-Esteban, 2013). As principais limitações associadas a esta técnica de impressão molecular são a necessidade de sintetizar o complexo T-M antes da polimerização e a necessidade de recorrer à clivagem química para remover as moléculas molde dos respetivos locais de ligação. Outra das limitações encontra-se relacionada com a limitada escolha dos monómeros funcionais que podem ser utilizados na polimerização tornando-a apenas viável e limitada para um reduzido número de compostos (álcoois, cetonas, aminas, e ácidos carboxílicos), o que restringe a aplicabilidade deste sistema de impressão (Wulff, 1995; Moreno-Bondi *et al.*, 2008).

Atualmente, a abordagem utilizada com maior frequência para a síntese dos MIPs tem como base a impressão não-covalente, visto tratar-se de um procedimento relativamente simples e rápido quando comparado com as restantes abordagens, para além de ser ainda bastante flexível e versátil, pois pode ser adaptado a uma vasta gama de moléculas molde. Neste sistema, a prévia organização entre a molécula molde e os monómeros funcionais ocorre sobretudo através de interações não-covalentes, tais como as ligações de hidrogénio, hidrofóbicas, iónicas ou por forças de Van der Waals (Moreno-Bondi *et al.*, 2008). Apesar de apresentar inúmeras vantagens, têm sido relatadas algumas limitações associadas a este sistema, das quais se destaca, o fato de ser necessário a utilização de grandes quantidades de monómero funcional para garantir a formação do complexo T-M, conseqüentemente o excesso de monómeros livres é incorporado na matriz polimérica, originando a formação de locais de ligação não específicos. Outra limitação associada à utilização desta técnica de impressão molecular está relacionada com a formação heterogénea dos locais de ligação devido à natureza fraca das ligações não-covalentes (Vasapollo *et al.*, 2011).

Na tentativa de ultrapassar algumas das limitações associadas aos sistemas de impressão molecular anteriormente referidos, surge o sistema de impressão semi-covalente. Nesta abordagem as interações que são estabelecidas entre a molécula molde e o monómero funcional são de natureza covalente, contudo após a formação da estrutura polimérica tridimensional são estabelecidas interações não-covalentes com o analito (Garcia *et al.*, 2011). Esta estratégia permite que o sistema possua uma maior compatibilidade com uma vasta gama de condições de polimerização, no entanto tal como o sistema de impressão covalente, esta abordagem é restrita a um reduzido número de monómeros funcionais e o processo de polimerização, bem como a posterior remoção da molécula molde dos respetivos locais de ligação, continuam a ser tarefas relativamente exigentes (Moreno-Bondi *et al.*, 2008).

Por fim, os sistemas de impressão mediada por metais têm vindo a revelar-se como uma abordagem bastante promissora para a síntese de MIPs destinados à posterior aplicação em soluções aquosas. Esta abordagem permite aumentar a reatividade e a seletividade dos locais de reconhecimento molecular existentes na matriz polimérica, devido às propriedades que o metal de coordenação possui para organizar os grupos funcionais e formar sítios de ligação que possuem uma elevada especificidade para o analito alvo (Moreno-Bondi *et al.*, 2008). Porém, apesar das vantagens associadas à utilização deste mecanismo, devem ser tomadas em conta algumas considerações durante a síntese dos MIPs na presença de iões metálicos, nomeadamente a compatibilidade destes compostos com as restantes condições de síntese uma vez que os centros metálicos podem inibir a iniciação da polimerização, a interação que é estabelecida entre o metal e a molécula molde deve ser estável e, finalmente, o molde deve ser facilmente removido após a polimerização (Tamahkar e Denizli, 2014).

A seleção do solvente utilizado no mecanismo de produção dos polímeros molecularmente impressos é também um fator de extrema importância, dada a sua influência nas propriedades morfológicas da matriz polimérica, nomeadamente na porosidade e na área superficial. De um modo geral, o solvente deve possuir a capacidade para dissolver totalmente todos os reagentes utilizados na síntese, sem interferir na formação do complexo T-M (Vasapollo *et al.*, 2011). Na literatura, o solvente é vulgarmente designado como porogénico e é essencialmente responsável pela formação dos poros na matriz polimérica, o que por sua vez permite um melhor acesso

aos locais de ligação por parte dos analitos aquando do fenómeno de reconhecimento molecular (Spivak, 2005). A natureza e o volume do solvente porogénico influenciam a morfologia e o volume total de poros presentes no MIP. Mais precisamente, quanto à sua natureza, os solventes apolares e apróticos são os mais vulgarmente utilizados em síntese, por outro lado, o uso de um maior volume de solvente, assim como a utilização de solventes mais voláteis permite obter um maior controle do tamanho e da distribuição dos poros (Sellergren e Shea, 1993; Spivak, 2005; Vasapollo *et al.*, 2011).

O agente de ligação cruzada é usado durante a síntese dos polímeros com o objetivo de promover a união dos monómeros funcionais, originando uma estrutura tridimensional rígida ao redor da molécula molde (Chen e Xu., 2011). Esta entidade é essencialmente responsável pela estabilidade das ligações que são criadas entre os monómeros funcionais e a molécula molde, pela morfologia da matriz polimérica e ainda pela estabilidade mecânica do polímero (Sellergren, 1999; Beltran *et al.*, 2010). De entre os vários agentes de ligação cruzada que existem disponíveis, o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) tem sido o mais frequentemente utilizado, pois promove a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa (Beltram *et al.*, 2010; Vasapollo *et al.*, 2011). Após a seleção do agente de ligação cruzada, outro fator a ter em consideração é a escolha da razão estequiométrica entre o agente de ligação cruzada e o monómero funcional, sendo que, de modo a garantir o sucesso do processo de impressão molecular, são geralmente utilizadas proporções superiores de agente de ligação cruzada relativamente ao monómero (Vasapollo *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013).

Por último, a adição do iniciador radicalar (I) durante o processo de síntese dos polímeros de impressão molecular é crucial para o início e manutenção da reação de polimerização. De um modo geral, a natureza e a estrutura química do iniciador radicalar possui também um papel relevante, pois influencia diretamente a taxa de polimerização, a estrutura e as propriedades dos polímeros. Mais precisamente, o 2,2-azo-bis-iso-butironitrilo, vulgarmente denominado de AIBN, é referido como o iniciador que tem sido utilizado com mais frequência na síntese de polímeros (Cormack e Elorza, 2004). A taxa e o modo de decomposição do iniciador radicalar é geralmente desencadeada e controlada pela ação térmica, através da radiação UV, ou ainda por meios químicos ou eletroquímicos. Como consequência da degradação das moléculas

do iniciador são cedidos ao meio reacional radicais livres que tornam o sistema extremamente reativo. Assim é pertinente ressaltar que o controle da polimerização é basicamente delineado pela velocidade de formação dos radicais e pode ser alcançado através do ajuste da temperatura ou da radiação UV, bem como da composição química de todos os compostos envolvidos na produção dos MIPs (Cormack e Elorza, 2004; Zheng *et al.*, 2013).

Atualmente, os MIPs podem ser produzidos com uma enorme variedade de formatos e diferentes propriedades, de acordo com o objetivo final da sua aplicação. Esta variedade depende sobretudo dos diferentes métodos de polimerização que são utilizados durante o mecanismo de síntese (Pérez-Moral e Mayes, 2004; Haginaka, 2008; Beltran *et al.*, 2010; Poma *et al.*, 2010). De entre todas as técnicas utilizadas até ao momento, os MIPs são fundamentalmente produzidos pelo método de polimerização convencional denominado de *bulk*, devido à relativa simplicidade que apresenta quando comparado com os restantes mecanismos de polimerização (Vasapollo *et al.*, 2011).

O mecanismo de síntese de polímeros que tem como base o método de polimerização por *bulk* encontra-se esquematicamente ilustrado na figura 10. Em termos gerais, este método utiliza exclusivamente solventes orgânicos e consiste, numa primeira etapa, na mistura de todos os componentes envolvidos na síntese (molécula molde, monómero funcional, solvente porogénico, agente de ligação cruzada e iniciador radicalar), seguida do processo de polimerização. A reação é realizada num sistema homogéneo e ocorre na ausência de oxigénio, essencialmente sob fluxo de azoto, uma vez que a presença de oxigénio impede a formação de radicais livres, retardando a reação de polimerização radicalar (Cormack e Elorza, 2004). Como resultado desta reação é obtido um sólido de natureza polimérica que necessita de ser sucessivamente triturado, moído e peneirado, para que posteriormente se possa proceder à etapa de remoção das moléculas molde (Pérez-Moral e Mayes, 2004).

Ao longo dos últimos anos, têm sido publicados inúmeros trabalhos de síntese que utilizam com sucesso a técnica de polimerização por *bulk* para a produção de materiais adsorventes altamente seletivos. Contudo, apesar da simplicidade que esta técnica apresenta para os seus utilizadores, são referidas algumas desvantagens deste processo, que estão sobretudo associadas à inerente necessidade de triturar os polímeros para obter partículas de tamanhos adequados (Vasapollo *et al.*, 2011). Usualmente,

depois de triturados, os polímeros são constituídos por partículas que são irregulares no tamanho e na forma (entre 20 a 50 μm) e, por outro lado devido ao processo de moagem, podem ser destruídos alguns locais de ligação, reduzindo a capacidade de reconhecimento molecular dos materiais obtidos. A heterogeneidade da matriz polimérica que resulta da falta de controlo deste processo durante a polimerização é apresentada como outra limitação desta metodologia (Pérez-Moral e Mayes, 2004; Moreno-Bondi *et al.*, 2008).

Em suma, dadas as suas características, os MIPs obtidos por este método de polimerização são frequentemente utilizados como materiais adsorventes aplicados a mecanismos de extração em fase sólida (MISPE), ao passo que o seu uso como fase estacionária em colunas cromatográficas de HPLC é pouco indicado, devido à heterogeneidade das partículas (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008).

De um modo geral, face às limitações que a técnica de polimerização via *bulk* apresenta, têm sido desenvolvidos um número crescente de diferentes formatos de polímeros molecularmente impressos (Cormack e Elorza, 2004; Spivak, 2005; Alexander *et al.*, 2006; Pérez-Moral e Mayes, 2006; Moreno-Bondi *et al.*, 2008; Ye e Mosbasch, 2008; Hu *et al.*, 2013). A enorme diversidade de formatos de polímeros tem como base diferentes métodos de polimerização, dos quais se destacam a polimerização por suspensão, por precipitação (Pérez-Moral e Mayes, 2004; Pichon e Chapuis-Hugon, 2008; Lok e Son, 2009), por expansão faseada das partículas (Pérez-Moral e Mayes, 2004), *in situ* (Regal *et al.*, 2012), eletroquímica (Malitesta *et al.*, 2012), no interior de poros de sólidos, tais como a sílica e algumas resinas (Yilmaz *et al.*, 2002) e ainda sobre superfícies modificadas de suporte sólido (Quaglia *et al.*, 2001).

Mais recentemente, com a finalidade de suprimir as limitações que se encontravam associadas às técnicas de polimerização tradicionais (Chen *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2011; Salian e Byrne, 2013) tem vindo a ser explorados novos métodos de polimerização designados como polimerização radicalar controlada do inglês *Controlled "Living" Radical Polymerization* (CLRP). A CLRP engloba várias técnicas de polimerização das quais se destacam a polimerização radicalar por transferência atómica (ATRP), a polimerização mediada por azoto (NMP), a polimerização de transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT) e ainda a polimerização *iniferter* (*ini-tiator, trans-fer, ter-minator*) (Salian e Byrne, 2013; Zhang, 2013). De entre estas

técnicas será dado principal destaque à polimerização via *iniferter*, dado que no presente trabalho são utilizados como materiais adsorventes da extração em fase sólida MIPs sintetizados mediante esta técnica de polimerização. Em termos gerais, os polímeros molecularmente impressos obtidos através da técnica de polimerização *iniferter*, são mencionados na literatura como tendo uma maior aptidão para o reconhecimento molecular dos analitos alvo quando comparados com os polímeros sintetizados pelas técnicas de polimerização radicalar livre (por exemplo a via *bulk*). Mais precisamente, a síntese via *iniferter* possibilita um controlo mais eficaz de toda a etapa de polimerização, permitindo obter uma melhor organização da rede tridimensional e, conseqüentemente, uma maior homogeneidade dos locais de ligação que são formados durante a etapa de síntese dos MIPs (Bossi *et al.*, 2010; Salian e Byrne, 2013; Subrahmanyam *et al.*, 2013; Salian *et al.*, 2014).

3.3.2. Caracterização Química e Morfológica

Os polímeros molecularmente impressos, antes de serem aplicados como materiais adsorventes, necessitam de ser previamente caracterizados, com o objetivo de avaliar o sucesso do método de polimerização e a conseqüente obtenção de uma estrutura polimérica tridimensional com capacidade para reter seletivamente o analito alvo. Essa avaliação engloba uma caracterização química e morfológica e, ainda, a realização de estudos que visam avaliar a capacidade de reconhecimento molecular destas matrizes poliméricas (Cormack e Elorza, 2004).

De um modo geral, as técnicas de caracterização química utilizadas para a caracterização dos MIPs devem de ser selecionadas atendendo à peculiar natureza destes materiais poliméricos, nomeadamente deverá atender-se ao fato de estes materiais serem insolúveis, pelo que a sua caracterização está limitada às técnicas que permitam a análise de amostras em estado sólido (Spivak, 2005).

Caracterização Química

Para a caracterização dos polímeros molecularmente impressos são utilizadas técnicas de caracterização química que possibilitam obter informação ao nível da estrutura química, permitindo inferir a natureza e o tipo de ligações que são estabelecidas entre os átomos constituintes destes materiais poliméricos, nomeadamente

quanto à presença de determinados grupos funcionais que são cruciais para o estabelecimento das posteriores interações com o analito alvo, durante o processo de reconhecimento molecular. De entre o número limitado de técnicas disponíveis para a avaliação físico-química deste tipo de matrizes poliméricas recorre-se, geralmente, à análise elementar do polímero, à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), à ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido e à análise termogravimétrica (TGA) (Cormack e Elorza, 2004; Spivak, 2005; Lok e Son, 2009).

A análise elementar é usualmente utilizada para determinar a quantidade (típicamente a percentagem em massa) de carbono, hidrogénio e azoto presente na composição química dos materiais de impressão molecular. Geralmente, esta técnica é realizada de forma rotineira para avaliar o sucesso da polimerização através da indicação da presença de monómeros funcionais, permitindo ainda avaliar a eficiência da etapa de remoção das moléculas molde. No entanto, a análise elementar não é suficientemente sensível para detetar quantidades vestigiais das moléculas molde presentes nos locais de ligação existentes nos MIPs, pelo que é frequentemente complementada com outras técnicas de caracterização química (Cormack e Elorza, 2004). Em particular, as técnicas FTIR e RMN têm vindo a revelar-se muito úteis na avaliação da incorporação na estrutura polimérica de diferentes monómeros funcionais e especialmente na quantificação do grau de polimerização através da quantificação do número de ligações duplas (do tipo $-C=C-$) que não estiveram envolvidas no processo de polimerização (Spivak, 2005). Finalmente, o TGA é usado para caracterizar a decomposição e a estabilidade térmica da matriz polimérica. Basicamente esta técnica avalia a estabilidade térmica mediante a realização de um ensaio experimental onde é determinada a percentagem de massa de polímero perdida em função da temperatura. Nestes estudos é usual avaliar-se o comportamento do MIP e do correspondente NIP, de forma a inferir a influência da presença da molécula molde na mistura polimérica, e a consequente formação de cavidades com as propriedades mecânicas destes dois materiais (Yusof *et al.*, 2013).

Caracterização Morfológica

Dependendo do método de análise que é utilizado, a caracterização morfológica destes materiais macroporosos, permite a recolha de dados experimentais relacionados com o tamanho e a forma das partículas que constituem o polímero, do volume e do

tamanho dos poros, bem como da sua distribuição ao longo da matriz polimérica (Cormack e Elorza, 2004).

Atualmente existem várias técnicas que permitem obter informação acerca da porosidade dos MIPs, como por exemplo a porosimetria de adsorção de azoto, a porosimetria por intrusão de mercúrio, a cromatografia inversa por exclusão de tamanho (ISEC) e a análise da área superficial específica (BET) (Cormack e Elorza, 2004; Spivak, 2005). Por sua vez, o tamanho das partículas que constituem os polímeros molecularmente impressos pode ser determinado por cromatografia de permeação em gel (Pan *et al.*, 2010). Finalmente é ainda possível recorrer-se a algumas técnicas microscópicas, das quais se destacam a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e a microscopia eletrónica de transmissão (TEM), para obter informação acerca da superfície e da estrutura morfológica destes materiais porosos (Cormack e Elorza, 2004; González *et al.*, 2006; Kan *et al.*, 2008; Lok e Son, 2009).

3.3.3. Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular

Os MIPs são adsorventes poliméricos que apresentam uma intrínseca capacidade de reconhecimento molecular, a qual advém do processo de impressão molecular, pelo que é expectável que sejam capazes de reter, com uma elevada seletividade e especificidade, nos locais de ligação específicos o analito alvo. De forma a avaliar esta peculiar característica, estes materiais são submetidos a diversos estudos que visam fundamentalmente avaliar a capacidade de reconhecimento molecular, recorrendo, vulgarmente, a ensaios de adsorção em solução, bem como ao estudo do seu comportamento quando utilizados como fase estacionária em colunas cromatográficas, os quais serão detalhadamente apresentados em seguida.

Estudos de Adsorção em Solução

Os estudos de adsorção em solução são um dos métodos mais vulgarmente utilizados para avaliar a presença de cavidades e fundamentalmente a capacidade de reconhecimento molecular dos locais de ligação existentes na matriz polimérica (Lok e Son, 2009), envolvendo, de um modo geral, o procedimento experimental representado na figura 11.

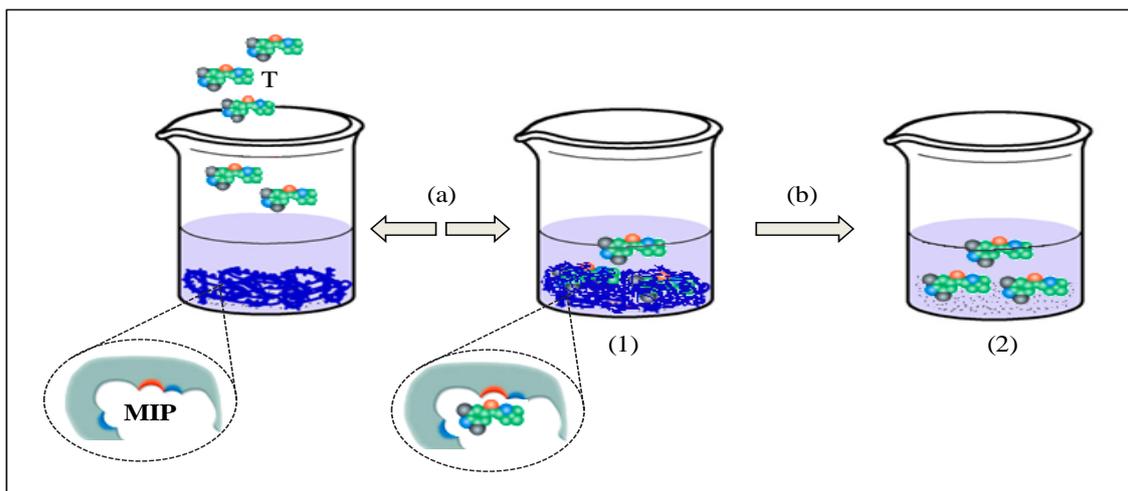


Figura 11. Representação esquemática dos estudos de adsorção em solução para avaliação da capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular. (T) Molécula molde (analito alvo); (MIP) Polímero Molecularmente Impresso (a) Agitação; (b) Remoção do MIP por centrifugação seguida de filtração; (1) Analito retido nas cavidades do MIP após se estabelecer o equilíbrio; (2) Analito livre em solução. (Adaptado de García-Calzón e Díaz-García, 2007).

Experimentalmente, o estudo inicia-se com a adição de soluções de diferentes concentrações (C_i) do analito alvo (T) a uma série de frascos contendo uma quantidade definida do polímero molecularmente impresso (MIP) e, em seguida, a suspensão é agitada (Figura 11 (a)) durante um determinado período de tempo, até que se atinga o equilíbrio. Geralmente, este período de tempo é determinado de modo a que 90 % das moléculas do analito alvo se encontrem retidas nas cavidades do MIP (Figura 11 (1)) (Sellergren, 2001a). Após a separação do polímero por filtração ou centrifugação, procede-se à determinação da concentração de analito livre (C_L) presente em solução (Figura 11 (2)) através da análise de uma alíquota do extrato recorrendo a técnicas cromatográficas adequadas para a quantificação do analito alvo em estudo (Sellergren, 2001a).

Dado que o objetivo deste estudo é a determinação da quantidade de analito retido nas cavidades do MIP (C_R), esta será calculada de forma indireta, subtraindo à concentração inicial de analito alvo (C_i) a concentração de analito livre (C_L). Usualmente, os resultados destes ensaios são expressos por massa (m) de polímero ($Q = C_R/m$), de forma a permitir a correlação dos resultados obtidos nos ensaios (Spivak,

2005). Este estudo é também efetuado, em paralelo, para o correspondente polímero não molecularmente impresso (NIP) utilizando o mesmo procedimento experimental (que se encontra esquematicamente ilustrado na Figura 11), de modo a aferir a especificidade do MIP em estudo para o analito alvo (Lok e Son, 2009).

Em termos gerais, a capacidade de um determinado material adsorver um soluto é dada pelo equilíbrio de fases e pode ser obtida em função da concentração do soluto em solução na fase líquida e da quantidade da mesma substância adsorvida no sólido. Por sua vez, as isotérmicas de adsorção são equações matemáticas desenvolvidas para descrever, em termos quantitativos, a adsorção do soluto nos sólidos, na presença de condições de pressão e temperatura constantes (Cussler, 2009). Mais precisamente, no caso particular dos polímeros molecularmente impressos, após o tratamento dos resultados obtidos através dos estudos de adsorção em solução, são usualmente traçadas as isotérmicas de adsorção para o MIP em estudo e para o respetivo NIP, de modo a obter uma visão geral da sua eficiência de adsorção (Umpleby II *et al.*, 2001b). Geralmente, com a finalidade de obter isotérmicas de adsorção representativas da capacidade de reconhecimento molecular destes sistemas de impressão molecular é necessário ajustar a quantidade de polímero e a natureza do solvente utilizado nos ensaios. A otimização do solvente é fundamental para favorecer a retenção dos analitos alvo nos locais de ligação, minimizando a existência de interações não específicas, pelo que é usual a utilização de solventes orgânicos de baixa polaridade. Por outro lado, o uso de solventes polares origina uma elevada afinidade do analito para a fase líquida, impedindo que este seja retido na matriz polimérica. Em relação à quantidade de polímero usada no ensaio esta pode, em determinadas circunstâncias, necessitar de ser aumentada de forma a permitir um incremento na sensibilidade da quantificação da capacidade de reconhecimento molecular (Spivak, 2005). A figura 12 mostra uma representação gráfica geral das isotérmicas de adsorção, que relacionam a concentração de analito que se encontra retida nas cavidades do MIP e do respetivo NIP (C_R) em função da concentração de analito livre em solução (C_L), ao longo de um determinado intervalo de concentrações.

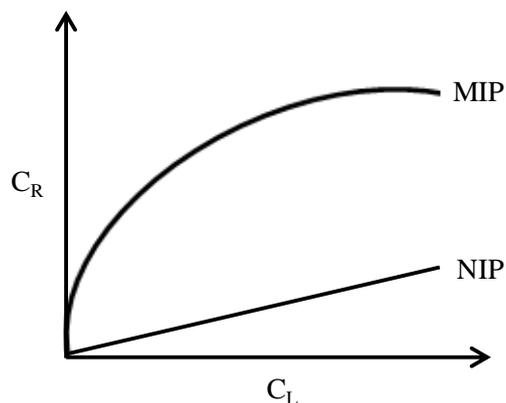


Figura 12. Representação gráfica geral das isotérmicas de adsorção referentes ao MIP e respetivo NIP (Adaptado de Spivak, 2005).

No caso particular da isotérmica correspondente ao MIP é possível diferenciar duas regiões distintas, sendo que a primeira se caracteriza por um crescimento exponencial correspondente a uma progressiva ocupação dos locais de ligação verificando-se assim um aumento na concentração de analito ligado, à medida que se incrementa a concentração do analito em solução. Apesar de nos ensaios experimentais, a concentração de analito em solução ir aumentando gradualmente, a determinada altura, não existem na matriz polimérica sítios de ligação livres para acomodar o pesticida, pelo que se atinge aquilo que é vulgarmente designado como saturação (correspondente à segunda zona do gráfico) e, que em termos de representação gráfica C_R vs C_L (figure 12) traduz-se por um valor constante de C_R .

Por observação da figura 12 é ainda notória a diferença das curvaturas das isotérmicas de adsorção para o MIP e NIP. A forma de curvatura na isotérmica de adsorção do MIP é característica deste tipo de materiais molecularmente impressos e denota a existência de locais de ligação específicos na matriz polimérica, enquanto que a forma de linha reta, observada para o NIP, sugere apenas a existência de locais de ligação não específicos.

Face ao referido anteriormente, um conhecimento aprofundado sobre as características dos locais de ligação destes sistemas de impressão molecular é crucial para avaliar a sua aplicabilidade como adsorventes seletivos. Assim, nos últimos anos, diversos estudos têm sido desenvolvidos neste âmbito, os quais evidenciaram que estes materiais poliméricos possuem locais de ligação com uma vasta gama de afinidade e

seletividade, podendo mesmo considerar-se que estas matrizes poliméricas apresentam heterogeneidade, em termos de sítios de ligação, o que indubitavelmente influencia as suas propriedades de reconhecimento molecular. A heterogeneidade é considerada por muitos autores como uma propriedade intrínseca deste tipo de materiais porosos, sendo particularmente relevante nos polímeros preparados pelo método de polimerização não-covalente que, como referido anteriormente, é o método mais vulgarmente utilizado para a síntese destes sistemas de impressão molecular (Umpleby II *et al.*, 2004). Contudo, é de salientar que a heterogeneidade não limita a capacidade e a seletividade dos MIPs mas que apenas complica uma aprofundada caracterização dos locais de ligação dos MIPs.

Assim, a representação geral das isotérmicas de ligação (Figura 12 - MIP) nem sempre traduz com exatidão a performance de ligação dos MIPs pois, por vezes, a distribuição dos diversos locais de ligação é mascarada pela curvatura da respetiva isotérmica (Umpleby II *et al.*, 2000; Umpleby II *et al.*, 2001b; Spivak, 2005). De modo a obviar esta situação e a obter informação mais detalhada acerca da natureza dos locais de ligação onde ocorre o estabelecimento de interações entre os analitos e a matriz polimérica, nomeadamente a determinação da capacidade máxima de adsorção do MIP e o cálculo de alguns parâmetros de ligação, os resultados obtidos nos ensaios de adsorção em solução, são geralmente tratados através da aplicação do método de Scatchard. Neste método é efetuada uma representação gráfica de C_R/C_L vs C_L , permitindo inferir a natureza das várias classes de locais de ligação existentes no polímero (García-Calzón e Díaz-García, 2007). Em concreto, nos casos em que se obtém uma representação coincidente com uma linha reta, significa que se está perante uma matriz polimérica que apresenta apenas uma única classe de locais de ligação, sendo que a constante de ligação é determinada através do declive da reta. No entanto, o mais frequente, é a distribuição dos resultados no gráfico se apresentar na forma de uma curva, o que é indicativo da existência de diferentes tipos de locais de ligação nos polímeros (Spivak, 2005).

As isotérmicas de adsorção são usualmente classificadas de acordo com o tipo de locais de ligação onde ocorrem as interações estabelecidas entre os analitos alvo e as superfícies com capacidade de reconhecimento molecular presentes na matriz do polímero, pelo que são divididas em duas categorias: os modelos de distribuição

discreta ou homogêneos e os modelos de distribuição contínua ou heterogêneos. Nos modelos homogêneos, assume-se que a distribuição dos locais de ligação apresenta um número finito, sendo que cada classe de local de ligação apresenta uma afinidade diferenciada. O modelo de isotérmicas de Langmuir e bi-Langmuir representam dois exemplos de modelos de ligação discretos, considerando-se a existência na matriz polimérica de apenas uma e duas classes de locais de ligação, respectivamente. Por outro lado, os modelos heterogêneos contêm um infinito número de locais de ligação com diferentes graus de afinidade e seletividade (Umpleby II *et al.*, 2004). Em concreto, as isotérmicas de Freundlich e Langmuir-Freundlich constituem exemplos de modelos de distribuição contínua.

O cálculo dos parâmetros de ligação a partir de uma isotérmica requer, na maioria das vezes, a aplicação de um modelo de ligação específico, tendo em conta as características do material em estudo. De entre os vários modelos que são descritos pela literatura, as isotérmicas de Langmuir, bi-Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich, são as mais frequentemente aplicadas à avaliação dos polímeros molecularmente impressos (Umpleby II *et al.*, 2001b; Umpleby II *et al.*, 2004; García-Calzón e Díaz-García, 2007). Cada um destes modelos atribui uma relação matemática específica entre a concentração de analito retido no polímero e a sua concentração livre em solução, sendo assumidos determinados pressupostos acerca da distribuição dos sítios de ligação. Por sua vez, o critério de seleção de um modelo de ligação é baseado principalmente na sua capacidade de reproduzir com precisão, a isotérmica experimental. A base física para o modelo deve também refletir a distribuição dos locais encontrados no sistema de medição, a fim de gerar parâmetros de ligação realistas (Umpleby II *et al.*, 2004).

Dos modelos homogêneos, as isotérmicas de Langmuir e bi-Langmuir são os sistemas mais usualmente utilizados para avaliar a capacidade de reconhecimento molecular. A isotérmica de Langmuir é um dos mais simples modelos utilizados para a representação das isoterma de adsorção, e corresponde a um tipo de interação altamente idealizada, uma vez que supõe que a superfície do polímero é constituída por um número limitado de locais de ligação nos quais as moléculas são retidas. Pressupõe ainda, que cada local tem a capacidade de captar apenas uma molécula, que todos os sítios possuem a mesma energia de ligação e que, teoricamente, não existem interações entre as moléculas adsorvidas em locais próximos (Umpleby II *et al.*, 2004; García-

Calzón e Díaz-García, 2007). Contudo, na prática, as matrizes poliméricas são caracterizadas por uma distribuição heterogênea das energias de ligação (Quiñones e Guiochon, 1996), o que torna a aplicação do modelo de Langmuir, na maioria dos casos, uma opção pouco precisa e realista. Atendendo a esta limitação, foi necessário desenvolver equações de isotérmicas mais complexas, capazes de fornecer um ajuste mais preciso e que traduzissem com mais detalhe os resultados experimentais. Assim, introduziu-se a isotérmica de bi-Langmuir, que considera que a superfície do polímero é composta por dois tipos diferentes de locais de ligação, mais precisamente os de alta energia e os de baixa energia, que por sua vez se comportam de forma independente (Umpleby II *et al.*, 2004; García-Calzón e Díaz-García, 2007).

Devido às limitações que estão associadas à utilização dos modelos de ligação discretos na caracterização da heterogeneidade dos MIPs, recentemente têm sido propostos vários modelos de distribuição contínua, dos quais se destacam as isotérmicas de Freundlich e de Langmuir-Freundlich. Estes modelos fornecem aproximações cada vez mais precisas para a heterogeneidade presente na maioria dos polímeros molecularmente impressos, sendo que através destes modelos é ainda possível obter valores quantitativos da sua heterogeneidade (Umpleby II *et al.*, 2004).

A isotérmica de Freundlich é uma fórmula empírica que considera que a matriz polimérica apresenta uma superfície heterogênea, com diferentes tipos de interações, e tem sido geralmente aplicada a MIPs obtidos por processos não-covalentes (Rampey *et al.*, 2004). De um modo geral, o modelo de Freundlich é caracterizado por representar uma ampliação do modelo de Langmuir, neste caso particular, aplicado a uma superfície heterogênea, pois sugere que a energia de adsorção decresce logarithmicamente à medida que a superfície fica coberta pelo analito alvo. Uma vez que este modelo prevê que a quantidade do analito alvo adsorvido na matriz polimérica aumenta indefinidamente com a concentração de analito em solução, esta equação empírica é apenas adequada para superfícies altamente heterogêneas (Umpleby II *et al.*, 2001a; Umpleby II *et al.*, 2004; Rampey *et al.*, 2004; Rusnton *et al.*, 2005), e por outro lado, muitas vezes apenas representa os valores típicos de adsorção para uma gama restrita de concentrações, sendo apenas eficiente para as regiões das isotérmicas antes de se dar a saturação (García-Calzón e Díaz-García, 2007).

A isotérmica de Langmuir-Freundlich surge como a combinação de dois dos modelos anteriormente descritos (Langmuir e Freundlich), ou seja, é uma fórmula empírica que leva em consideração a heterogeneidade da superfície do adsorvente e as interações que são estabelecidas pelos analitos alvo adsorvidos no polímero. Este modelo foi desenvolvido com o objetivo de solucionar as limitações que são inerentes às respetivas isotérmicas de ligação, nomeadamente o facto da isotérmica de Freundlich não prever um valor máximo da quantidade adsorvida para as concentrações elevadas da solução (García-Calzón e Díaz-García, 2007).

Em suma, o modelo de Langmuir-Freundlich é considerado como um sistema universalmente aceite para descrever o comportamento de adsorção dos analitos alvo, relativamente aos polímeros molecularmente impressos, pois mostra-se adequado para descrever a adsorção tanto em superfícies homogêneas como heterogêneas e, ao contrário das isotérmicas de Freundlich, este modelo pode ser aplicado de modo a melhorar o ajuste para uma gama mais abrangente de concentrações em ambas as zonas da isotérmica (antes da saturação e na saturação) (Umpleby II *et al.*, 2001a; Umpleby II *et al.*, 2004).

Avaliação Mediante a Utilização dos MIPs como Fase Estacionária em Colunas Cromatográficas

Como referido anteriormente, as características peculiares dos polímeros molecularmente impressos torna-os extremamente versáteis podendo ser utilizados como adsorventes de fase estacionária em colunas cromatográficas. O facto de estes materiais serem sólidos possibilita o seu empacotamento nas colunas e, desta forma, proporciona um método alternativo, porém, rápido e fácil para avaliar as propriedades de reconhecimento molecular destas matrizes poliméricas (Spivak, 2005).

Para a realização deste estudo, os polímeros são utilizados como fase estacionária de colunas cromatográficas, pelo que são triturados (esta etapa é particularmente relevante para a polimerização via *bulk*) e em seguida são peneirados para obter partículas de dimensões adequadas e regulares, mais precisamente na ordem dos micrómetros (por exemplo entre 20-25 μm). De seguida, as partículas obtidas são empacotadas em colunas de aço inoxidável que por sua vez são acopladas ao respetivo sistema cromatográfico (HPLC). A possibilidade da presença de moléculas molde na

estrutura tridimensional da matriz polimérica e a sua eluição quando utilizada como fase estacionária em colunas cromatográficas, constitui um fenómeno que é vulgarmente designado de *bleeding* (sangramento), pelo que é imperativo averiguar a sua ocorrência mediante a análise da fração eluída da coluna recorrendo a técnicas de cromatografia líquida com detetores apropriados. Posteriormente, a coluna deve ser equilibrada até se obter uma linha de base estável. Após as fases preliminares de preparação da coluna cromatográfica, seguem-se os ensaios com o objetivo de investigar as capacidades de reconhecimento molecular destes materiais poliméricos, de acordo com o procedimento experimental ilustrado na figura 13.

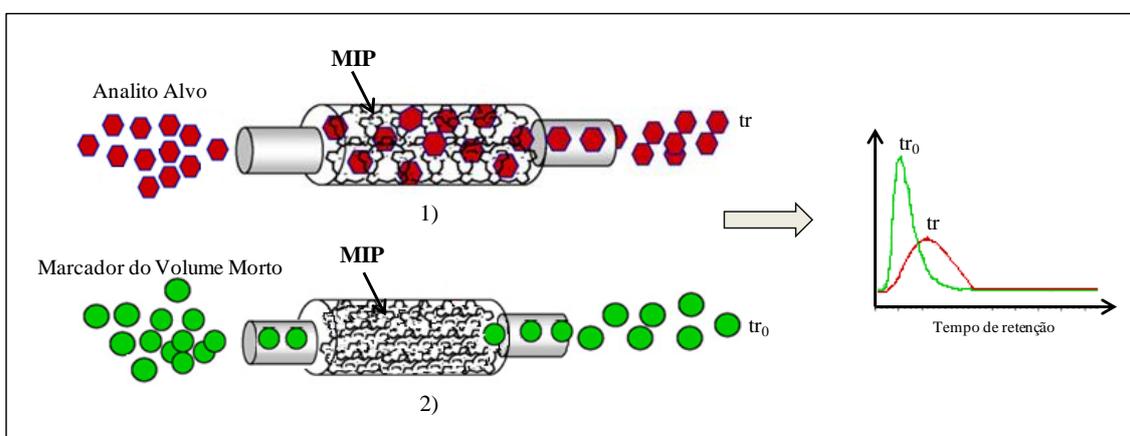


Figura 13. Princípio geral da avaliação cromatográfica dos polímeros molecularmente impressos através do uso destes materiais como adsorventes de fase estacionária em cromatografia líquida. Análise do analito alvo (1) e subsequentemente análise do marcador de volume morto (2) (Adaptado de García-Calzón e Díaz-García, 2007).

Os estudos iniciam-se pela injeção num sistema de cromatografia líquida de uma alíquota de uma solução contendo uma concentração conhecida do analito alvo (Figura 13 - 1) de modo a determinar o tempo de retenção da substância em análise. Em seguida, é repetido o procedimento anterior, sendo neste caso, injetado uma alíquota de um determinado solvente que será usado como marcador do volume morto e registado o seu tempo de retenção (Figura 13 - 2). A escolha deste solvente é efetuada com base no facto de este não apresentar capacidade para ficar retido na fase estacionária da coluna, pelo que são usualmente utilizados como marcadores de volume morto a acetona ou o tolueno. Este estudo é também efetuado para o correspondente polímero não molecularmente impresso utilizando o mesmo procedimento experimental, de modo a

aferir a especificidade do MIP em análise para o respetivo analito alvo (Ambrosini *et al.*, 2011). Esta abordagem permite ainda testar a afinidade do MIP para análogos estruturais do analito alvo, mediante injeção na coluna cromatográfica de soluções padrão destes compostos, pelo que este ensaio contribui adicionalmente para testar a seletividade dos MIPs face a compostos com estruturas similares às do analito alvo (Caro *et al.*, 2003; Chapuis *et al.*, 2004).

À semelhança do que acontece com os estudos de adsorção em solução, estes ensaios possibilitam também a determinação de alguns parâmetros relevantes para inferir as interações estabelecidas entre o analito alvo e os locais de ligação existentes nos polímeros. Em analogia, as equações utilizadas para avaliar cromatograficamente os MIPs são proporcionais às aplicadas nos estudos de adsorção em solução (Ringo e Evans, 1998; Spivak, 2005). Mais especificamente, a equação fundamental que relaciona os estudos de adsorção em solução com a avaliação cromatográfica é: $K = k/\emptyset$, na qual K é a constante de dissociação, \emptyset corresponde à razão entre o volume da fase estacionária e o volume da fase móvel, e k é o fator de retenção, que é calculado utilizando a fórmula: $k = (t_r - t_0)/t_0$, na qual o t_r corresponde ao tempo de retenção do analito alvo e o t_0 ao tempo de retenção do solvente que é usado como marcador do volume morto (Spivak, 2005; Lv *et al.*, 2007). De seguida é ainda possível calcular o fator de impressão (IF) do polímero em estudo, através da fórmula: $IF = (k_{MIP}/k_{NIP})$, correspondendo o k_{MIP} ao fator de retenção do polímero molecularmente impresso e o k_{NIP} ao fator de retenção do correspondente polímero não molecularmente impresso (Spivak, 2005). Nalguns casos mais específicos, pode também calcular-se o fator de seletividade (α), através da equação: $\alpha = (k_2/k_1)$, onde k_2 é o fator de retenção do analito alvo, e k_1 é o fator de retenção do análogo estrutural, e o fator de seletividade específica (S) utilizando a seguinte fórmula: $S = (IF_1/IF_2)$ (Selligren, 2001a; Selligren, 2001b; Spivak, 2005; Lasáková e Jandera, 2009).

A utilização desta metodologia para a avaliação da capacidade de reconhecimento molecular, quando comparada com os estudos de adsorção em solução, possui como principal desvantagem, o facto da quantidade de analito alvo que pode ser utilizada durante a análise cromatográfica ser limitada a um intervalo muito reduzido, o que impede a determinação da distribuição dos locais de ligação existentes na matriz polimérica. Por outro lado, a comparação dos dados cromatográficos só é significativa

se os ensaios forem conduzidos sob o mesmo conjunto de condições (por exemplo: fase móvel e temperatura) (Spivak, 2005). É ainda de salientar que as interações que se estabelecem entre os sistemas de impressão molecular que constituem a fase estacionária e o analito alvo são relativamente fracas, pelo que os valores dos diferentes parâmetros determinados por esta técnica são geralmente baixos relativamente aos estudos de adsorção em solução (Umpleby II *et al.*, 2004).

3.4. Metodologia de Preparação de Amostra Baseada na Utilização de Polímeros Molecularmente Impressos

Apesar de a etapa de preparação de amostra constituir um passo preliminar no processo de análise existe uma crescente consciencialização de que esta assume um papel crucial podendo, caso não seja adequadamente aplicada, comprometer o sucesso da determinação analítica. Este aspeto torna-se particularmente relevante em amostras que possuem uma elevada complexidade química. Os métodos de preparação de amostras podem ser aplicados com inúmeras finalidades, das quais se destacam a remoção de potenciais compostos interferentes, a pré-concentração do analito alvo e a conversão do analito numa forma adequada para a posterior deteção e quantificação, contudo devem na globalidade permitir o desenvolvimento e implementação de uma metodologia robusta e reproduzível, com capacidade para ultrapassar as dificuldades inerentes à análise de amostras complexas (Hu *et al.*, 2013; Martín-Esteban, 2013).

Na literatura, os polímeros molecularmente impressos tem vindo a ser referenciados como materiais adsorventes seletivos extremamente promissores na implementação de metodologias de preparação de amostras. Esta evidência pode ser comprovada pelo crescente número de artigos científicos que têm sido publicados nesta área nas últimas décadas (Alexander *et al.*, 2006; Whitcombe *et al.*, 2014). Entre estas publicações existe um considerável número de aplicações bem-sucedidas que demonstram que a utilização dos MIPs na preparação de amostras é uma técnica bastante eficaz na pré-concentração/ isolamento e extração seletiva de diversos compostos presentes em quantidades vestigiais em matrizes que possuem uma elevada complexidade (Caro *et al.*, 2003; Pichon, 2007; Tamayo *et al.*, 2007; Martín-Esteban, 2013).

A utilização dos MIPs como materiais adsorventes em extração em fase sólida, vulgarmente denominado de MISPE, tem vindo a ser a técnica de preparação de amostra, baseada nestas matrizes poliméricas, mais utilizada devido à sua versatilidade e simplicidade. Desde que foi implementada por Sellergren no início da década de 90 (Sellergren, 1994), a utilização desta metodologia tornou-se amplamente aceite no seio da comunidade científica, devido à eficiente e seletiva capacidade que apresenta para a extração de inúmeros compostos de diversas matrizes (Hu *et al.*, 2013; Martín-Esteban, 2013).

No entanto, nos últimos anos, tem vindo a assistir-se a uma intensa investigação na preparação de polímeros molecularmente impressos, bem como, na sua aplicação na conceção e desenvolvimento de novas metodologias de preparação de amostra, mediante a combinação da tecnologia de impressão molecular com várias técnicas de preparação de amostra já utilizadas vulgarmente em química analítica, como ilustrado na figura 14 (Garcia *et al.*, 2011; Vasapollo *et al.*, 2011 Hu *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014).

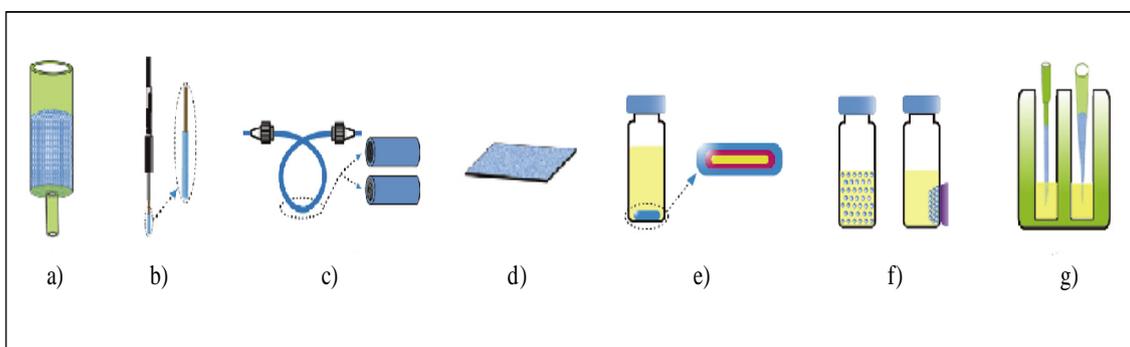


Figura 14. Aplicação da tecnologia de impressão molecular a diferentes técnicas de preparação de amostra: a) SPE; b) fibra de SPME; c) tubo capilar de SPME; d) membranas; e) SBSE; f) partículas magnéticas; g) agulha/ ponta de micropipeta (Adaptado de Hu *et al.*, 2013).

Com a finalidade de desenvolver instrumentos de análise com base em sistemas analíticos miniaturizados, de fácil manuseamento e automatização surgiu a ideia de combinar os MIPs com a microextração em fase sólida (SPME) (Koster *et al.*, 2001; Martín-Esteban, 2013). A aplicação desta técnica tem despertando um crescente interesse, pois permite integrar todo o processo de preparação da amostra, inclusive a

extração e a concentração dos analitos de interesse, bem como a injeção da amostra numa única etapa, tornando-a numa técnica simples, eficiente e isenta do uso de solventes. Por outro lado, tem ainda como vantagem o fato de poder ser acoplada com sucesso a uma variedade de técnicas analíticas, tais como a cromatografia (Hu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013), permitindo efetuar de imediato a análise quantitativa da substância em estudo.

Nos últimos anos, com a evolução da investigação e o constante desenvolvimento e modernização das metodologias analíticas, os MIPs são apresentados de variadas formas e têm vindo a ser utilizados como materiais adsorventes de inúmeras técnicas de extração. Para além das técnicas anteriormente abordadas, ao longo da literatura é também referida a associação destes materiais à dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (Tang *et al.*, 2006), à extração sorptiva com barra de agitação (SBSE) (Yang *et al.*, 2010), a sua aplicação a esferas magnéticas (Zang *et al.*, 2011), são ainda utilizados como revestimento de membranas (Ulbricht, 2004) e, mais recentemente, têm sido introduzidos novos formatos de dispositivos que têm como base a micro extração em fase sólida, mais concretamente os polímeros molecularmente impressos são utilizados como revestimento da superfície interna de agulhas (Wei *et al.*, 2007; Djozan *et al.*, 2012) e de pontas de micropipetas (Zhou *et al.*, 2010).

Atualmente, têm vindo a ser exploradas novas abordagens para a obtenção de materiais nanoestruturados, que resultam da aplicação da tecnologia de impressão molecular na síntese de nanopartículas e a sua subsequente utilização na etapa de preparação de amostra. Idealmente, estes novos materiais apresentam propriedades excecionais e, deste modo, tem despertando bastante interesse na comunidade científica, pois permite obter materiais adsorventes altamente seletivos que possuem uma elevada área superficial específica. Adicionalmente, estes novos materiais apresentam ainda como vantagens uma maior facilidade de remoção da molécula molde aquando da sua síntese bem como um incremento na acessibilidade dos analitos alvos aos locais de ligação, promovendo uma melhoria na sua capacidade de extração tornando-os, por isso, particularmente promissores na implementação de novas metodologias de preparação de amostra (Tokonami *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013).

3.4.1. Aplicação como Adsorventes de Extração em Fase Sólida

O método de extração em fase sólida, vulgarmente denominado de SPE (do inglês Solid Phase Extraction), tal como o próprio nome indica é uma técnica de extração líquido-sólido baseada no mesmo princípio dos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica. Concretamente, os analitos a extrair sofrem processos de partição/ distribuição entre a fase sólida (adsorvente de empacotamento de SPE) e uma fase líquida (eluente). Assim, de modo a que a extração seja eficiente o analito deverá possuir uma elevada afinidade para a fase sólida, de modo a ficar retido e a permitir a posterior eluição por aplicação de um solvente adequado, numa fração de eluído que idealmente se encontra isenta da presença de compostos interferentes. Devido à elevada versatilidade e simplicidade na sua utilização, esta técnica tem sido extensivamente utilizada na preparação de amostras de uma variada gama de matrizes, nomeadamente ambientais, alimentares, biológicas e farmacêuticas. Em termos gerais, o SPE permite a extração e pré-concentração dos analitos alvo, revelando-se este aspeto particularmente relevante quando estes se encontram presentes em quantidades vestigiais na amostra em análise. Outras funcionalidades atribuídas ao SPE encontram-se ainda relacionadas com a remoção de alguns compostos interferentes presentes na matriz e que poderia, caso não fossem eliminadas, interferir na análise quantitativa das substâncias em estudo, bem como a possibilidade de converter o meio de solubilização do analito em estudo, num meio adequado para a posterior análise cromatográfica (Buszewski e Szultka, 2012). As vantagens inerentes à técnica de SPE impulsionaram a introdução de diversos materiais adsorventes com características químicas diferenciadas na tentativa de desenvolver metodologias de preparação de amostra que permitam a extração com elevada eficiência dos analitos com propriedades químicas muito diferentes de modo a alargar a gama de aplicabilidade desta técnica de preparação de amostra. Assim, de acordo com o tipo de analito alvo em estudo é possível selecionar o adsorvente de empacotamento de SPE mais apropriado, a fim de obter uma maior eficiência de extração. De entre os diferentes materiais adsorventes que atualmente se encontram disponíveis comercialmente destacam-se os adsorventes tradicionais de fase reversa (C_{18} e C_8), fase normal (sílica e alumina), troca iónica, combinação de troca iónica e fase reversa, assim como resinas funcionalizadas baseadas em polímeros de estireno-divinilbenzeno (SDVB) (Buszewski e Szultha, 2012). Contudo, apesar de todas as vantagens que se encontram associadas a esta técnica de extração, os adsorventes anteriormente mencionados possuem, regra

geral, uma reduzida seletividade e baixa sensibilidade para os analitos alvo, dificultando a sua aplicação, particularmente no caso de matrizes complexas (Hennion e Pichon, 2003; Baggiani *et al.*, 2007).

Recentemente, o desenvolvimento da tecnologia de impressão molecular e a subsequente obtenção de materiais poliméricos com capacidade de reconhecimento molecular, que é definida à priori aquando da síntese polimérica, impulsionou a comunidade científica a explorar a utilidade destas matrizes poliméricas como adsorventes de extração em fase sólida dado que, previsivelmente, devido à seletividade conferida pelo processo de síntese permitirá ultrapassar as limitações associadas ao uso dos adsorventes convencionais na técnica de SPE (Sellergren, 1994; Vasapollo *et al.*, 2011).

O procedimento experimental da metodologia MISPE é idêntico ao utilizado em SPE convencional, apenas diferem no tipo de adsorventes usados como fase estacionária, pelo que no MISPE as usuais fases estacionárias empregues em SPE são substituídas por polímeros molecularmente impressos.

A implementação da metodologia MISPE pressupõe uma etapa preliminar que envolve o empacotamento dos MIPs em cartuchos de SPE pelo que é vulgarmente designado por sistema *off-line*. Esta aproximação constitui uma abordagem promissora para a preparação de amostras cuja composição química é de grande complexidade uma vez que, para além de, requerer o uso de instrumentação rotineira de laboratório, pouco dispendiosa, de fácil manuseamento, possibilitando a aplicação de condições drásticas (solventes de diferentes polaridades e pHs) nas diferentes etapas de extração, sem comprometer a integridade da instrumentação analítica e das colunas cromatográficas, alia também o facto de permitir atingir níveis de seletividade que as técnicas de SPE convencionais dificilmente conseguem alcançar (Diron *et al.*, 2002; He *et al.*, 2007; Pichon e Chapuis-Hugon, 2008; Vasapollo *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013).

Experimentalmente, no sistema *off-line*, os MIPs são convenientemente acondicionados entre dois filtros, geralmente de polietileno, num cartucho de SPE (de vidro ou polipropileno), constituindo a fase estacionária de SPE (Chapuis *et al.*, 2003; Caro *et al.*, 2006; Pichon e Chapuis-Hugon, 2008). O procedimento geral MISPE encontra-se esquematicamente representado na figura 15.

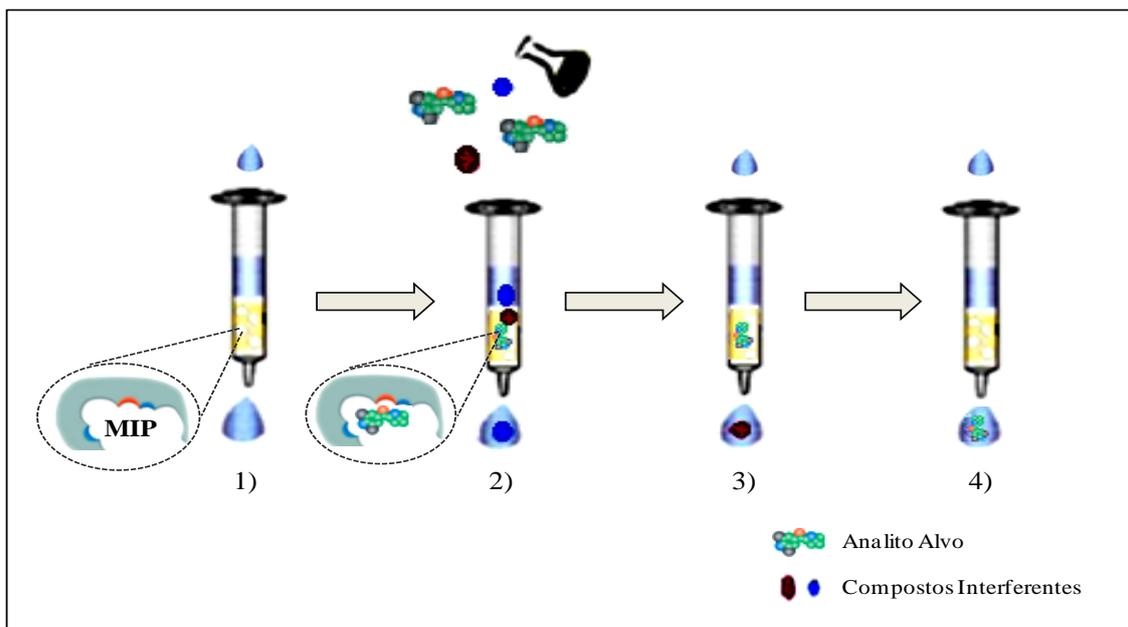


Figura 15. Representação esquemática das diferentes etapas do processo de extração MISPE. 1) Acondicionamento do adsorvente; 2) Aplicação da amostra; 3) Remoção dos compostos interferentes; 4) Eluição do analito alvo (Adaptado de Garcia *et al.*, 2011).

O procedimento MISPE inicia-se com a etapa de acondicionamento do material adsorvente (passo 1), que consiste, geralmente, em fazer passar pela coluna de extração o mesmo solvente que será utilizado na etapa de eluição dos analitos de interesse, de modo a eliminar eventuais impurezas. De seguida faz-se passar pela coluna o mesmo solvente que é usado na aplicação da amostra, isto é, o solvente no qual os analitos alvos se encontram solubilizados, com o objetivo de eliminar os vestígios do solvente inicialmente aplicado, cuja presença pode comprometer a eficiência de extração (He *et al.*, 2007). Mais especificamente, a realização da etapa de acondicionamento destina-se a ativar os locais de ligação existentes nos polímeros utilizados como fases estacionárias, maximizando a sua interação com os analitos alvo presentes na amostra (Caro *et al.*, 2006).

De seguida, após a etapa de acondicionamento, procede-se à aplicação da amostra (passo 2), e é neste passo que os analitos interagem com os locais de ligação existentes nestes sistemas de impressão molecular ocorrendo, seletivamente, a sua retenção na fase estacionária. É de referir que, a escolha do solvente no qual é solubilizado a amostra é crucial para o sucesso de todo o processo extrativo, dada a influência que este exerce na capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros

molecularmente impressos (Pap *et al.*, 2002; He *et al.*, 2007). Assim, de um modo geral, o solvente utilizado durante a aplicação da amostra depende essencialmente do tipo de interações que são estabelecidas entre a molécula molde e o monómero funcional durante o processo de polimerização e ainda da natureza do solvente porogénico que é utilizado durante a síntese (Martín-Esteban, 2001; Bui e Haupt, 2010). Atendendo a que, na maioria dos casos, as interações que são estabelecidas entre os analitos e os locais de ligação são promovidas por forças electrostáticas, tais como as pontes de hidrogênio, interações iónicas ou ligações π - π (Pap *et al.*, 2002), a aplicação da amostra deve ser realizada por meio de solventes de baixa polaridade, sendo que em alguns casos, a utilização do mesmo solvente que é usado durante a síntese pode favorecer o aumento da capacidade de reconhecimento molecular. Este passo deve ser realizado de forma lenta (1-2 gotas/ segundo), para que toda a fase estacionária seja uniformemente utilizada, garantindo uma maior retenção dos analitos a extrair (Spivak *et al.*, 1997).

Em matrizes complexas, após a aplicação da amostra é imperativo efetuar uma etapa de limpeza, vulgarmente designada de lavagem (passo 3), de modo a remover os compostos interferentes retidos na matriz polimérica através de ligações não específicas sem, no entanto, remover os analitos alvo (Caro *et al.*, 2004; Caro *et al.*, 2006), recorrendo-se geralmente, para este fim a solventes de baixa polaridade ou a misturas entre eles (Caro *et al.*, 2003; Chapuis *et al.*, 2003; Chapuis *et al.*, 2004). No entanto, alguns autores afirmam que o reconhecimento molecular pode ser incrementado quando o solvente porogénico utilizado na síntese polimérica é usado como solvente de lavagem, uma vez que nestas condições é reproduzido o ambiente criado durante a síntese (Ferrer *et al.*, 2000; Chapuis *et al.*, 2003).

Por fim, a última etapa do MISPE, consiste em eluir as substâncias em estudo (passo 4), mediante a aplicação de pequenos volumes de um solvente que possua polaridade adequada para quebrar as ligações existentes entre os monómeros funcionais existentes nos locais de ligação das fases estacionárias e os analitos. Habitualmente, nesta etapa, são utilizados solventes polares, tais como o acetonitrilo e o metanol contudo, nalguns casos mais específicos, quando são estabelecidas interações fortes entre os analitos e o material polimérico, pode ser necessário a adição de pequenas quantidades de determinadas substâncias (1-10%) tais como a água, ácidos fracos (ácido acético ou ácido trifluoroacético) ou bases fracas (triethylamina ou piridina) aos solventes

de eluição, de modo a remover a totalidade dos analitos, a fim de garantir elevadas taxas de recuperação (He e Liu, 2007; Caro *et al.*, 2006). Após a eluição, a fração obtida é geralmente evaporada até à secura, e o resíduo seco é dissolvido num solvente apropriado. Em seguida, esta solução, que contém os analitos alvo é analisada utilizando fundamentalmente técnicas cromatográficas, tais como a cromatografia líquida e a cromatografia em fase gasosa (Carabias-Martínez *et al.*, 2005; Bui e Haupt, 2010).

É de salientar que, a implementação da metodologia MISPE deverá permitir o isolamento/ pré-concentração dos compostos de interesse com elevada eficiência e, idealmente, isenta da presença de substâncias interferentes, pelo que é fundamental tomar em consideração todos os parâmetros que influenciam a retenção dos analitos alvo. Assim, reveste-se da maior importância a realização de uma meticulosa otimização de diversos fatores que intervêm e que influenciam o processo extrativo, nomeadamente a quantidade de polímero, a natureza e o volume dos solventes utilizados em cada etapa, a quantidade e o volume de amostra aplicada, bem como o fluxo de eluição nas diversas etapas do processo de extração (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008).

Recentemente, assistiu-se à implementação da metodologia MISPE em sistemas *on-line*, a qual é o culminar de um esforço da comunidade científica na tentativa de introduzir automatização às técnicas de preparação de amostra baseadas em extração em fase sólida recorrendo a adsorventes seletivos. Neste sistema os polímeros são empacotados em pré-colunas de HPLC, as quais são acopladas ao sistema cromatográfico, apresentando como principais vantagens a redução da manipulação da amostra, minimizando a eventual perda dos analitos alvo, e o maior controlo, e em tempo real, de todo o processo extrativo (Masqué *et al.*, 2000; Caro *et al.*, 2006; Baggiani *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2011).

Em suma, a metodologia MISPE tem vindo a assumir um papel de destaque na área da preparação de amostra, sendo-lhe reconhecidas propriedades únicas, tais como a economia aliada à reutilização, a rapidez e facilidade de execução, a versatilidade e a elevada eficiência de extração que resulta da sua intrínseca seletividade e especificidade no reconhecimento molecular dos analitos alvo. Estes atributos têm contribuído de forma decisiva para uma ampla implementação da metodologia MISPE como uma técnica de preparação de amostra altamente seletiva na análise de diversos analitos com

propriedades químicas diferenciadas numa gama muito diversificada de matrizes (Baggiani *et al.*, 2007).

3.4.1.1. Detecção e Quantificação de Pesticidas Utilizando a Metodologia MISPE

Os polímeros molecularmente impressos, quando utilizados como fases estacionárias na extração em fase sólida (MISPE), são considerados como uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de metodologias altamente eficientes e seletivas para a extração de resíduos de pesticidas presentes em diferentes amostras alimentares (Cacho *et al.*, 2003; Chapuis *et al.*, 2004; Lv *et al.*, 2007; Chimuka *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013).

A aplicação da metodologia MISPE com vista ao isolamento de resíduos de pesticidas da matriz azeite tem sido bastante limitada, restringindo-se apenas aos trabalhos desenvolvidos por Bakas e seus colaboradores e que originaram a publicação de três artigos científicos em revistas internacionais com arbitragem científica (Bakas *et al.*, 2012; Bakas *et al.*, 2013; Bakas *et al.*, 2014). Estes estudos incidiram essencialmente na implementação da metodologia MISPE na extração seletiva de diferentes pesticidas pertencentes à classe dos organofosforados, presentes na matriz azeite.

De acordo com a literatura, a aplicação dos polímeros molecularmente impressos na extração de pesticidas a partir da matriz azeite, foi realizada pela primeira vez por Bakas e seus colaboradores em 2012 (Bakas *et al.*, 2012) envolvendo, a síntese de um MIP específico para a extração seletiva de metidatião. Esta equipa de investigação recorreu previamente a estudos computacionais, os quais permitiram otimizar e seleccionar os monómeros funcionais mais adequados para a posterior síntese dos MIPs. De seguida, com base nos resultados obtidos, os MIPs foram sintetizados através da técnica de polimerização via *bulk*, mediante a ação térmica, utilizando diferentes monómeros funcionais, tais como o N, N'-metileno bisacrilamida (MBAA), o ácido itacónico (IA), o ácido metacrílico (MAA) e o 2-(trifluorometil) ácido acrílico (TFMAA), como molécula molde foi usado o metidatião, como agente de ligação cruzada utilizaram o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), por sua vez o 1,1'-asobisisobutironitrilo (AIBN) foi aplicado como agente de iniciação radicalar e

finalmente como solvente porogénico usou-se a dimetilformamida (DMF), numa razão estequiométrica de 1:4:20 (T:M:A). Em paralelo, foi ainda sintetizado o respetivo polímero não molecularmente impresso (NIP), que foi obtido reproduzindo as mesmas condições de polimerização, à exceção da adição da molécula molde. Com o objetivo de avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos diferentes polímeros molecularmente impressos sintetizados, foram calculados experimentalmente os fatores de impressão (IF) para cada sistema de impressão molecular. Posteriormente, os valores de IF foram comparados com os resultados obtidos pelos estudos computacionais, permitindo concluir que o MIP sintetizado com o monómero funcional MBAA era o que apresentava uma maior capacidade de reconhecimento molecular, pelo que foi selecionado para a posterior aplicação como material adsorvente na metodologia MISPE. A implementação da metodologia MISPE foi precedida por diversos estudos envolvendo a otimização dos diferentes parâmetros que influenciam a eficiência de extração e que englobam a técnica MISPE. Por sua vez, esta metodologia foi testada utilizando amostras de azeite, às quais foram adicionadas concentrações conhecidas de metidatião, numa gama de concentrações coincidente com os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação. Os resultados obtidos evidenciaram que a metodologia de preparação de amostra baseada na técnica MISPE proposta pelos investigadores possibilitava uma extração eficiente do pesticida em estudo, com taxas de recuperação superiores a 90 %.

Um ano mais tarde, em 2013, a mesma equipa de investigação desenvolveu um polímero molecularmente impresso para a extração seletiva de dimetoato presente em amostras de azeite (Bakas *et al.*, 2013). Para a concretização deste objetivo, a equipa de investigação realizou, primeiramente, alguns estudos computacionais cujos resultados permitiram direcionar o “design” de novas matrizes poliméricas, nomeadamente no que diz respeito à seleção dos monómeros funcionais a utilizar na polimerização. De seguida, os investigadores procederam à síntese de diferentes MIPs de acordo com as seguintes condições: como moléculas molde utilizaram o dimetoato e dois dos seus análogos funcionais e estruturais (ometoato e monocrotófos), o IA, MAA e TFMAA foram usados como monómeros funcionais, como agente de ligação cruzada utilizaram o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), o 1,1'-asobisisobutironitrilo (AIBN) foi aplicado como agente de iniciação radicalar e a dimetilformamida (DMF) como solvente porogénico. A síntese foi conduzida utilizando a via de polimerização *bulk*,

mediante a ação térmica, numa razão estequiométrica de 1:4:20 (T:M:A). Em paralelo, foi ainda sintetizado o respetivo polímero não molecularmente impresso (NIP). Os vários polímeros obtidos foram esmagados, moídos e peneirados, as partículas com tamanho adequado foram recolhidas e lavadas de modo a remover eventuais resíduos dos compostos usados durante a síntese, finalmente os diferentes MIPs foram acondicionados em colunas de SPE e foram calculados experimentalmente os respetivos valores de IF. Com base nos resultados obtidos, Bakas e os seus colaboradores concluíram que o MIP sintetizado com o monómero funcional IA e a molécula molde ometoato era o que apresentava uma maior capacidade de reconhecimento molecular, pelo que foi selecionado para a posterior aplicação na extração em fase sólida. Após a otimização das condições de extração, a metodologia MISPE desenvolvida neste trabalho foi aplicada com sucesso para a extração de dimetoato presente em amostras de azeite, com taxas de recuperação superiores a 94 %.

Mais recentemente, em 2014, Bakas e os seus colaboradores desenvolveram um polímero molecularmente impresso, com capacidade para extrair de forma seletiva resíduos de fentião presentes em amostras de azeite (Bakas *et al.*, 2014). Para atingir esse objetivo, foram utilizadas duas metodologias distintas para a identificação dos monómeros funcionais que apresentavam maior afinidade para as moléculas de fentião. Os autores recorreram aos estudos computacionais para avaliar as interações que eram estabelecidas entre a molécula molde e os monómeros funcionais em estudo, e em seguida calcularam experimentalmente a capacidade de ligação de diferentes NIPs sintetizados com os respetivos monómeros funcionais em estudo. De acordo com os resultados obtidos, a acrilamida foi selecionada para ser utilizada como monómero funcional na síntese do MIP. A síntese foi então conduzida utilizando a via de polimerização *bulk*, mediante a ação térmica, numa razão estequiométrica de molécula molde (fentião), monómero funcional (acrilamida) e agente de ligação cruzada (EGDMA) de 1:4:20, e o AIBN como iniciador radicalar. Em paralelo foi também sintetizado o respetivo NIP. Após a síntese, o MIP e o correspondente NIP foram devidamente acondicionados em colunas de SPE, em seguida os investigadores procederam à otimização das diferentes condições de extração e, por sua vez, a metodologia MISPE foi ainda usada para avaliar a seletividade do MIP em estudo, relativamente a diferentes pesticidas pertencentes à classe dos organofosforados. Finalmente, a metodologia MISPE implementada neste trabalho de investigação foi

validada utilizando amostras reais de azeite dopadas com concentrações de fentião próximas do LMR, sendo que os resultados obtidos demonstraram a aplicabilidade desta metodologia para a determinação de resíduos do pesticida alvo em amostras complexas, como é o caso particular do azeite, com taxas de recuperação superiores a 96 %.

Em suma, de acordo com os resultados obtidos ao longo dos trabalhos realizados por Bakas e seus colaboradores, e atendendo à elevada complexidade que esta matriz apresenta, prevê-se que a aplicação da metodologia MISPE seja uma técnica extremamente poderosa, capaz de suprimir as limitações que as metodologias de preparação de amostra, até então desenvolvidas, apresentam para a extração e pré-concentração de resíduos de pesticidas presentes no azeite.

3.5.Referências Bibliográficas

Alexander C., Andersson H. S., Andersson L. I., Ansell R. Kirsch J. N., Nicholls I. A., O'Mahony J., Whitcombe M. J. (2006). Review Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, **19**, 106-180.

Ambrosini S., Serra M., Shinde S., Sellergren B., Lorenzia E. (2011). Synthesis and chromatographic evaluation of molecularly imprinted polymers prepared by the substructure approach for the class-selective recognition of glucuronides. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 6961-6969.

Amvrazi E., Albanis T. A. (2008). Multiclass Pesticide Determination in Olives and Their Processing Factors in Olive Oil: Comparison of Different Olive Oil Extraction Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 5700-5709.

Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, **86**, 412-431.

Andersson L., Sellergren B., Mosbach K. (1984). Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Letters*, **25**, 5211-5214.

Ansell R. J., Kriz D., Mosbach K. (1996). Molecularly imprinted polymers for bioanalysis: chromatography, binding assays and biomimetic sensors. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 89-94.

Augusto F., Caraek E., Silva R. G. C., Rivellino S. R., Batista A. D., Martendal E. (2010). New sorbents for extraction and microextraction techniques. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2533-3542.

Baggiani C., Anfossi L., Giovannoli C. (2007). Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, **591**, 29-39.

Bakas I., Oujji N. B., Istamboulié G., Piletsky S., Piletska E., Ait-Addi E., Ait-Ichou I., Noguera T., Rouillon R. (2014). Molecularly imprinted polymer cartridges coupled to high performance liquid chromatography (HPLC-UV) for simple and rapid analysis of fenthion in olive oil. *Talanta*, **125**, 313-318.

Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istamboulié G., Piletskyc S., Piletska E., Ait-Ichoub I., Ait-Addib E., Noguera T., Rouillona R. (2012). Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, **734**, 99-105.

Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istamboulié G., Piletsky S., Piletska E., Ait-Addi E., Ait-Ichou I., Noguera T., Rouillona R. (2013). Computational and experimental investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil. *Journal of Chromatography A*, **1274**, 13-18.

Ballesteros E., García-Sánchez A., Martos N. R. (2006). Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1111**, 89-96.

- Barker S. A., Long A. R. Short C. R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, **1989**, 353-361.
- Barker S. A. (2007) Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* , **70**, 151–162.
- Barrek S., Paisse O., Grenier-Loustalot M. F. (2003). Determination of residual pesticides in olive oil by GC-MS and HPLC-MS after extraction by size-exclusion chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376**, 355-359.
- Beltran A., Borrull F., Cormack P. A. G., Marcé R. M. (2010). Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 1363-1375.
- Blasco C., Font G., Pico Y. (2005). Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–ion trap–triple stage mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1098**, 37-4.
- Bossi A., Bonini F., Turner A. P. F., Piletsky S. A. (2007). Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. *Biosens Bioelectron.*, **22**, 1131-1137.
- Bossi A., Whitcombe M. J., Uludag Y., Fowler S., Chianella I., Subrahmanyam S., Sanchez I., Piletsky S. A. (2010). Synthesis of controlled polymeric cross-linked via iniferter polymerization in the presence of tetraethyl thiuram disulphide chain terminator. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 2149-2155.
- Bui B. T. S., Haupt K. (2010). Molecularly imprinted Polymers: Synthetic Receptors in Bioanalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398**, 2481-2492.
- Buszewski B., Szultka M. (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **42**, 198-213.
- Byrne M. E., Hilt J. Z., Peppas N. A. (2008). Recognitive biomimetic networks with moiety imprinting for intelligent drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **84A**, 137-147.
- Cacho C., Turiel E., Martín-Esteban A., Pérez-Conde C., Cámara C. (2003). Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly-imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376**, 491-496.
- Cairns T., Luke M. A., Chiu K. S., Navarro D., Siegmund E. G. (1995). Multiresidue pesticide analysis by ion-trap technology: A clean-up approach for mass spectral analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 1070-1076.
- Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Revilla-Ruiz P., Hernández-Méndez J. (2005). Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples, Review. *Journal of Chromatography A*, **1089**, 1-17
- Caro E., Marcé R. M., Borrull F., Cormack P. A. G., Sherrington D. C. (2006). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, **25**, 143-154.

- Caro E., Marc R. M., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., Borrull F. (2003). On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water. *Journal of Chromatography A*, **995**, 233-238.
- Caro E., Marc R. M., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., Borrull F. (2004). Molecularly imprinted solid-phase extraction of naphthalene sulfonates from water. *Journal of Chromatography A*, **1047**, 175-180.
- Castro M. D. L., Jimenez-Carmona M. M. (2000). Where is supercritical fluid extraction going? *Trend Anal. Chem.*, **19**, 223-231.
- Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren B., Hennion M. C. (2004). Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers-application to the extraction of triazines from complex matrices. *Journal of Chromatography B*, **804**, 93-101.
- Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren B., Hennion M. C. (2003). Optimization of the class-selective extraction of triazines from aqueous samples using a molecularly imprinted polymer by a comprehensive approach of the retention mechanism. *Journal of Chromatography A*, **999**, 23-33.
- Chen L., Xu S., Li J. (2011). Recent advances in molecularly imprinted technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, **40**, 2922-2942.
- Chen Y., Kele M., Sajonz P., Sellergren B., Guiochon G. (1999). Influence of thermal annealing on the thermodynamic and mass-transfer kinetic properties of D- and L-phenylalanine anilide on imprinted polymeric stationary phases. *Analytical Chemistry*, **71**, 928-938.
- Chimuka L., Pinxteren M. V., Billing J., Yilmaz J., Jönsson J. A. (2011). Selective extraction of triazina herbicides based on a combination of membrane assisted solvent extraction and molecularly imprinted solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 647-653.
- Cormack P. A. G., Elorza A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. *Journal of Chromatography B*, **804**, 173-182.
- Cunha S. C., Lehotay S. J., Mastovska K., Fernandes J. O., Beatriz M., Oliveira P. P. (2007). Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science*, **30**, 620-632.
- Cussler E. L. (2009). Diffusion: mass transfer in fluid systems. Third Edition. Cambridge University Press. New York, University, 580.
- Deme P., Azmeera T., B. L. A. P., Jonnalagadda P. R., Prasad R. B. N., Sarathi U. V. R. V. (2014). An improved dispersive solid-phase extraction clean-up method for the gas chromatography-negative chemical ionisation tandem mass spectrometric determination of multiclass pesticide residues in edible oils. *Food Chemistry*, **142**, 144-151.
- Dirion I. B., Lanza F., Sellergren B., Chassaing C., Venn R., Berggren C. (2002). Selective Solid Phase Extraction of a Drug Lead Compound Using Molecularly Imprinted Polymers Prepared by the Target Analogue Approach. *Chromatographia*, **56**, 237-241.

- Djozan D., Farajzadeh M. A., Sorouraddin S. M., Baheri T., Norouzi J. (2012). Inside-Needle Extraction Method Based on Molecularly Imprinted Polymer for Solid-Phase Dynamic Extraction and Preconcentration of Triazine Herbicides Followed by GC-FID Determination. *Chromatographia*, **75**, 139-148.
- Ferrer C., Gómez M. J., García-Reyes J. F., Ferrer I., Thurman E. M., Fernández-Alba A. R. (2005). Determination of pesticides residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1069**, 183-194.
- Ferrer I., Lanza F., Tolokan A., Horvath V., Sellergren B., Horvai G., Barceló D. (2000). Selective Trace Enrichment of Chlorotriazine Pesticides from Natural Waters and Sediment Samples Using Terbutylazine Molecularly Imprinted Polymers. *Analytical Chemistry*, **72**, 3934-3941.
- Fischer D. S. (1964). Theories of Antibody Formation: A Review. *Yale Journal of Biology and Medicine*, **37**, 1-30.
- Frenich A. G., Moreno F. L. F., Vidal J. L. M., Liébanas F. J. A. (2007). Application of Gas Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry for the Multiresidue Analysis of Pesticides in Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 8346-8352.
- Fuentes E., Báez M. E., Quiñones A. (2008). Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. *Journal of Chromatography A*, **1207**, 38-45.
- Furlani R. P. Z., Marcilio K. M., Leme F. M., Tfouni S. A. V. (2011). Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food chemistry*, **126**, 1283-1287.
- Ganzler K., Salgo A., Valko K. (1986). Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*, **371**, 299-306.
- García-Calzón J. A., Díaz-García M. E. (2007). Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B*, **123**, 1180-1194.
- García R., Cabrita M. J., Freitas A. M. C. (2011). Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Pesticide Residues in Food-A Highly Selective and Innovative Approach. *American Journal of Analytical Chemistry*, **2**, 16-25.
- García-Reyes J. F., Ferrer C., Gómez-Ramos M. J. (2007). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 239-351.
- García-Sánchez A., Ramos M. N., Ballesteros E. (2006). Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography-tandem mass spectrometric determination. *Analytica Chimica Acta*, **558**, 53-61.
- Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Fernández-Alba A. R., Molina-Díaz A. (2010). Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 3736-3747.

- Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*, **79**, 109-128.
- González G. P., Hernando P. F., Alegría J. S. D. (2006). A morphological study of molecularly imprinted polymers using the scanning electron microscope. *Analytica Chimica Acta*, **557**, 179-183.
- González G. P., Hernando P. F., Alegría J. S. D. (2009). An optical sensor for the determination of digoxin in serum samples based on a molecularly imprinted polymer membrane. *Analytica Chimica Acta*, **638**, 209-2012.
- Guardia-Rubio M., Fernandez-De Cordova M. L., Ayora-Canada M. J., Ruiz-Medina A. (2006). Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1108**, 231-239.
- Haginaka J. (2008). Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. *Journal of Chromatography B*, **866**, 3-13.
- Haupt K., Mosbach K. (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews*, **100**, 2495-2504.
- Hennion M. C., Pichon V. (2003). Immuno-based sample preparation for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, **1000**, 29-52.
- He Y., Liu Y. H. (2007). Assessment of primary and secondary amine adsorbents and elution solvents with or without graphitized carbon for the SPE clean-up of food extracts in pesticide residue analysis. *Chromatographia*, **65**, 581-590.
- He Y., Long Y., Pan J., Li K. Liu F. (2007). Application of Molecularly Imprinted Polymers to Solid Phase Extraction of Analytes from Real Samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**, 133-150.
- Hernando M. D., Ferrer C., Ulaszewska M., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R. (2007). Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**, 1815-1831.
- Hu M. L., Jiang M., Wang P., Mei S. R., Lin H. F., Hu X. Z., Shi Y., Lu B., Dai K. (2007). Selective solid-phase extraction of tebuconazole in biological and environmental samples using molecularly imprinted polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **387**, 1007-1016.
- Hu X., Dai G., Huang J., Jin H., Yu Y., Liang Y. (2011). Preparation and Characterization of Metolachlor Molecularly Imprinted Polymer Coating on Stainless Steel Fibers for Solid-Phase Microextraction. *Analytical Letters*, **44**, 1358-1370.
- Hu Y., Pan J., Zhang K., Lian H., Li G. (2013). Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, **43**, 27-52.
- Juan-García A., Font G., Pico Y. (2005). Determination of organic contaminants in food by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, **28**, 793-812.

- Kan X., Zhao Y., Geng Z., Wang W., Zhu J. J. (2008). Composites of Multiwalled Carbon Nanotubes and Molecularly Imprinted Polymers for Dopamine Recognition. *The Journal of Physical Chemistry C*, **112**, 4849-4854.
- Karlsson B. C. G., O'Mahony J., Karlsson J. G., Bengtsson H., Eriksson L. A., Nicholls I. A. (2009). Structure and Dynamics of Monomer-Template Complexation: An Explanation for Molecularly Imprinted Polymer Recognition Site Heterogeneity. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 13297-13304.
- Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J. (2000). Applications of solid-phase micro-extraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, **880**, 35-62.
- Kloskowski A., Pilarczyk M., Przyjasny A., Namiesnik. (2009). Progress in Development of Molecularly Imprinted Polymers as Sorbents for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, **39**, 43-58.
- Koster E. H. M., Crescenzi C., Hoedt W., Ensing K., Jong G. J. d. (2001). Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, **73**, 3140-3145.
- Lambropoulou D. A., Albanis T. A. (2007). Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**, 1663-1683.
- Lasáková M., Jandera P. (2009). Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, **32**, 799-812.
- Lavignac N., Allender C. J., Brain K. R. (2004). Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. *Analytica Chimica Acta*, **510**, 139–145.
- Lehotay S. J., Matovska K., Yun S. J. (2005). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International*, **88**, 630-638.
- Lehotay S. J., Son K. A., Kwon H., Koesukwiwat U., Fu W., Mastovska K., Hoh E., Leepipatpiboon N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2548-2560.
- Lehotay S. J. (1997). Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of Chromatography A*, **785**, 289-312.
- Lentza-Rizos C., Avramidez E. J., Visi E. (2001). Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Journal of Chromatography A*, **921**, 297-304.
- Li W., Li S. (2007). Molecular imprinting: A versatile tool for separation, sensors and catalysis. *Advances in Polymer Science*, **206**, 191–210.
- Lok C. M., Son R. (2009). Application of Molecularly Imprinted Polymers in Food Sample Analysis-A Perspective. *International Food Research Journal*, **16**, 127-140.
- Longo L., Vasapollo G. (2008). Phthalocyanine-based molecularly imprinted polymers as nucleoside receptors. *Metal-Based Drugs*, **2008**, 1-5.

- Lv Y., Lin Z., Feng W., Zhou X., Tan T. (2007). Selective recognition and large enrichment of dimethoate from tea leaves by molecularly imprinted polymers. *Biochemical Engineering Journal*, **36**, 221-229.
- Malitesta C., Mazzotta E., Picca R. A., Poma A., Chianella I., Piletsky S. A. (2012). MIP sensors—the electrochemical approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **402**, 1827-1846.
- Martín-Esteban A. (2001). Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **370**, 795-802.
- Martín-Esteban A. (2013). Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, **44**, 169-181.
- Martín L., Julio L. F., Burillo J., Sanz J., Mainar A. M., González-Coloma A. (2011). Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO₂) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. *Industrial Crops and Products*, **34**, 1615-1621.
- Masqué N., Marcé R. M., Borrull F., Cormack P. A. G., Sherrington D. C. (2000). Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from environmental water. *Analytical Chemistry*, **72**, 4122-4126.
- Masqué N., Marce R. M., Borrull F. (1998). New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. *Trends in Analytical Chemistry*, **17**, 384-394.
- Mayes A. G., Whitcombe M. J. (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 1742-1778.
- Moreno-Bondi M. C., Navarro-Villoslada F., Benito-Peña E., Urrasca J. L. (2008). Molecularly Imprinted Polymers as Selective Recognition Elements in Optical Sensing. *Current Analytical Chemistry*, **4**, 316-340.
- Mosbach K., Ramström O. (1996). The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Nature Biotechnology*, **14**, 163-170.
- Nollet L. M. L., Rathore H. S. (2010). Handbook of Methods of Pesticide Residues Analysis PESTICIDES – Methods of Pesticide Residuos Analysis. CRC Press, Taylor e Francis Group, New York, 1-597.
- Pan G., Zhang Y., Guo X., Li C., Zhang H. (2010). An efficient approach to obtaining water-compatible and stimuli-responsive molecularly imprinted polymers by the facile surface-grafting of functional polymer brushes via RAFT polymerization. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 976-982.
- Pap T., Horváth V., Tolokán A., Horvai G., Sellergren B. (2002). Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, **973**, 1-12.
- Pauling L., (1940). A theory of the structure and process of formation of antibodies. *Journal of the American Chemical Society*, **62**, 2643-2657.

- Pérez-Moral N., Mayes A. G. (2004). Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. *Analytica Chimica Acta*, **504**, 15–21.
- Pérez-Moral N., Mayes A. G. (2006). MIP Formats for Analytical Applications. In: Piletsky S., Turner A. *Molecularly Imprinted Polymers*. Biotechnology Intelligence Unit. Evrekah.com/Landes Bioscience, Texas, USA.
- Pichon V., Chapuis-Hugon F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants-A review. *Analytica Chimica Acta*, **622**, 48-61.
- Pichon V. (2007). Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, **1152**, 41-53.
- Picó Y., Blasco C., Font G. (2004). Environmental and food applications of LC tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spectrometry Reviews*, **23**, 45-85.
- Picó Y., Fernández M., Ruiz M. J., Font G. (2007). Current trends in solid- phase- based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**, 117-131.
- Piletska E. V., Guerreiro A. R., Whitcombe M. J., Piletsky S. A. (2009). Influence of the Polymerization Conditions on the Performance of Molecularly Imprinted Polymers. *Macromolecules*, **42**, 4921-4928.
- Piletsky S. A., Turner N. W., Laitenberger P. (2006). Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics - Future potential and existing problems. *Medical Engineering & Physics*, **28**, 971-977.
- Poma A., Turner A. P. F., Piletsky S. A. (2010). Advances in the manufacture of MIP nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, **28**, 629-637.
- Quaglia M., Lorenzi E., Sulitzky C., Massolini G., Sellergren B. (2001). Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrochromatography. *Analyst*, **126**, 1495-1498.
- Quiñones I., Guiochon G. (1996). Derivation and application of a Jovanovic-Freundlich isotherm model for single-component adsorption on heterogeneous surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, **183**, 57-67.
- Rampey A. M., Umpleby II R. J., Rushton G. T., Iseman J. C., Shah R. N., Shimizu K. D. (2004). Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the Freundlich isotherm-affinity distribution analysis. *Analytical Chemistry*, **76**, 1123-1133.
- Regal P., Díaz-Bao M., Barreiro R., Cepeda A., Fente C. (2012). Application of molecularly imprinted polymers in food analysis: clean-up and chromatographic improvements. *Central European Journal of Chemistry*, **10**, 766-784.
- Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L., Porter N. L. (1996) .Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, **68**, 1033-1039.
- Ringo M., Evans C. (1998). Liquid chromatography as a measurement tool for chiral interactions. *Analytical Chemistry*, **70**, 315-321.

- Robledo V. R., Smyth W. F. (2009). The application of CE-MS in the trace analysis of environmental pollutants and food contaminants. *Electrophoresis*, **30**, 1647-1660.
- Sabik H., Jeannot R., Rondeau B. (2000). Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of Chromatography A*, **885**, 217-236.
- Salian V. D., Byrne M. E. (2013). Living radical polymerization and molecular imprinting: Improving polymer morphology in imprinted polymers. *Macromolecular Materials and Engineering*, **298**, 379-390.
- Salian V. D., White C. J., Byrne M. E. (2014). Molecularly imprinted polymers via living radical polymerization: Relating increased structural homogeneity to improved template binding parameters. *Reactive and Functional Polymers*, **78**, 38-46.
- Sannino A., Bandini M., Bolzoni L. (1999). Multiresidue determination of 19 fungicides in processed fruits and vegetables by capillary gas chromatography after gel permeation chromatography. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, **82**, 1229-1238.
- Schenck F. J., Lehotay S. J., Vega V. (2002). Comparison of solid-phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables. *Journal of Separation Science*, **25**, 883-890.
- Sellergren B., Shea K. J. (1993). Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. *Journal of Chromatography A*, **635**, 31-49.
- Sellergren B. (1994). Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer. *Analytical Chemistry*, **66**, 1578-1582.
- Sellergren B. (1997). Noncovalent molecular imprinting: antibody-like molecular recognition in polymeric network materials. *Trends in Analytical Chemistry*, **16**, 310-320.
- Sellergren B. (1999). Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *Trends in Analytical Chemistry*, **18**, 164-174.
- Sellergren B. (2001a). *Molecularly Imprinted Polymers. Man Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam.
- Sellergren B. (2001b). Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **906**, 227-252.
- Sharma D., Nagpal A., Pakade Y. B., Katnoria J. K. (2010). Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta*, **82**, 1077-1089.
- Shimelis O., Yang Y., Stenerson K., Kaneko T., Ye M. (2007). Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *Journal of Chromatography A*, **1165**, 18-25.
- Sigma-Aldrich. (2015). *Molecular Imprinted Polymers*. Acedido através do site: <http://www.specchemonline.com/articles/view/separation-sensations#.VNIRm01yZdg>, , último acesso a 19 de Fevereiro de 2015.

- Singh K. P., Kumar A., Singh P., Sanjesh, Singh R., Pant H. V. (2013). Selective Recognition and Detoxification of Deltamethrin Using Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Matrices. *Taylor e Francis*, **3**, 30-39.
- Sobhanzadeh E., Bakar N. K. A., Abas M. R. B., Nemati K. (2011). An efficient extraction and clean-up procedure for pesticide determination in olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**, 862-869.
- Song X., Xu S., Chen L., Wei Y., Xiong H. (2014). Recent advances in molecularly imprinted polymers in food analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, **131**, 1-18.
- Spivak D. A., Gilmore M. A., Shea K. J. (1997). Evaluation of binding and origins of specificity of 9-ethyladenine imprinted polymers. *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 4388-4393.
- Spivak D. A. (2005). Optimization, evaluation and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 1779-1794.
- Stefani R., Buzzi M., Grazi R. (1997). SFE of pesticide residues in fortified apple matrices. *Journal of Chromatography A*, **782**, 123-132.
- Subrahmanyam S., Guerreiro G., Poma A., Moczko E., Piletska E., Piletsky S. (2013). Optimisation of experimental conditions for synthesis of high affinity MIP nanoparticles. *European Polymer Journal*, **49**, 100-105.
- Svenson J., Nicholls I. A. (2001). On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, **435**, 19-24.
- Tadeo J. L. (2008). Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples. CRC Press, Taylor e Francis Group, New York, 1-367.
- Tamahkar E., Denizli A. (2014). Metal Ion Coordination Interactions for Biomolecule Recognition: a Review. *Hittite Journal of Science and Engineering*, **1**, 21-26.
- Tamayo F. G., Casillas J. L., Martín-Esteban A. (2005). Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecularly imprinted polymers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**, 1234-1240.
- Tamayo F. G., Turiel E., Martín-Esteban A. (2007). Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*, **1152**, 32-40.
- Tang F., Yue Y., Hua R., Cao H. (2006). Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination of pesticide residues in medicinal herbs by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector. *Journal of AOAC International*, **89**, 498-502.
- Tokonami S., Shiigi H., Nagaoka T. (2009). Review: micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications. *Analytica Chimica Acta*, **641**, 7-13.
- Torres C. M., Pico Y., Manes J. (1996). Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **754**, 301-31.

- Tsoutsis C., Konstantinou I., Hela D., Albanis T. (2006). Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **573–574**, 216-222.
- Ulbricht M. (2004). Membrane separations using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, **804**, 113–125.
- Umpleby II R. J., Baxter S. C., Bode M., Berch Jr J. K., Shah R. N., Shimizu K. D. (2001a). Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, **435**, 35-42.
- Umpleby II R. J., Baxter S. C., Chen Y.Z., Shah R. N., Shimizu K. D. (2001b). Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analytical Chemistry*, **73**, 4584-4591
- Umpleby II R. J., Baxter S. C., Rampey A. M., Rushton G. T., Chen Y., Shimizu K. D. (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, **804**, 141-149.
- Umpleby II R. J., Bode M., Shimizu K. D. (2000). Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Analyst*, **125**, 1261-1265.
- Vasapollo G., Del Dole R., Mergola L., Lazzoi M. R., Scaerdino A., Scorrano S., Mele G. (2011). Review. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 5908-5945.
- Wei S., Mizaikoff B. (2007). Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations. *Journal of Separation Science*, **30**, 1794-1805.
- Wei Y., Qiu L., Yu J. C. C., Lai E. P. C. (2007). Molecularly imprinted solid phase extraction in a syringe needle packed with polypyrrole-encapsulated carbon nanotubes for determination of ochratoxin A in red wine. *Food Science and Technology International*, **13**, 375-380.
- Whitcombe M. J., Kirsch M., Nicholls Y. A. (2014). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004–2011, *Journal of Molecular Recognition*, **27**, 297-401.
- Wulff, G. (1995). Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates – a way towards artificial antibodies. *Angewandte Chemie International Edition*, **34**, 1812-1832.
- Wulff G. (2002). Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical Reviews*, **102**, 1-27.
- Yagüe C., Bayarri S., Conchillo P., Lázaro R., Pérez-Arquellé C., Herrera A., Ariño A. (2005). Determination of Pesticides and PCBs in Virgin Olive Oil by Multicolumn Solid-Phase Extraction Cleanup Followed by GC-NPD/ECD and Confirmation by Ion-Trap GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 5105-5109.
- Yang L. Q., Zhao W. X. M., Zhou Z. (2010). Selective enrichment and determination of nicosulfuron in water and soil by a stir bar based on molecularly imprinted polymer coatings. *Analytica Chimica Acta*, **670**, 72-77.

- Yan M., Ramström O. (2005). *Molecularly Imprinted Materials*. Science and Technology. Marcel Dekker CRC Press, USA.
- Ye L., Mosbach K. (2008). Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors. *Chemistry of Materials*, **20**, 859-868.
- Yilmaz E., Ramström O., Möller O., Sanchez P., Mospach K. (2002). A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates. *Journal of Materials Chemistry*, **12**, 1577-1581.
- Yusof N. A., Rahman S. K. A., Hussein M. Z., Ibrahim N. A. (2013). Preparation and Characterization of Molecularly Imprinted Polymer as SPE Sorbent for Melamine Isolation. *Polymers*, **5**, 1215-1228.
- Zhang H. (2013). Controlled/ “living” radical precipitation polymerization: A versatile polymerization technique for advanced functional polymers. *European Polymer Journal*, **49**, 579-600.
- Zhang L., Liu S., Cui X., Pan C., Zhang A., Chen F. (2012). A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Central European Journal of Chemistry*, **10**, 900-925.
- Zhang Z. M., Tan W., Hu Y. L., Li G. K. (2011). Simultaneous determination of trace sterols in complicated biological samples by gas chromatography–mass spectrometry coupled with extraction using β -sitosterol magnetic molecularly imprinted polymer beads. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 4275-4283.
- Zheng C., Huang Y. P., Liu Z. S. (2013). Synthesis and theoretical study of molecularly imprinted monoliths for HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**, 2147-2161.
- Zhou J. F., Ma M., Zhou S., Ma P. L., Chen F. R., Qi Y., Chen W. X. (2010). Preparation, evaluation and application of molecularly imprinted solid-phase microextraction monolith for selective extraction of pirimicarb in tomato and pear. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 7478-7483.
- Zougagh M., Bouabdallah M., Salghi R., Hormatallah A., Rios A. (2008). Supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry or high-performance liquid chromatography for confirmation of paraquat and diquat in olive oil samples. *Journal of Chromatography A*, **1204**, 56-61.

3.Objetivos

O presente trabalho, tem como principal objetivo a implementação de uma metodologia analítica para a deteção e quantificação de pesticidas presentes em quantidades vestigiais na matriz alimentar azeite. Para atingir este objetivo, o trabalho desenvolvido focou-se fundamentalmente no desenvolvimento de uma etapa de extração em fase sólida, utilizando polímeros molecularmente impressos como adsorventes seletivos para os pesticidas alvo (dimetoato, terbutilazina e deltametrina) e, subsequente deteção e quantificação utilizando técnicas cromatográficas.

Este trabalho encontra-se inserido no âmbito do projeto de investigação financiado pela FCT - ref^a PTDC/AGR-ALI/117544/2010 intitulado “Extração em fase sólida com polímeros molecularmente impressos: Uma aproximação altamente seletiva e promissora para a análise vestigial de pesticidas em azeite”. Este projeto visa fundamentalmente avaliar a utilidade de polímeros molecularmente impressos como adsorventes seletivos para a implementação de uma metodologia analítica para detetar e quantificar, com elevada seletividade e sensibilidade quantidades vestigiais de pesticidas em azeite. Deste modo, a componente científica deste projeto de investigação engloba, o “design” e a síntese de novos sistemas de impressão molecular específicos para cada um dos pesticidas alvos os quais serão, posteriormente utilizados na implementação de uma metodologia analítica para a deteção e quantificação de cada um dos pesticidas alvo.

Assim, apesar deste projeto de investigação explorar duas componentes- uma diretamente relacionada com as vias de síntese química destes novos materiais poliméricos e, a outra, com a avaliação e implementação de metodologias analíticas de preparação de amostra baseadas nestes polímeros, o trabalho desenvolvido no âmbito deste doutoramento incidiu exclusivamente nesta última vertente.

Em suma, no presente trabalho, o desenvolvimento da metodologia analítica de preparação de amostra para a análise vestigial de pesticidas em azeite envolveu fundamentalmente os seguintes estudos:

1- Avaliação cromatográfica da capacidade de reconhecimento molecular dos MIPs seletivos para o dimetoato, a terbutilazina e a deltametrina sintetizados no âmbito do projeto de investigação no qual este doutoramento se encontra inserido;

2- Aplicação destes novos materiais poliméricos como adsorventes em extração em fase sólida com vista à implementação e otimização da metodologia MISPE;

3- Validação da metodologia MISPE com amostras de azeite biológico ao qual foram adicionadas concentrações conhecidas dos diferentes pesticidas em estudo;

4- Estudos comparativos das metodologias MISPEs desenvolvidas para os diferentes pesticidas em estudo (otimizadas no ponto 3) com as metodologias QuEChERS e com SPE convencional utilizando cartuchos C₁₈ comerciais, em amostras de azeite;

5- Comparação da metodologia MISPE seletiva para a terbutilazina com os cartuchos de MISPE disponíveis comercialmente para a classe das triazinas (estudo exclusivo para o MIP seletivo para a terbutilazina);

6- Aplicação das metodologias MISPE complementada com a análise cromatográfica para a eventual deteção e quantificação dos pesticidas alvo a um conjunto de azeites comerciais produzidos em diferentes regiões de Portugal, nomeadamente Alentejo, Trás-os-Montes e Beiras.

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Polímeros Molecularmente Impressos

Os diversos MIPs aplicados neste estudo, aos quais foram atribuídos os acrónimos dmt-tr-MIP-1, dmt-tr-MIP-2, dmt-inif-MIP, tbz-tr-MIP, dn-tr-MIP-1 e dn-tr-MIP-2 e os correspondentes NIPs foram previamente sintetizados pelos membros da equipa que integram o projeto de investigação, no âmbito do qual foi desenvolvido o trabalho subjacente a esta dissertação, e cuja tarefa consistia na síntese e caracterização química e morfológica destes novos materiais poliméricos. Como referido anteriormente, dada a relevância das diversas entidades envolvidas na síntese polimérica na capacidade de reconhecimento molecular dos MIPs e, uma vez que esta característica é primordial para o desenvolvimento da metodologia de preparação de amostra, optou-se por colocar a informação referente às condições de síntese na tabela 6, apesar da síntese química destes materiais poliméricos não ter sido alvo deste estudo. Dado que os NIPs foram sintetizados reproduzindo as mesmas condições de síntese dos respetivos MIPs, à exceção da adição da molécula molde, apenas foram indicadas as condições experimentais relativas à síntese dos polímeros molecularmente impressos. Para uma fácil identificação dos correspondentes NIPs e, de modo a facilitar a posterior discussão dos resultados, foram-lhe atribuídos acrónimos similares aos dos respetivos MIPs (dmt-tr-NIP-1, dmt-tr-NIP-2, dmt-inif-NIP, tbz-tr-NIP, dn-tr-NIP-1 e dn-tr-NIP-2).

Em suma e, atendendo, aos objetivos deste trabalho foram sintetizados sistemas de impressão molecular para os três pesticidas alvo, dimetoato (dmt), terbutilazina (tbz) e deltametrina (dn) pertencentes às classes dos organofosforados, triazinas e piretróides, respetivamente.

Em relação aos sistemas de impressão molecular seletivos para o dimetoato foram sintetizados o dmt-tr-MIP-1, dmt-tr-MIP-2 e dmt-inif-MIP. Fundamentalmente, estes sistemas poliméricos diferem na técnica de polimerização utilizada- *bulk* (dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2) e *Iniferter* (dmt-inif-MIP). Para o caso da polimerização via

bulk, foram ainda testados dois agentes de ligação cruzada- EGDMA (dmt-tr-MIP-1) e TEGDMA (dmt-tr-MIP-2).

Relativamente ao MIP específico para o reconhecimento molecular da terbutilazina foi sintetizado o tbz-tr-MIP através da técnica de polimerização via *bulk*.

Finalmente, os polímeros molecularmente impressos seletivos para a deltametrina- dn-tr-MIP-1 e dn-tr-MIP-2, foram sintetizados mediante a técnica de polimerização via *bulk* utilizando diferentes monômeros funcionais- MAA (dn-tr-MIP-1) e acrilamida (dn-tr-MIP-2).

Após a síntese dos diferentes MIPs/ NIPs, e antes de estes serem disponibilizados para a posterior avaliação da sua capacidade de reconhecimento molecular, foi efetuada uma detalhada caracterização química e morfológica destes materiais poliméricos pelos membros da equipa de investigação do projeto que se encontravam dedicados a esta tarefa específica, de modo a avaliar o sucesso dos processos de síntese e a verificar se os MIPs produzidos possuíam as propriedades desejadas. Os resultados desta caracterização química e morfológica encontram-se publicados em revistas internacionais com arbitragem científica (Simões *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015a; Martins *et al.*, 2015b).

Tabela 6. Condições reacionais da polimerização envolvida na síntese dos diferentes sistemas de impressão molecular em estudo.

Polímeros Molecularmente Impressos	Molécula Molde	Monómero Funcional	Agente de Ligação Cruzada	Iniciador Radicalar	Solvente Porogénico	Agente <i>Iniferter</i>	Razão Estequiométrica	Via de Polimerização	Referência
dmt-tr-MIP-1	dmt	MAA	EGDMA	AIBN	Diclorometano	-	1:4:20 ¹	<i>Bulk</i> (UV)	Simões <i>et al.</i> , 2014
dmt-tr-MIP-2	dmt	MAA	TEGDMA	AIBN	Diclorometano	-	1:4:20 ¹	<i>Bulk</i> (UV)	Simões <i>et al.</i> , 2014
dmt-inif-MIP	dmt	MAA	EGDMA	AIBN	Acetonitrilo	TED	1:1:0,5:1:3 ²	<i>Iniferter</i> (UV)	Martins <i>et al.</i> , 2015b
tbz-tr-MIP	tbz	MAA	EGDMA	AIBN	Diclorometano	-	0,25:0,06:1:5 ³	<i>Bulk</i> (UV)	Garcia <i>et al.</i> , 2015
dn-tr-MIP-1	dn	MAA	EGDMA	AIBN	Diclorometano	-	1:4: 1,9:20 ³	<i>Bulk</i> (60°C)	Martins <i>et al.</i> , 2015a
dn-tr-MIP-2	dn	AM	EGDMA	AIBN	Diclorometano	-	1:4: 1,9:20 ³	<i>Bulk</i> (60°C)	Martins <i>et al.</i> , 2015a

¹Razão estequiométrica T:M:A; ²Razão estequiométrica T:M:I:Inif:A; ³Razão estequiométrica T:M:I:A; (-) Ausência de agente *iniferter*. Os NIPs são obtidos reproduzindo as condições de síntese dos respectivos MIPs, à exceção da adição da molécula molde.

4.1.2. Padrões de Pesticidas

O dimetoato (dmt) e os respectivos análogos estruturais- metidatião, fentião, ometoato e malatião, a terbutilazina (tbz) e os análogos- atrazina e ametrina, bem como a deltametrina (dn) e os análogos- lambda-cialotrina, fenpropratrina e fenotrina, foram utilizados como padrões, todos eles com um grau de pureza $\geq 95\%$ e, adquiridos à Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA, USA). De cada substância padrão prepararam-se soluções mãe de aproximadamente 5 mg mL^{-1} em acetonitrilo, que foram conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frascos de vidro castanho de 25 mL, com tampas de plástico revestidas internamente com Teflon[®] PTFE (Politetrafluoroetileno). Em função das diferentes necessidades experimentais e analíticas foi necessário preparar diariamente diferentes soluções diluídas a partir das soluções mãe de pesticidas e análogos anteriormente mencionadas, de modo a obter soluções de concentrações adequadas para cada tipo de ensaio (retas de calibração, avaliação da capacidade de reconhecimento molecular, estudos de seletividade, entre outros).

4.1.3. Reagentes, Solventes e Outros Consumíveis

Os solventes usados nos diferentes estudos realizados durante o presente trabalho de investigação, nomeadamente o acetonitrilo e o metanol com grau de pureza para HPLC, a acetona, o diclorometano, o *n*-heptano, *n*-hexano e o ácido acético foram comprados à VWR International S.A.S. (Fontenay-Sons-Bois, França). A água usada em todos os ensaios foi previamente destilada e filtrada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos).

Para a avaliação do reconhecimento molecular por SPE dos diferentes sistemas de impressão molecular e, posterior otimização, implementação e validação das diferentes metodologias MISPE, os MIPs foram acondicionados em colunas de SPE de vidro (Chromabond[®] Säulen/ Columns 3mL) utilizando filtros de polietileno (Chromabond[®] Filter) ambos comprados à empresa Chromabond-Macherey-Nagel (Alemanha).

Para a realização dos estudos comparativos das taxas de recuperação relativas às metodologias MISPE com as taxas de recuperação obtidas utilizando a metodologia convencional de extração em fase sólida precedida da extração líquido-líquido foram utilizados cartuchos Sep-Pak C₁₈ Vac 6 CC (1g) fornecidos pela Waters (Irlanda).

De modo a comparar as taxas de recuperação relativas às diferentes metodologias MISPE desenvolvidas neste trabalho, com as taxas de recuperação obtidas utilizando a metodologia QuEChERS, utilizaram-se tubos de centrifuga de Teflon[®] FEP (*Fluorinated Ethylene Propylene*) de 50 ml e de 15 mL, cloreto de sódio com pureza p.a., fornecido pela Merk (Alemanha), sulfato de magnésio anidro com pureza p.a., comprado à VWR Chemicals (Bélgica), PSA Bonded Silica Bulk e C₁₈ Discovery[®] DSC-18, ambos fornecidos pela Supelco (Bellefonte, PA, Estados Unidos) e carvão ativado Supelclean[™] Envi-Carb[™] SPE Bulk Packing comprado à Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

Os resultados obtidos para a metodologia MISPE desenvolvida para a extração seletiva de terbutilazina em amostras de azeite, foram ainda comparados com os resultados obtidos utilizando o cartucho MISPE disponível comercialmente para a classe das triazinas, mediante a utilização das colunas SupelMIP[™] Triazine 10 SPE Column 25-mg/ 10-mL LRC fornecidos pela Supelco (Bellefonte, PA, Estados Unidos).

Antes de serem analisadas no sistema cromatográfico, todas as amostras foram previamente filtradas com filtros de membranas de 13 mm (w/ 0,45 µm PTFE membrane) comprados à VWR (Estados Unidos).

Para a validação da metodologia MISPE, desenvolvida no presente estudo, utilizou-se um azeite biológico que foi adquirido num supermercado local. Por sua vez foram ainda comprados diferentes azeites comerciais, pertencentes a diferentes regiões do país (Alentejo, Trás-os-Montes e Beiras), os quais foram analisados recorrendo às metodologias MISPE desenvolvidas no presente trabalho, por forma a avaliar a eventual presença de resíduos dos pesticidas alvo.

4.2.Equipamentos

4.2.1.Cromatografia Líquida e Métodos Cromatográficos

Determinação dos Fatores de Impressão (IF)

A avaliação cromatográfica dos MIPs e NIPs em estudo, no que diz respeito à determinação dos fatores de impressão (IF), foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida LC30, fornecido pela Dionex Corp. (Sunnyvale, CA, Estados Unidos), equipado com uma Bomba de gradiente GP50-2 e um forno de coluna LC30. Os estudos cromatográficos foram realizados utilizando diferentes colunas de aço inoxidável (50 mm x 4,6 mm), previamente empacotadas e acondicionadas com os sistemas de impressão molecular em estudo (Grace, Brandstraat, Bélgica). A detecção foi efetuada ao comprimento de onda de 220 nm, usando um detetor de UV-Vis (UVD 170 L). Para a aquisição e tratamento dos dados recorreu-se ao programa Chromeleon 6.30.

Estudos de Adsorção

Os estudos de adsorção em solução foram realizados utilizando o sistema de HPLC UltiMate 3000, equipado com uma bomba de gradiente LPG-3400SD, um forno de coluna TCC-3000SD e um injetor automático WPS-3000SL, fornecidos pela Dionex Corp. (Sunnyvale, CA, Estados Unidos). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ Nucleosil (250 x 4,6 mm DI, 5 µm), fornecida pela Grace (Brandstraat, Bélgica). Para a detecção, identificação e quantificação dos analitos foi utilizado um detetor de foto-díodos (DAD-3000RS), sendo especificado para cada um dos métodos cromatográficos o intervalo de comprimentos de onda ao qual se realizou a monitorização do espectro de UV-Vis bem como o comprimento de onda ao qual se realizou a quantificação do analito (ver descrição abaixo). A aquisição e o tratamento dos dados obtidos foram realizados utilizando o programa Chromeleon 7.0.

- Método cromatográfico

A fase móvel era constituída por dois solventes (A e B), como solvente A utilizou-se a água e como B usou-se o acetonitrilo. O método cromatográfico inicia-se com 25 % do solvente B, seguido de um gradiente linear até atingir 100 % de B durante 7 minutos, em seguida mantém 100 % de B durante 7 minutos, posteriormente diminui

linearmente até retomar as condições iniciais (25 % de B) durante 5 minutos e finalmente mantém 25 % do solvente B durante 5 minutos. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente, com um fluxo de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$ e um volume de injeção de $25 \mu\text{L}$. A detecção e identificação dos analitos alvo foi efetuada através da monitorização do espectro de absorção de UV-vis no intervalo de comprimento de onda de 200-600 nm e a quantificação foi efetuada ao comprimento de onda de 220 nm.

Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE/ Validação e Aplicação da Metodologia MISPE

Para as análises cromatográficas referentes a estes estudos utilizou-se o HPLC Waters Alliance System 2695-series, equipado com uma bomba de gradiente, um forno de coluna e um injetor automático da Alliance Series (Waters, Estados Unidos), ao qual foi acoplado uma coluna LiChroCART Purospher Star C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm DI, $5 \mu\text{m}$ tamanho partícula) (Merck Millipore, Alemanha). A detecção, a identificação e a quantificação foram realizadas mediante o uso de um detetor de fotodíodos (Detector PDA 2998 da Waters, Estados Unidos), sendo especificado no método cromatográfico (ver descrição abaixo), o intervalo de comprimentos de onda ao qual se realizou a monitorização do espectro de UV-Vis, bem como, o comprimento de onda ao qual se realizou a quantificação do analito. Finalmente, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos foram realizados utilizando o programa Empower 3 FR2.

- Método cromatográfico 1

A fase móvel era constituída por dois solventes (A e B), como solvente A utilizou-se a água e como solvente B usou-se o acetonitrilo. O método cromatográfico inicia-se com 25 % do solvente B, seguido de um gradiente linear até atingir 100 % de B durante 7 minutos, em seguida mantém 100 % de B durante 7 minutos, posteriormente diminui linearmente até retomar as condições iniciais (25 % de B) durante 5 minutos e finalmente mantém 25 % do solvente B durante 5 minutos. Todas as análises foram efetuadas à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, com um fluxo constante de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$ e um volume de injeção de $25 \mu\text{L}$. A detecção e identificação dos analitos alvo foi efetuada através da monitorização do espectro de absorção de UV-vis no intervalo de comprimento de onda de 190-600 nm e a quantificação foi efetuada ao comprimento de onda de 220 nm.

- Método cromatográfico 2

A fase móvel era constituída por dois solventes (A e B), como solvente A utilizou-se a água e como B usou-se o acetonitrilo. O método cromatográfico inicia-se com 25 % do solvente B, seguido de um gradiente linear até atingir 100 % de B durante 60 minutos, em seguida mantém 100 % de B durante 5 minutos, posteriormente diminui linearmente até retomar as condições iniciais (25 % de B) durante 5 minutos e finalmente mantém 25 % do solvente B durante 5 minutos. Todas as análises foram conduzidas à temperatura de 25 °C, com um fluxo constante de 0,4 mLmin⁻¹ e um volume de injeção de 25 µL. A detecção e identificação dos analitos alvo foi efetuada através da monitorização do espectro de absorção de UV-vis no intervalo de comprimento de onda de 190-600 nm e a quantificação foi efetuada ao comprimento de onda de 220 nm.

- Método cromatográfico 3

A fase móvel era constituída por dois solventes (A e B), como solvente A utilizou-se a água e como B usou-se o acetonitrilo. O método cromatográfico inicia-se com 25 % do solvente B, seguido de um gradiente linear até atingir 100 % de B durante 80 minutos, em seguida mantém 100 % de B durante 5 minutos, posteriormente diminui linearmente até retomar as condições iniciais (25 % de B) durante 5 minutos e finalmente mantém 25% do solvente B durante 5 minutos. Todas as análises foram conduzidas à temperatura de 25 °C, com um fluxo constante de 0,4 mLmin⁻¹ e um volume de injeção de 25 µL. A detecção e identificação dos analitos alvo foi efetuada através da monitorização do espectro de absorção de UV-vis no intervalo de comprimento de onda de 190-600 nm e a quantificação foi efetuada ao comprimento de onda de 220 nm.

4.2.2.Outros Equipamentos

Quando necessário, as soluções foram agitadas num agitador magnético da marca VWR, modelo VMS-C10, adquirido à VWR (Estados Unidos) ou agitador do tipo vortex, da marca Labinco, modelo L 2.4.

As centrifugações foram executadas numa centrífuga da marca Hettich Zentrifugen, modelo Universal 32 - D-78532b Tuttlingen.

Em alguns ensaios foi necessário a evaporação dos solventes, pelo que se recorreu a um sistema rota-vapor da marca BÜCHI, modelo R-114, equipado com um banho da BÜCHI – B-480, uma bomba da BÜCHI Vacobox B177 e um banho de refrigeração Julabo F25.

As metodologias de extração em fase sólida (SPE e MISPE) foram executadas numa unidade de vácuo para extração em fase sólida fornecida pela Supelco, modelo Visiprep Solid Phase Extraction Manifold, com capacidade total para 20 colunas.

Todas as pesagens foram realizadas numa balança da marca Precisa, modelo 205 A SCS, com definição até cinco casas decimais.

4.3.Procedimentos Experimentais

4.3.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular

Para atingir o objetivo do presente trabalho é preponderante avaliar se os sistemas de impressão molecular apresentam capacidade de reconhecimento molecular para o pesticida alvo. Para tal foram, previamente, realizados diferentes estudos de adsorção molecular, os quais permitiram inferir se os MIPs possuíam as propriedades de ligação desejadas. De modo a avaliar essa característica específica foram usadas as seguintes abordagens:

- i - Cálculo dos Fatores de Impressão Molecular (IFs);
- ii - Estudos de Adsorção em Solução;
- iii - Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE.

i - Cálculo dos Fatores de Impressão Molecular

Com a finalidade de avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros molecularmente impressos procedeu-se à determinação dos seus fatores de impressão molecular (IFs). Por forma a concretizar este objetivo, os MIPs- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e os correspondentes NIPs foram separadamente triturados, moídos e

peneirados, de modo a obter partículas de tamanhos uniformes ($< 45 \mu\text{m}$), de seguida os polímeros obtidos (aproximadamente 250 a 350 mg), foram suspensos em acetonitrilo e empacotados manualmente em colunas de HPLC de aço inoxidável (50 mm x 4,6 mm DI), e cada coluna foi acoplada ao cromatografo LC30, equipado com um detetor de UV-Vis. Posteriormente, procedeu-se à remoção de eventuais resíduos de moléculas molde e/ ou monómeros funcionais, provenientes do processo de síntese dos sistemas de impressão molecular. Esta lavagem foi efetuada fazendo passar pela coluna um fluxo contínuo de metanol-ácido acético (8:2 (v/v)) até se obter uma linha de base estável (aquisição de dados ao comprimento de onda de 220 nm), seguido de uma eluição com metanol para remover o excesso de ácido acético. Após a lavagem, cada coluna foi previamente equilibrada com os mesmos solventes que seriam utilizados como fase móvel na posterior análise cromatográfica, durante uma hora antes da primeira injeção e 10 minutos entre cada injeção. O estudo do perfil de eluição do analito alvo foi realizado à temperatura ambiente, usando solventes de diferentes polaridades, com diferentes fluxos, por forma a otimizar as condições de eluição.

Os valores referentes aos fatores de impressão molecular (IFs) dos MIPs (dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2) foram calculados utilizando o seguinte procedimento experimental: injeção de 10 μL de uma solução de dimetoato em acetonitrilo e injeção de 20 μL de acetona (marcador do volume morto), nas respetivas colunas. Os tempos de retenção para cada substância (dmt e acetona) foram determinados através de uma eluição isocrática com diferentes solventes como fase móvel (metanol, acetonitrilo e misturas destes solventes com água), sendo a sua monitorização e posterior deteção realizada ao comprimento de onda de 220 nm. Posteriormente, procedeu-se ao cálculo dos fatores de retenção (k) para cada MIP e respetivo NIP, nas mesmas condições cromatográficas, utilizando a fórmula: $k = (t_r - t_0) / t_0$, onde t_r corresponde ao tempo de retenção do analito alvo e t_0 representa o tempo de retenção da acetona. Finalmente, o valor de IF para cada sistema de impressão molecular foi calculado através da aplicação da equação: $\text{IF} = k_{\text{MIP}} / k_{\text{NIP}}$, onde o k_{MIP} e o k_{NIP} representam os fatores de retenção do analito alvo no MIP e no NIP, respetivamente.

Todos os ensaios realizados para o cálculo dos fatores de impressão molecular dos MIPs em estudo foram efetuados em triplicado.

ii - Estudos de Adsorção em Solução

As propriedades de ligação dos MIPs- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e dos respectivos NIPs foram ainda avaliadas através dos estudos de adsorção em solução para cada sistema de impressão molecular. Estes ensaios foram realizados de acordo com o seguinte procedimento experimental: o estudo iniciou-se com a adição de soluções de diferentes concentrações do analito alvo (dimetoato) a uma série de frascos de vidro de 10 mL contendo 20 mg de cada MIP/ NIP e 2 mL de acetonitrilo (a concentração de dimetoato em cada frasco variou na gama de concentrações 3-200 mgL⁻¹). Posteriormente, os frascos foram agitados à temperatura ambiente utilizando um agitador magnético (450 rpm) durante 24 horas. Terminado o período de agitação os frascos foram centrifugados e o sobrenadante foi recolhido, filtrado e analisado por HPLC-DAD (as condições cromatográficas encontram-se detalhadamente descritas na secção 4.2.1.), de modo a determinar a concentração de analito livre (C_L) presente em cada solução. A quantificação das diferentes C_Ls foi realizada mediante a utilização de retas de calibração previamente obtidas para o analito alvo. Finalmente o cálculo da quantidade de dimetoato retida nas cavidades dos respetivos MIPs (C_R) foi calculada de forma indireta, subtraindo a concentração de analito livre, à concentração inicial (C_i) do analito em cada uma das soluções (C_R = C_i - C_L). De modo a tornar possível a correlação dos resultados obtidos e a comparação dos diferentes MIPs em estudo, os resultados deste ensaio foram expressos por massa de polímero utilizando a seguinte fórmula: $Q = C_R * V / m$, onde C_R é a concentração do pesticida adsorvido, V é o volume da solução e m a massa do polímero utilizado.

Após a determinação dos valores de Q para cada solução foram traçadas as isotérmicas de ligação para cada MIP/ NIP, que traduzem a quantidade de dmt retido em função da concentração inicial de dmt presente em solução (Q vs C_i). Os dados experimentais obtidos permitiram ainda o cálculo dos parâmetros de ligação mediante a aplicação do modelo de Freundlich.

Todos os ensaios efetuados nos estudos de adsorção em solução foram realizados em duplicado.

iii - Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE

Os estudos de avaliação do reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular- dmt-inif-MIP, tbz-tr-MIP, dn-tr-MIP-1 e dn-tr-MIP-2 e correspondentes NIPs foram realizados utilizando um procedimento experimental baseado em extração em fase sólida. Antes de proceder ao empacotamento das colunas de SPE com os MIPs (tbz-tr-MIP, dn-tr-MIP-1 e dn-tr-MIP-2) e respectivos NIPs foi necessário realizar uma etapa prévia de preparação destes materiais adsorventes, a qual envolveu o seguinte procedimento: cada sistema de impressão molecular foi triturado, moído e peneirado, de modo a obter partículas de tamanhos adequados e uniformes, de seguida foi preparada uma suspensão do polímero (30-50 mg) em metanol, a qual foi acondicionada numa coluna de vidro de SPE (3 mL) entre dois filtros de polietileno. Após o empacotamento, as colunas foram colocadas na unidade de vácuo, conectada a uma bomba de vácuo e, procedeu-se à lavagem dos MIPs e NIPs, fazendo passar pela coluna 10 mL de metanol-ácido acético (1:1 (v/v)), de modo a remover eventuais resíduos de moléculas molde e o excesso de monómeros funcionais remanescentes da etapa da síntese, seguido de 20 mL de metanol para remover o ácido acético. De modo a avaliar se o anterior passo de lavagem seria eficiente na remoção dos resíduos (molécula molde e/ ou monômero funcional) procedeu-se à aplicação de 1 mL de metanol nas colunas MISPE e a fração recolhida foi evaporada até à secura sob corrente de azoto, reconstituída com 1 mL de acetonitrilo e, de seguida, analisada por HPLC-DAD (método cromatográfico 1 - secção 4.2.1.).

O procedimento geral de extração MISPE (aplicado para avaliar a capacidade de reconhecimento molecular) inicia-se com a etapa de acondicionamento do material adsorvente, que consiste em fazer passar pela coluna de extração 5 mL de metanol, seguido de 5 mL do mesmo solvente que é utilizado na etapa de aplicação da amostra. Em seguida, no passo de aplicação de amostra, procedeu-se à aplicação, na coluna MISPE, de uma alíquota de 1 mL das diferentes soluções de pesticidas alvo as quais contêm concentrações conhecidas do respetivo analito em estudo. Com o objetivo de eliminar eventuais ligações não-específicas entre os analitos alvo e a matriz polimérica dos sistemas de impressão em estudo, realizou-se uma etapa de lavagem, mediante a aplicação de um solvente adequado. Finalmente os analitos de interesse que se encontravam retidos nos diferentes sistemas de impressão molecular foram eluídos com

2 mL de metanol. As diferentes frações recolhidas foram evaporadas até à secura sob corrente de azoto, reconstituídas com 1 mL de acetonitrilo e, de seguida, analisadas por HPLC-DAD (método cromatográfico 1 - secção 4.2.1.), de modo a determinar as concentrações de cada pesticida (dimetoato, terbutilazina e deltametrina) retidas nos MIPs e correspondentes NIPs (C_R). Os resultados destes ensaios foram expressos por massa (m) de polímero, tendo sido determinado o valor de Q.

Na tabela 7 encontram-se sumarizadas as diferentes condições experimentais (massa de polímero, solventes e volumes) utilizadas nas várias etapas do processo de extração em fase sólida para os vários sistemas de impressão molecular em estudo.

Todos os estudos de reconhecimento molecular utilizando o procedimento MISPE foram realizados em triplicado e aplicados aos MIPs da terbutilazina, deltametrina e dimetoato, este último obtido pela via do Iniferter.

Tabela 7. Condições experimentais das várias etapas de extração em fase sólida utilizadas para avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos diferentes MIPs/ NIPs em estudo.

Sistemas de Polímeros Impressos	Massa de MIP/ NIP	Acondicionamento	Aplicação da Amostra	Lavagem	Eluição
dmt-inif-MIP e dmt-inif-NIP	30 mg	5 mL metanol 5 mL heptano	1 mL soluções dmt em heptano*	2 mL heptano	2 mL metanol
tbz-tr-MIP e tbz-tr-NIP	50 mg	5 mL metanol 5 mL diclorometano	1 mL soluções tbz em diclorometano*	1 mL diclorometano	1,5 mL metanol
dn-tr-MIP-1 e dn-tr-NIP-1	50 mg	5 mL metanol 5 mL heptano	1 mL solução dn em heptano (1,0 mg L ⁻¹)**	2 mL heptano/ diclorometano (9:1 (v/v))	2 mL metanol
dn-tr-MIP-2 e dn-tr-NIP-2	50 mg	5 mL metanol 5 mL heptano	1 mL solução dn em heptano (1,0 mg L ⁻¹)**	2 mL heptano/ diclorometano (9:1 (v/v))	2 mL metanol

*As concentrações de cada analito alvo aplicadas na etapa de “Aplicação da Amostra” variaram no intervalo de concentrações 8-500 mgL⁻¹ para o dmt-inif-MIP/ dmt-inif-NIP e 50-1000 mgL⁻¹ para o tbz-tr-MIP/ tbz-tr-NIP; **Para o dn-tr-MIP-1, dn-tr-MIP-2 e correspondentes NIPs os estudos de reconhecimento molecular foram realizados apenas para a concentração de 1,0 mgL⁻¹.

4.3.2. Estudos de Seletividade para os Sistemas de Impressão Molecular face a Compostos Análogos dos Analitos Alvo

É de crucial importância que os adsorventes para SPE baseados em polímeros molecularmente impressos apresentem uma elevada especificidade e seletividade para o analito alvo. Deste modo, neste trabalho procedeu-se à avaliação da especificidade da capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular- dmt-inif-MIP, tbz-tr-MIP e dn-tr-MIP-2 e correspondentes NIPs, face a análogos de cada um dos analitos alvo. Assim, para este estudo foram selecionados análogos do dimetoato (metidatião, fentião, ometoato e malatião), da terbutilazina (atrazina e ametrina) e da deltametrina (lambda-cialotrina, fenpropatrina e fenotrina). Estes estudos foram realizados utilizando os MIPs/ NIPs como adsorventes da extração em fase sólida, por forma a determinar as taxas de recuperação de cada pesticida alvo e dos seus análogos, relativamente a cada um dos sistemas de impressão molecular, utilizando um procedimento análogo ao desenvolvido para os “Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE” (secção 4.3.1. – iii). Em particular, nos ensaios referentes aos sistemas de polímeros impressos- dmt-inif-MIP/ dmt-inif-NIP e tbz-tr-MIP/ tbz-tr-NIP, a concentração das soluções de dimetoato e terbutilazina aplicadas na etapa de “Aplicação da Amostra”, foram de 50 mgL^{-1} para ambos os pesticidas. Todos os ensaios executados neste estudo foram realizados em triplicado.

4.3.3. Implementação da Metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração

Os polímeros molecularmente impressos - dmt-inif-MIP, tbz-tr-MIP e dn-tr-MIP-2 e os respetivos NIPs foram utilizados como materiais adsorventes na extração em fase sólida, de modo a implementar diferentes metodologias MISPE para a deteção e quantificação de resíduos dos diferentes pesticidas em estudo (dimetoato, terbutilazina e deltametrina) na matriz alimentar azeite.

Com a finalidade de concretizar este objetivo, 50 mg dos MIPs/ NIPs, anteriormente referidos, foram devidamente acondicionados em colunas de SPE de vidro (3mL). O enchimento das colunas foi realizado com os diferentes MIPs previamente humedecidos em metanol, de seguida, para que a camada polimérica não

ficasse demasiado comprimida, a adição do segundo filtro foi realizada cuidadosamente, após se observar o aumento máximo de volume.

Após o empacotamento das diferentes colunas MISPE/ NISPE, cada uma delas foi colocada na unidade de vácuo e, procedeu-se a uma prévia lavagem, fazendo passar pela coluna 10 mL de metanol-ácido acético (1:1 (v/v)), seguido de 20 mL de metanol. De modo a avaliar a eficiência deste passo de lavagem procedeu-se à eluição de cada uma das colunas MISPE com 1 mL de metanol e a fração recolhida foi evaporada até à secura sob corrente de azoto, reconstituída com 1 mL de acetonitrilo e, de seguida, analisada por HPLC-DAD (método cromatográfico 1 - secção 4.2.1.).

De seguida, para obter uma melhor eficiência de extração e maior capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros molecularmente impressos procedeu-se à otimização da natureza e do volume dos solventes que são aplicados em cada etapa (acondicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição), do volume de amostra que é aplicado, bem como o caudal de passagem das soluções e dos diversos solventes através da fase sólida adsorvente.

O acondicionamento de cada coluna MISPE/ NISPE consistiu em fazer passar pelo cartucho 5 mL de metanol, seguido de 5 mL do mesmo solvente que seria utilizado na etapa de aplicação da amostra.

Por forma a otimizar a etapa de aplicação da amostra foi estudado o efeito de vários solventes com diferentes polaridades, bem como a influência de diversos volumes destes solventes, na eficiência de retenção de cada sistema de impressão molecular para os respetivos pesticidas alvo. Para alcançar esse objetivo, soluções contendo uma determinada concentração dos vários pesticidas ($29,0 \text{ mgL}^{-1}$ de dmt, $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ de tbz e $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de dn) em diferentes solventes (metanol, acetonitrilo, diclorometano e heptano) foram aplicados às respetivas colunas MISPE/ NISPE, de seguida, a quantidade de cada pesticida que não ficava retido na matriz polimérica adsorvente foi determinada por HPLC-DAD (método cromatográfico 1 - secção 4.2.1.). Após a seleção do solvente mais adequado para o passo de aplicação de amostra foram testados diferentes volumes desse solvente, reproduzindo o mesmo procedimento de extração. Por sua vez, a etapa de aplicação da amostra foi realizada de forma lenta (0,5

gotas por segundo), para que toda a fase estacionária fosse uniformemente utilizada, garantindo uma maior retenção dos analitos a extrair.

Posteriormente, após a etapa de aplicação da amostra é crucial efetuar uma etapa de limpeza, vulgarmente designada de lavagem, de modo a eliminar os compostos interferentes retidos na matriz polimérica através de ligações não específicas, sem remover os analitos de interesse (pesticidas alvo). Para realizar a otimização desta etapa cada coluna foi devidamente acondicionada e de seguida procedeu-se ao carregamento da amostra utilizando soluções contendo concentrações conhecidas dos diferentes pesticidas no solvente apropriado (previamente otimizado na etapa referida anteriormente). No passo de lavagem fez-se passar pelas colunas diferentes solventes e misturas desses solventes e, finalmente as alíquotas obtidas durante esta etapa foram recolhidas e analisadas por HPLC-DAD (método cromatográfico 1 - secção 4.2.1.), o que permitiu avaliar o efeito de cada solvente na remoção dos analitos alvo para cada coluna MISPE/ NISPE. De modo a obter uma perceção mais precisa da quantidade de analito alvo que efetivamente fica adsorvida na matriz polimérica durante a etapa de lavagem é realizado um passo posterior de remoção do pesticida alvo mediante a aplicação de 2 mL de metanol, sendo esta fração também analisada por HPLC-DAD.

Por último, o metanol foi selecionado como solvente de eluição dos analitos alvo (dmt, tbz e dn) para as diferentes metodologias MISPE desenvolvidas no presente estudo (ver resultados nos capítulos seguintes). De modo a avaliar qual o volume de eluição mais adequado para eluir a totalidade dos analitos retidos na matriz polimérica, frações sucessivas de 1 mL deste solvente foram recolhidos durante a eluição e analisados por HPLC-DAD (método cromatográfico 1 - secção 4.2.1.). Para tornar a recuperação dos analitos de interesse mais eficiente, a eluição foi realizada utilizando um fluxo de aproximadamente 0,5 gotas por segundo.

Todos os ensaios realizados durante o processo de otimização das condições de extração das metodologias MISPE foram realizados em triplicado.

4.3.4. Validação das Metodologias MISPE para a Detecção e Quantificação dos Pesticidas Alvo Presentes na Matriz Azeite

Após a otimização das condições envolvidas em cada etapa dos diferentes procedimentos de extração (detalhadamente apresentadas na secção 4.3.3.) foi possível desenvolver uma metodologia MISPE específica para a extração e posterior análise cromatográfica de cada pesticida alvo- dmt, tbz e dn. No caso particular deste trabalho foram desenvolvidas 3 metodologias distintas, denominadas de dmt-inif-MISPE, tbz-tr-MISPE e dn-tr-MISPE, cuja eficiência para a extração dos respectivos pesticidas alvo foi testada utilizando amostras de azeite biológico, ao qual foi adicionado concentrações conhecidas de cada um dos pesticidas.

Para a validação de cada uma das metodologias MISPE referidas anteriormente, utilizaram-se várias colunas de SPE contendo dmt-inif-MIP, tbz-tr-MIP e dn-tr-MIP-2 como adsorventes poliméricos, as quais foram previamente preparadas durante o estudo “Implementação da metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração” (secção 4.3.3.). As condições experimentais relativas a cada uma das metodologias MISPE encontram-se sumarizadas na tabela 8. Durante o processo de extração envolvido em cada metodologia MISPE, as etapas de aplicação da amostra e eluição dos analitos de interesse foram realizadas com um fluxo de aproximadamente 0,5 gotas por segundo, enquanto nas etapas de acondicionamento e lavagem aplicou-se um fluxo de 1 gota por segundo. Posteriormente, as alíquotas provenientes da etapa de eluição foram recolhidas, evaporadas até à secura e, os resíduos obtidos foram dissolvidos com 1 mL de acetonitrilo e analisados por HPLC-DAD.

No fim de cada procedimento de extração, as colunas MISPE foram regeneradas realizando uma lavagem dos adsorventes poliméricos com 1 ml de uma solução de metanol-ácido acético (8:2 (v/v)), seguida de 5 mL de metanol, com um fluxo de aproximadamente 2 gotas por segundo.

Todos os ensaios realizados durante a validação das diferentes metodologias MISPE para a deteção e quantificação dos pesticidas alvo presentes na matriz azeite foram realizados em triplicado.

Tabela 8. Condições experimentais das várias etapas envolvidas na validação das metodologias MISPE desenvolvidas para a posterior detecção e quantificação dos pesticidas alvo presentes na matriz azeite.

Metodologias MISPE	Adsorvente polimérico (MIP)	Massa de MIP	Acondicionamento	Aplicação da Amostra	Lavagem	Eluição	Método Cromatográfico
dmt-inif-MISPE	dmt-inif-MIP	50 mg	4 mL metanol 4 mL heptano	1 g azeite contendo uma concentração 29,0-2,0 μgg^{-1} de dmt diluída com 10 mL heptano	2 mL heptano/ diclorometano (8:2 (v/v))	1 mL metanol	Método cromatográfico 2
tbz-tr-MISPE	tbz-tr-MIP	50 mg	5 mL metanol 5 mL diclorometano	1g azeite contendo uma concentração 0,05-0,025 μgg^{-1} de tbz diluída com 10 mL diclorometano	2mL heptano 1 mL diclorometano	1 mL metanol	Método cromatográfico 3
dn-tr-MISPE	dn-tr-MIP-2	50 mg	5 mL metanol 5 mL heptano	1g azeite contendo uma concentração 0,4-1,0 μgg^{-1} de dn diluída com 5 mL heptano	2mL heptano 1 mL heptano/ diclorometano (9:1 (v/v))	1 mL metanol	Método cromatográfico 3

Para a realização do presente estudo utilizou-se um azeite biológico, contudo, de modo a garantir que não existia na sua composição resíduos dos diferentes pesticidas alvo, antes do azeite ser dopado com os pesticidas em estudo, uma amostra do azeite biológico foi previamente aplicada a cada metodologia MISPE de acordo com as condições referidas na tabela 8 (com a exceção de que no passo de aplicação da amostra o azeite utilizado não se encontrava dopado) e, as alíquotas obtidas foram analisadas por HPLC-DAD.

O azeite biológico utilizado para a validação das diferentes metodologias MISPE foi previamente dopado com concentrações conhecidas dos diferentes pesticidas alvo em heptano, de seguida cada solução padrão foi homogeneizada num agitador magnético durante 5 minutos e incubada a 45 °C durante 20 minutos.

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade da metodologia dn-tr-MISPE desenvolvida no presente estudo, procedeu-se ao seguinte ensaio: pesaram-se 3 porções de 50 mg do respetivo MIP, que por sua vez foram devidamente acondicionadas em 3 colunas de SPE. De seguida realizou-se o procedimento de extração para cada uma destas colunas, reproduzindo as condições experimentais que se encontram descritas na tabela 8 para a metodologia dn-tr-MISPE. As alíquotas obtidas foram analisadas por HPLC-DAD. Para cada coluna os ensaios foram realizados em triplicado.

4.3.5.Método da Adição de Padrão

Experimentalmente, a aplicação do método da adição de padrão (SAM) à metodologia dmt-inif-MISPE envolveu a prévia extração de uma amostra de azeite biológico dopado com uma concentração conhecida de dimetoato ($2,0 \mu\text{g g}^{-1}$), reproduzindo as condições analíticas referentes à respetiva metodologia MISPE (como descrito na Tabela 8 – secção 4.3.4.). A fração obtida (1 mL) foi dividida em cinco volumes iguais (200 μL), de seguida uma destas frações foi transferida para um frasco de vidro de 1,5 mL (*vial*) ao qual se adicionou acetonitrilo até perfazer um volume final de 1 mL (solução teste) e subsequentemente foi analisada por HPLC-DAD. As restantes frações foram igualmente transferidas para 4 *vials*, foram dopadas com diferentes concentrações de dmt ($1,0\text{-}2,0 \text{ mg L}^{-1}$) e, o volume final foi ajustado com acetonitrilo até perfazer 1 mL, finalmente procedeu-se à análise das soluções finais (S_2 , S_3 , S_4 e S_5) por HPLC-DAD. As análises cromatográficas elaboradas neste ensaio foram todas

realizadas mediante o método cromatográfico 2 (secção 4.2.1.). Após a análise cromatográfica das soluções S₂, S₃, S₄ e S₅ foi traçado um gráfico, no qual os valores referentes às áreas obtidas para cada solução são representados no eixo das ordenadas e os valores das concentrações adicionadas a cada uma das 4 amostras são representados no eixo das abcissas, permitindo traçar uma linha de regressão linear. A concentração do analito na amostra em análise é obtida por extrapolação da reta no ponto onde esta interseca o eixo das abcissas. Este valor corresponde em valor absoluto à concentração do analito na solução em análise sem qualquer adição de padrão (solução teste).

O mesmo procedimento foi aplicado à metodologia dn-tr-MISPE, com a exceção de que a amostra de azeite era inicialmente dopada com uma concentração de 1,0 µg g⁻¹ de deltametrina, por sua vez, a concentração de dn adicionada a cada uma das 4 frações (S₂, S₃, S₄ e S₅) variou no intervalo 0,95-1,59 mg L⁻¹ e, as análises cromatográficas efetuadas neste estudo foram realizadas através do método cromatográfico 3 (secção 4.2.1.).

4.3.6. Estudos Comparativos das Metodologias MISPE com os Cartuchos de SPE C₁₈ Comerciais

Para aferir o sucesso das diferentes metodologias MISPE desenvolvidas no presente trabalho, foram realizados estudos comparativos com os cartuchos comerciais de SPE (C₁₈). Para atingir este objetivo utilizou-se a metodologia descrita por Bakas e seus colaboradores (Bakas *et al.*, 2012), a qual envolve o prévio isolamento dos analitos alvo por extração líquido-líquido, seguido da purificação da fração obtida através da extração em fase sólida utilizando os cartuchos convencionais de SPE.

Experimentalmente, a extração líquido-líquido consistiu em adicionar a uma ampola de decantação de 50 mL, 1 g de azeite dopado com uma concentração conhecida do pesticida em estudo, juntamente com 25 mL de acetonitrilo, de seguida a ampola de decantação foi agitada vigorosamente durante 2 minutos e repousou durante 3 horas no frigorífico a 18 °C. Decorrido esse tempo, após a completa separação das duas fases recolheu-se cuidadosamente a fase sobrenadante de acetonitrilo para um balão de fundo redondo de 100 mL. De modo a aumentar a eficiência de extração da técnica LLE adicionaram-se novamente 25 mL de acetonitrilo à ampola de decantação contendo a amostra de azeite inicial e repetiu-se o procedimento de extração. A solução total

recolhida (50 mL) foi evaporada utilizando o rota-vapor até se obter uma alíquota de aproximadamente 3 mL. Posteriormente, esta alíquota foi aplicada num cartucho Sep-Pak C₁₈ (1 g), previamente lavado com 12 ml de metanol e acondicionado com 12 ml de acetonitrilo e, os analitos de interesse foram eluídos com 1,5 mL de metanol. Por fim, a alíquota recolhida foi evaporada até à secura, sob uma corrente de azoto, o resíduo obtido foi reconstituído com 1 mL de acetonitrilo e analisado por HPLC-DAD, utilizando o método cromatográfico 2 para a deteção e quantificação do dimetoato e o método cromatográfico 3 para a deteção e quantificação da terbutilazina e da deltametrina (secção 4.2.1.). Esta metodologia foi realizada em triplicado para cada um dos pesticidas alvo. As concentrações de cada pesticida presentes nas diferentes amostras de azeite aplicadas neste estudo foram de 5,8 µgg⁻¹, 0,05 µgg⁻¹ e 1,0 µgg⁻¹ para o dimetoato, a terbutilazina e a deltametrina, respetivamente.

4.3.7. Estudos Comparativos das Metodologias MISPE com os QuEChERS

No presente estudo foram realizados estudos comparativos das metodologias MISPE desenvolvidas para os diferentes pesticidas alvo com a metodologia QuEChERS proposta por Cunha e seus colaboradores (Cunha *et al.*, 2007).

Em concreto, a metodologia QuEChERS realizada neste trabalho seguiu o seguinte procedimento experimental: para um tubo de TeflonR (50 ml) pesou-se uma amostra de 3 g de azeite dopado com uma concentração conhecida do pesticida a analisar e, de seguida adicionaram-se 7 mL de H₂O, 10 mL de acetonitrilo, 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl. Posteriormente, a amostra contida no interior do tubo foi vigorosamente agitada durante 1 min e centrifugou-se a 3000 rpm durante 3 min. Após a centrifugação recolheu-se uma alíquota de 2 mL da fase superior (sobrenadante), a qual foi adicionada a um tubo de TeflonR (15 ml) juntamente com 300 mg de MgSO₄ anidro, 100 mg de PSA, 100 mg de C₁₈ e 100 mg de carvão ativado. O tubo foi agitado durante 20 segundos em vortex e centrifugou-se a 3000 rpm durante 3 min. Por fim, uma alíquota de 1 mL da amostra obtida foi filtrada, transferida para um micro-frasco de vidro de 1,5 mL e analisada por HPLC-DAD (método cromatográfico 2 para o dmt e método cromatográfico 3 para a tbz e dn - secção 4.2.1.). Esta metodologia foi realizada em triplicado para cada um dos pesticidas alvo, sendo que as concentrações de cada

pesticida presente nas diferentes amostras de azeite aplicadas neste estudo foram de 5,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o dmt, tbz e dn, respetivamente.

4.3.8. Estudos Comparativos da Metodologia tbz-tr-MISPE com os Cartuchos MISPE Disponíveis Comercialmente para a Classe das Triazinas

A metodologia tbz-tr-MISPE desenvolvida para a extração seletiva de terbutilazina em amostras de azeite foi ainda comparada com os cartuchos MISPE disponíveis comercialmente para a classe das triazinas.

É de referir que os cartuchos MISPE específicos para a classe das triazinas que atualmente se encontram disponíveis comercialmente (SupelMIPTM Triazine 10 SPE Column) foram especificamente desenvolvidos para a análise de diferentes pesticidas pertencentes à classe das triazinas em amostras de água, pelo que o procedimento geral de extração delineado para estes cartuchos não era compatível com as amostras de azeite utilizadas no presente estudo. Deste modo, com a finalidade de desenvolver uma metodologia para a deteção e quantificação de terbutilazina a partir da matriz azeite, utilizando os cartuchos comerciais, foi necessário realizar uma prévia otimização das diferentes condições envolvidas no processo de extração.

Experimentalmente, o procedimento de extração desenvolvido neste trabalho iniciou-se com o acondicionamento dos cartuchos MISPE comerciais, através da adição de 3 mL de metanol, seguido de 3 mL de diclorometano, na etapa seguinte aplicou-se 1 g de azeite contendo uma concentração de 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terbutilazina, diluída com 10 mL de diclorometano, subsequentemente procedeu-se ao passo de lavagem, mediante a passagem pelo cartucho de 1 mL de heptano, seguido de 1 mL de diclorometano e, finalmente os analitos retidos na matriz polimérica foram removidos com 1 mL de metanol. As amostras recolhidas foram analisadas por HPLC-DAD (método cromatográfico 3 - secção 4.2.1.). Este estudo foi realizado em triplicado.

4.3.9. Aplicação das Metodologias MISPE para a Detecção e Quantificação dos Diferentes Pesticidas Alvo em Azeites Comerciais

Após a implementação e validação das metodologias dmt-inif-MISPE, tbz-tr-MISPE e dn-tr-MISPE desenvolvidas no âmbito do plano de estudos do presente trabalho, cada uma destas metodologias foi utilizada para estudar a eventual presença e posterior quantificação dos diferentes pesticidas alvo (dimetoato, terbutilazina e deltametrina) de um conjunto de amostras de azeite produzidas em diferentes regiões de Portugal. Em concreto, para cada região de produção (Alentejo, Trás-os-Montes e Beiras) selecionaram-se aleatoriamente três produtores distintos (P1, P2 e P3), por sua vez para cada produtor analisaram-se três garrafas (G1, G2 e G3) do mesmo lote e, finalmente para cada garrafa foram realizadas três repetições.

A pesquisa dos diferentes pesticidas alvo nas amostras de azeite referidas anteriormente foi realizada utilizando as metodologias dmt-inif-MISPE, tbz-tr-MISPE e dn-tr-MISPE reproduzindo as condições experimentais que se encontram descritas na tabela 8 (secção 4.3.4.), à exceção de que as amostras dos azeites em análise não eram dopadas com os pesticidas em estudo. Contudo, com a finalidade de controlar e assegurar a performance das diferentes metodologias analíticas, quando se iniciavam os estudos para cada produtor, foram aplicadas amostras dos respetivos azeites contendo uma concentração dos pesticidas alvo igual ao LMR.

4.3.10. Identificação e Quantificação dos Pesticidas

A identificação de cada pesticida em estudo foi realizada por comparação do tempo de retenção do analito complementado com a análise do seu espectro de absorção de UV-Vis, com os correspondentes ao do composto padrão. Para a quantificação do analito alvo foram traçadas retas de calibração, utilizando uma série de soluções-padrão de concentrações conhecidas para cada pesticida alvo, as quais foram analisadas por HPLC-DAD. Os resultados obtidos permitiram a obtenção de uma representação gráfica de área vs concentração de analito e o cálculo da respetiva equação da reta do tipo $y = b + mx$ (Tabela 9). É de salientar, que o traçado das retas de calibração é efetuado para uma gama definida de concentrações de modo a permitir que, posteriormente, aquando da quantificação do analito, o valor referente à sua concentração possa ser determinado

por interpolação. As análises de cada solução foram realizadas em triplicado, sendo apenas apresentado o valor médio. Os parâmetros analíticos para as curvas de calibração referentes a cada pesticida são apresentadas na tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros analíticos das curvas de calibração de cada pesticida alvo.

Padrões	Deteção (nm)	b	m	R ²	C (mgL ⁻¹)	LOD ¹ (mgL ⁻¹)	LOQ ² (mgL ⁻¹)
Dimetoato^a	220	0,8563	0,8149	0,9996	2-254	0,5	1,7
Dimetoato^b	220	-5615,9	27489	0,9998	1-100	1,6	5,2
Dimetoato^b	220	-125493	25268	0,9994	100-600	13,0	45,0
Ometoato^b	220	3530,1	10026	0,9990	8-60	2,3	7,0
Malatião^b	220	7023,1	22186	1	4-60	0,053	1,6
Metidatião^b	220	31184	66778	1	1,4-60	0,36	1,1
Fentião^b	220	14560	73621	0,9996	0,5-64	2,0	5,9
Terbutilazina^b	220	1518,7	446174	0,9992	0,01-0,07	0,002	0,006
Terbutilazina^b	220	433754	384902	0,9995	2,1-104,0	3,0	10,0
Atrazina^b	220	337922	434954	0,9999	1,0-130	2,0	6,0
Ametrina^b	220	264027	459369	0,9999	1,0-140	1,4	4,0
Deltametrina^a	220	-0,0171	1,2032	0,9992	0,1-10	0,35	1,6
Deltametrina^a	220	-22,589	1,9076	0,9997	38-380	25,0	80,0
Deltametrina^b	220	-252,32	117765	0,9996	0,01-0,09	0,002	0,007
Deltametrina^b	220	3862	145557	0,9996	0,07-1,00	0,030	0,080
Deltametrina^c	220	10001	136217	0,9998	0,26-1,17	0,044	0,130
λ-Cialotrina^b	220	-240,32	241711	0,9994	0,08-1,14	0,035	0,100
Fenproatrina^b	220	1006,6	217486	0,9997	0,09-1,31	0,030	0,090
Fenotrina^b	220	30567	229887	0,9998	0,02-0,46	0,010	0,030

As retas de calibração foram obtidas utilizando: ^aMétodo Cromatográfico; ^bMétodo Cromatográfico 1; ^cMétodo Cromatográfico 3 (secção 4.2.1.); (b) Ordenada na origem; (m) Declive; (R²) Coeficiente de determinação; (C) Intervalo de concentrações; ¹Limite máximo de deteção (LOD = (SD * 10)/ declive); ²Limite máximo de quantificação (LOQ = (SD * 3,3)/ declive)); SD – Desvio padrão residual da reta.

4.4.Referências Bibliográficas

Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istamboulie G., Piletskyc S., Piletska E., Ait-Ichoub I., Ait-Addib E., Noguera T., Rouillona R. (2012). Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, **734**, 99-105.

Cunha S. C., Lehotay S. J., Mastovska K., Fernandes J. O., Beatriz M., Oliveira P. P. (2007). Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science*, **30**, 620-632.

Garcia R., Martins N., Carreiro E. P., Simões M., Carrott M. M. L., Carrott P. J. M., Burke A. J., Cabrita M. J. (2015). Development of a selective sorbent for the solid-phase extraction of terbuthylazine in olive oil samples: A molecular imprinting strategy. *Journal of Separation Science*, **38**, 1204-1212.

Martins N., Carreiro E. P., Locati A., Ramalho J. P. P., Cabrita M. J., Burke A. J., Garcia R. (2015a). Design and development of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of deltamethrin in olive oil: an integrated computational-assisted approach. *Journal of Chromatography A*, **1409**, 1-10.

Martins N., Carreiro E. P., Simões M., Cabrita M. j., Burke A. J., Garcia R. (2015b). Na emerging approach for the targeting analysis of dimethoate in olive oil: The role of molecularly imprinted polymers based on photo-iniferter induced “living” radical polymerization. *Reactive & Functional Polymers*, **86**, 37-46.

Simões M., Martins N., Cabrita M. J., Burke A. J., Garcia R. (2014). Tailor-made molecularly imprinted polymers for dimethoate and deltamethrin recognition: synthesis, characterization and chromatographic evaluation. *Journal of Polymer Research*, **21**, 368-380.

5.Resultados e Discussão

I

Polímeros Molecularmente Impressos Seletivos para o Dimetoato: Aplicação como Adsorventes na Extração em Fase Sólida para a sua Detecção e Quantificação em Azeite

A maioria dos resultados apresentados nesta secção foram publicados no formato de artigo científico nas seguintes revistas internacionais com arbitragem científica: Simões M., Martins N., Cabrita M. J., Burke A. J., Garcia R. (2014) Journal of Polymer Research 21: 368-380 e Martins N., Carreiro E. P., Simões M., Cabrita M. J., Burke A. J., Garcia R. (2015). Reative & Functional Polymers 86, 37-46.

5.I.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular

5.I.1.1.Avaliação Cromatográfica: Fatores de Impressão Molecular

O cálculo dos fatores de impressão molecular (IFs) tem sido referido como um método rápido e fácil para avaliar as propriedades de ligação dos polímeros molecularmente impressos (Spivak, 2005). Atendendo à heterogeneidade dos locais de ligação que são produzidos na matriz polimérica durante o processo de síntese dos MIPs, em particular nos sistemas de impressão molecular sintetizados pelo método não-covalente, tornou-se crucial proceder à avaliação da capacidade de reconhecimento molecular destes materiais poliméricos de modo a averiguar a utilidade destes adsorventes seletivos para o isolamento/ pré-concentração do analito alvo.

Assim, no presente estudo os sistemas de impressão molecular- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e os correspondentes NIPs foram aplicados como fases estacionárias de colunas cromatográficas de HPLC, por forma a avaliar experimentalmente a sua capacidade de adsorção e a especificidade das interações que são estabelecidas entre o dimetoato e os locais de ligação existentes na matriz polimérica.

Com essa finalidade, o primeiro estudo realizado neste trabalho consistiu em avaliar o efeito do uso de diferentes fases móveis, por exemplo em termos de polaridade, no perfil de eluição do analito alvo a partir do sistema de impressão molecular que é utilizado como fase estacionária. Contudo, verificou-se que a capacidade de reconhecimento molecular do dmt-tr-MIP-2 não poderia ser avaliada mediante esta metodologia, uma vez que durante o acondicionamento da respetiva coluna de HPLC a pressão do sistema cromatográfico aumentava drasticamente impedindo a realização do ensaio. O aumento de pressão deve-se a uma enorme variação de volume, fenómeno vulgarmente designado de *swelling*, que este MIP apresentava, o qual se encontrava fortemente dependente do tipo de solvente utilizado como fase móvel, sendo que o maior aumento de volume foi obtido com o metanol. Provavelmente, este efeito encontra-se associado à excessiva solvatação dos grupos funcionais insaturados que se situam nos locais de ligação presentes neste adsorvente polimérico (Maier *et al.*, 2004).

Pelo contrário, para o sistema de impressão molecular dmt-tr-MIP-1 verificou-se apenas um ligeiro aumento do seu volume, quando este MIP se encontrava empacotado na coluna cromatográfica, particularmente quando se usou metanol como fase móvel, tendo-se atingido uma pressão máxima de cerca de 320 psi, pelo que foi possível experimentalmente a realização deste ensaio.

Em seguida, para avaliar a capacidade de reconhecimento molecular do dmt-tr-MIP-1 foi necessário proceder-se previamente à otimização das diferentes variáveis que influenciam este estudo, nomeadamente a quantidade de MIP/ NIP utilizada como fase estacionária, a composição da fase móvel, o fluxo, bem como os volumes da solução de dmt e de acetona, de modo a obter um adequado perfil de eluição. A figura 16 mostra os diferentes perfis cromatográficos referentes ao dimetoato, obtidos durante a otimização das diferentes fases móveis, utilizando uma coluna cromatográfica de HPLC empacotada manualmente com 300 mg de dmt-tr-MIP-1.

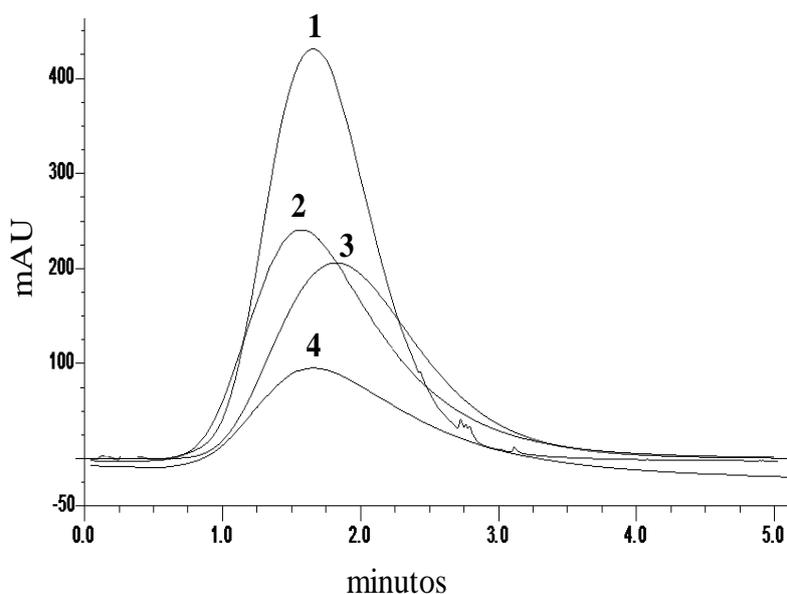


Figura 16. Perfis cromatográficos relativos à eluição do dimetoato da coluna cromatográfica contendo o dmt-tr-MIP-1 como fase estacionária, mediante a utilização de diferentes fases móveis: (1) acetonitrilo-água (8:2 (v/v)); (2) acetonitrilo; (3) metanol e (4) metanol-água (8:2 (v/v)); fluxo de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$ e detecção $\lambda = 220 \text{ nm}$.

De acordo com a figura 16 (1 - 4) é possível verificar que a natureza das diferentes fases móveis utilizadas para eluir o dimetoato influencia diretamente o tempo de retenção do pesticida e a forma dos picos obtidos, dado que as interações que se estabelecem entre os analitos alvo e a fase estacionária (MIP) dependem da polaridade dos solventes utilizados na fase móvel. Mais precisamente, a utilização de acetonitrilo-água (8:2 (v/v)) como fase móvel permitiu a eluição do dmt sob a forma de um pico relativamente simétrico, enquanto que a utilização de acetonitrilo, metanol e metanol-água (8:2 (v/v)) como fases móveis provocaram o aparecimento de uma cauda no pico (*tailing*) do dmt, resultante do excessivo arrastamento do analito alvo ao longo da fase estacionária. Assim, foi possível concluir que o perfil de eluição mais adequado (Figura 16 – 1) foi obtido quando se utilizou uma solução de acetonitrilo-água (8:2 (v/v)) como fase móvel e um fluxo de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$, traduzindo-se no aumento da relação sinal-ruído e na eficiência da coluna. Por observação da figura 16, é ainda notório que os perfis cromatográficos de eluição do dmt das colunas cromatográficas contendo o dmt-tr-MIP-1 como fase estacionária foram sensivelmente mais alargados, comparativamente com os obtidos utilizando colunas convencionais de fase reversa C_{18} . É de referir, que esta evidência experimental foi também observada por outros grupos de investigação que utilizaram nos seus estudos sistemas de impressão molecular como fases estacionárias de colunas de HPLC (Tang *et al.*, 2008).

Finalmente, para avaliar a eficácia da etapa de síntese do dmt-tr-MIP-1 procedeu-se ao cálculo dos seus fatores de impressão molecular (IF), de acordo com a metodologia descrita na secção 4.3.1. (i). Para atingir este objetivo, foi realizado um estudo detalhado que envolveu o uso de várias fases móveis e diferentes fluxos para calcular os valores referentes aos fatores de retenção (k) para o MIP e para o respetivo NIP. Dado que as colunas de HPLC foram empacotadas manualmente, de modo a corrigir as eventuais variações dos tempos de retenção do dimetoato, recorreu-se à utilização da acetona como marcador de volume morto, de modo a ajustar os valores de k. Os valores experimentais de IF referentes ao sistema de impressão molecular em estudo são apresentados na tabela 10, o ensaio foi realizado em triplicado, sendo que os valores apresentados na tabela correspondem ao valor médio.

Tabela 10. Fatores de impressão molecular (IF) referentes ao dmt-tr-MIP-1 em função das condições cromatográficas utilizadas.

Condições Cromatográficas (Fase Móvel; Fluxo)	k_{MIP}	k_{NIP}	IF
CH ₃ CN; 1,0 mLmin ⁻¹	0,09	0,25	0,36
CH ₃ CN; 0,5 mLmin ⁻¹	0,12	0,24	0,50
CH ₃ CN; 0,3 mLmin ⁻¹	0,10	0,18	0,80
CH ₃ CN/ H ₂ O (9:1 (v/v)); 0,5 mLmin ⁻¹	0,09	0,10	0,90
CH ₃ CN/ H ₂ O (8:2 (v/v)); 0,5 mLmin ⁻¹	0,16	0,15	1,07
MeOH; 1,0 mLmin ⁻¹	0,13	0,04	3,25
MeOH; 0,5 mLmin ⁻¹	0,03	0,01	3,00
MeOH/ H ₂ O (9:1 (v/v)); 0,5 mLmin ⁻¹	0,22	0,17	1,50

De acordo com os resultados apresentados na tabela 10, e tal como era expectável, é notório que a natureza do solvente utilizado como fase móvel bem como o fluxo que é aplicado têm uma enorme influência nos valores de IF determinados experimentalmente. De facto, quando se utilizou acetonitrilo como solvente da fase móvel, verificou-se que o valor de k_{NIP} era superior ao k_{MIP} , e conseqüentemente obtiveram-se valores de IF reduzidos ($IF < 1$). Estes resultados podem ser corroborados com os obtidos num estudo similar, realizado por Lv e seus colaboradores (Lv *et al.*, 2007), os quais obtiveram valores de IF reduzidos quando utilizaram o acetonitrilo como fase móvel. Com o intuito de retardar a eluição dos analitos alvo e, estudar de que forma este parâmetro, influencia o fator de impressão molecular, reduziu-se o fluxo para 0,5 mLmin⁻¹ e de seguida para 0,3 mLmin⁻¹, o que se traduziu num aumento dos valores de IF (0,5 e 0,8, respetivamente). Por outro lado, a aplicação da mistura de solventes CH₃CN/ H₂O (8:2 (v/v)) como fase móvel e um fluxo de 0,5 mLmin⁻¹ levou à obtenção de um valor de IF de 1,07, uma vez que a água retardou a eluição do dimetoato, permitindo obter valores de k_{MIP} superiores. Tal facto já havia sido verificado aquando da utilização da mesma mistura de solventes (CH₃CN/ H₂O (9:1 (v/v))), embora numa diferente proporção, verificando-se um aumento do valor de IF (0,9), contudo não tão acentuado, demonstrando o efeito da adição de água ao solvente

orgânico. Finalmente, a utilização de metanol aumentou significativamente os valores de IF, permitindo obter em todos os ensaios valores de k_{MIP} superiores aos de k_{NIP} , embora os valores de IF tenham sido inferiores quando se experimentou a mistura metanol água. Em suma, os valores de IF mais elevados, de 3,25 e 3,00 foram alcançados quando se utilizou o metanol como solvente da fase móvel e um fluxo de 1,0 e 0,5 mLmin⁻¹, respetivamente. No entanto, os valores de IF obtidos no presente trabalho são relativamente baixos quando comparados com alguns resultados descritos noutros estudos (Lv *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2008). Em particular, no trabalho experimental dirigido por Lv juntamente com a sua equipa de investigação (Lv *et al.*, 2007), foram testados diversos MIPs como fases estacionárias de colunas de HPLC, os quais foram sintetizados utilizando diferentes monómeros funcionais, sendo que o MBA foi aquele que apresentou resultados mais promissores, com valores de IF de 7,9. Neste estudo, os MIPs em análise foram empacotados em colunas cromatográficas de 100 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno e os valores de IF variaram na gama de 3,3 - 7,9 (Lv *et al.*, 2007). Assim, um dos fatores que também contribuiu para a obtenção de baixos valores de IF é o facto de, no âmbito do trabalho realizado nesta dissertação, se ter utilizado colunas de dimensões relativamente reduzidas (50 mm x 4,6 mm DI) para o empacotamento dos sistemas de impressão molecular (MIP/ NIP) promovendo, desta forma, uma eluição muito rápida do dimetoato e, a consequente, obtenção de valores de retenção muito próximos para o MIP e correspondente NIP.

Como ilustrado na figura 17, o perfil de eluição do dmt no sistema de impressão molecular em estudo permitiu ainda inferir o grau de retenção do analito e a especificidade da interação dmt-matriz polimérica (MIP/ NIP), tendo-se observado perfis cromatográficos diferenciados para o MIP e o NIP sendo de salientar que, no caso do MIP, foi obtido um pico cromatográfico alargado e bastante arrastado (Figura 17 - b) comparativamente com o obtido para o NIP. No entanto, este tipo de perfil cromatográfico é característico da presença de locais de ligação no MIP para o pesticida alvo. Assim, por observação da figura 17, foi possível verificar que existe uma maior capacidade de retenção para o dmt por parte do MIP, uma vez que as moléculas do pesticida são mais fortemente retidas nesta matriz polimérica o que advém do processo de impressão molecular, levando à obtenção de um fator de retenção mais elevado. Por outro lado, e tal como esperado, o NIP possui uma reduzida capacidade de

reconhecimento molecular para o dmt e, portanto, este pesticida é facilmente eluído pela fase móvel aplicada durante o ensaio de avaliação cromatográfica.

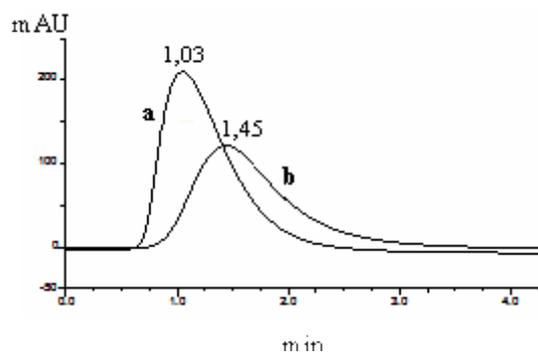


Figura 17. Perfis cromatográficos correspondentes à eluição do dimetoato na coluna cromatográfica empacotada com (a) NIP e (b) MIP. Condições cromatográficas: fase móvel – MeOH, fluxo - 1 mLmin^{-1} e deteção $\lambda = 220\text{nm}$.

Os MIPs são considerados recetores sintéticos possuindo uma intrínseca seletividade e especificidade para um dado analito alvo, a qual é conferida através do uso da tecnologia de impressão molecular. Assim, pode concluir-se com este estudo que o sistema de impressão molecular dmt-tr-MIP-1 apresenta capacidade de reconhecimento molecular para o dmt a qual se reflete, em termos moleculares, no estabelecimento de ligações de hidrogénio e de interações hidrofóbicas entre este pesticida e os locais de ligação presentes na matriz polimérica contribuindo para a retenção do pesticida em estudo.

A estratégia que contempla a utilização dos polímeros molecularmente impressos como fases estacionárias de colunas de HPLC para avaliar a sua capacidade de reconhecimento molecular tem sido aplicada com sucesso em vários trabalhos de investigação (Tamayo *et al.*, 2005; Lv *et al.*, 2007; Guzzella *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2008; Michailof *et al.*, 2008), por ser um método relativamente expedito para estudar as propriedades de ligação destes materiais poliméricos. Contudo, na literatura têm sido relatadas algumas limitação dos MIPs sintetizados pela via de polimerização *bulk*, fundamentalmente no caso particular dos sistemas de impressão não-covalentes, quando estes são usados como fases estacionárias em colunas de HPLC. Os MIPs produzidos por esta técnica de polimerização, após a síntese, necessitam de ser triturados e peneirados, originando partículas de formas irregulares, o que conseqüentemente

constitui uma desvantagem para o adequado empacotamento destes materiais poliméricos nas colunas de HPLC (Lee *et al.*, 2008). Adicionalmente, a heterogeneidade dos locais de ligação, que é característica dos sistemas de impressão não-covalente, pode refletir-se no perfil cromatográfico do composto em estudo, nomeadamente na assimetria do correspondente pico cromatográfico, bem como no seu alargamento e arrastamento (Kim e Guiochon, 2005).

5.1.1.2. Estudos de Adsorção em Solução

Atualmente, os estudos de adsorção em solução constituem um dos métodos mais vulgarmente utilizados para avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular (Pap e Horvai, 2004; Lok e Son, 2009). De forma a ultrapassar as limitações inerentes aos estudos de reconhecimento molecular referidos em 5.1.1.1. recorreu-se, neste trabalho, à utilização dos estudos de adsorção em solução com a finalidade de avaliar as propriedades de reconhecimento molecular e estudar a natureza das interações que são estabelecidas entre as moléculas de dimetoato e os locais de ligação existentes nos sistemas de impressão molecular em estudo (dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2).

Na realização deste ensaio, a escolha de um solvente adequado é preponderante para o sucesso da determinação das propriedades de reconhecimento molecular pelo que se procedeu, previamente à optimização do solvente que posteriormente seria usado nos estudos de adsorção em solução. Deste modo, avaliou-se o efeito do uso de diferentes solventes (heptano, diclorometano, acetonitrilo e metanol) na capacidade de reconhecimento molecular dos MIPs e correspondentes NIPs, mediante a determinação da quantidade de dimetoato adsorvida (Q) nos respetivos sistemas de impressão molecular. Os resultados experimentais mostraram que os valores de Q mais elevados foram obtidos com a utilização de heptano ($Q = 2,1 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-1 e $Q = 1,6 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-2) e diclorometano ($Q = 1,7 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-1 e $Q = 1,4 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-2) como solventes. Contudo, nestas condições experimentais os MIPs e os NIPs possuíam a mesma capacidade para reter as moléculas de dimetoato, devido à baixa polaridade destes solventes que promovem a formação de ligações não específicas entre o analito e a matriz polimérica. Por sua vez, com a aplicação de metanol como solvente, obtiveram-se valores de Q reduzidos ($Q = 0,8$

mgg^{-1} para o dmt-tr-MIP-1 e $Q = 0,9 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-2), o que pode ser explicado com a elevada polaridade que este solvente apresenta, enfraquecendo as interações que são estabelecidas entre o analito alvo e os grupos funcionais dos monómeros presentes na estrutura tridimensional do polímero. Finalmente, o acetonitrilo permitiu a obtenção de valores de Q relativamente elevados para os MIPs em análise ($Q = 1,5 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-1 e $Q = 1,0 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-2), eliminando eventuais interações não específicas, o que foi comprovado com os baixos valores de Q obtidos para os respetivos NIPs ($Q = 0,5 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-NIP-1 e $Q = 0,8 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-NIP-2). A realização deste ensaio preliminar, mas de extrema relevância, permitiu selecionar o acetonitrilo como o solvente mais adequado para a execução dos estudos de adsorção em solução.

Em termos gerais, é frequente descrever os diferentes mecanismos de adsorção e retenção do analito alvo mediante a análise das isotérmicas de ligação estabelecidas para cada sistema de impressão molecular (MIP/ NIP), as quais são elaboradas com os dados experimentais obtidos através dos estudos de adsorção em solução. Concretamente, uma isotérmica de adsorção é uma representação gráfica que relaciona a quantidade de analito que se encontra adsorvido pelo polímero (após se estabelecer o equilíbrio em solução) e a sua concentração inicial, para um determinado intervalo de concentrações, o qual deve ser estabelecido de modo a atingir-se um perfil de saturação. Por sua vez, as propriedades de ligação destes sistemas de impressão molecular podem ser calculadas através do ajuste de cada isotérmica obtida experimentalmente, usando modelos matemáticos específicos (García-Calzón e Díaz-García, 2007).

Experimentalmente, os estudos de adsorção em solução consistiram em adicionar alíquotas de soluções contendo concentrações crescentes de dimetoato ($3 - 200 \text{ mgL}^{-1}$) em acetonitrilo a diferentes séries de frascos de vidro contendo 20 mg de cada MIP- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e respetivos NIPs. Após atingir-se o equilíbrio em solução, foi determinada a concentração de dimetoato livre (não retido) existente em cada solução, mediante a análise por HPLC-DAD de alíquotas da solução sobrenadante e, de seguida foi calculada a quantidade de dimetoato que se encontrava adsorvida nos respetivos sistemas de impressão molecular (ver secção 4.3.1. ii – Estudos de Adsorção em Solução).

As isotérmicas de adsorção experimentais para os sistemas de impressão molecular em estudo- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e os respetivos NIPs encontram-se representadas na figura 18 e, traduzem a quantidade de dimetoato adsorvido em cada sistema de impressão molecular MIP/ NIP em função da concentração inicial (C_i) de dimetoato que é adicionada a cada solução.

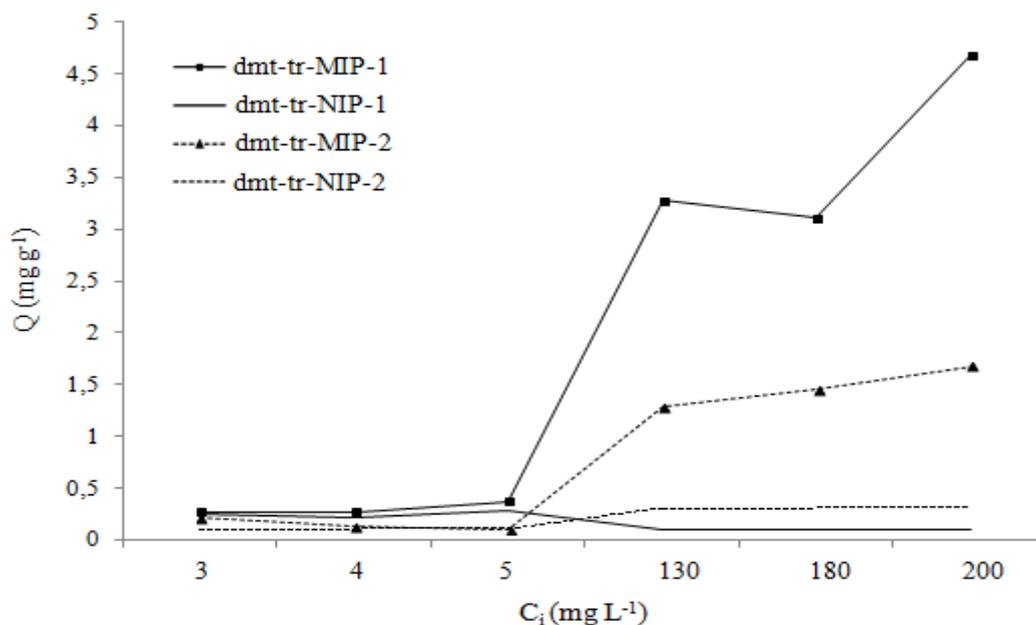


Figura 18. Isotérmicas de adsorção determinadas experimentalmente referentes aos MIPs- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e correspondentes NIPs. Os ensaios foram realizados em duplicado e o valor apresentado corresponde à média das determinações ($n = 2$).

Por observação da figura 18, constata-se que, para ambos os MIPs, a quantidade de dmt adsorvida aumentou com o incremento da concentração inicial de dmt. O aumento progressivo da concentração de dmt em solução levou à ocupação gradual de um maior número de locais de ligação nas matrizes poliméricas, o que se traduziu no aumento da capacidade de reconhecimento molecular destes materiais poliméricos. Porém, a partir da concentração de 130 mg L^{-1} , a quantidade de dmt ligado permaneceu constante com o incremento da concentração do pesticida, o que releva que a esta concentração os locais de ligação se encontram completamente preenchidos, daí que vulgarmente se refere que se atingiu a saturação dos locais de ligação do material polimérico. Em particular, para o sistema de impressão molecular dmt-tr-MIP-1, a observação da representação gráfica obtida parece indicar que não se atingiu a saturação

dos locais de ligação, o que provavelmente é devido à presença de ligações não específicas entre o analito e o adsorvente. Resultados similares foram também evidenciados por outros grupos de investigação, que utilizaram os estudos de adsorção em solução para estudar a capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular sintetizados pela polimerização via *bulk*, os quais referem que o facto de não se obter um perfil de saturação se deve à heterogeneidade dos locais de ligação existentes na matriz polimérica (Xu e Chen, 2011; Shi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

As isotérmicas de adsorção, representadas esquematicamente na figura 18, permitiram ainda comparar o sucesso da etapa de síntese de cada MIP bem como a influência do uso de diferentes agentes de ligação cruzada, com base na capacidade de reconhecimento molecular. Assim, o sistema de impressão molecular dmt-tr-MIP-1, o qual foi sintetizado usando o EGDMA como agente de ligação cruzada, apresentou uma maior capacidade de reconhecimento molecular para o dmt ($Q_{\max} = 4,5 \text{ mgg}^{-1}$) comparativamente ao dmt-tr-MIP-2, cujo agente de ligação cruzada é o TEGDMA ($Q_{\max} = 1,6 \text{ mgg}^{-1}$). Estes valores são consistentes com os resultados obtidos noutros trabalhos de investigação, nos quais o EGDMA tem sido aplicado com sucesso na síntese de diferentes polímeros molecularmente impressos seletivos para o reconhecimento molecular de dimetoato (Lv *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2008; Bakas *et al.*, 2013).

A comparação das isotérmicas de ligação dos MIPs com as dos respetivos NIPs (Figura 18), permite inferir que os polímeros não molecularmente impressos possuem uma reduzida capacidade de reconhecimento molecular para o dmt ($Q < 0,4 \text{ mgg}^{-1}$). Esta evidência deve-se ao facto de, durante a etapa de impressão molecular, não terem sido impressos nos NIPs locais de ligação específicos para o analito alvo, visto que a polimerização é realizada na ausência das moléculas molde. Consequentemente, as eventuais interações que são estabelecidas entre o analito alvo e os monómeros funcionais que se encontram dispersos na matriz polimérica são de natureza não específica.

Os resultados obtidos neste estudo podem ainda ser correlacionados com a estrutura morfológica de cada MIP, a qual foi obtida através da sua caracterização por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). A imagem de SEM referente ao dmt-tr-

MIP-1 (Figura 19 - a) mostra a presença de uma estrutura microporosa, permitindo uma maior facilidade de acesso das moléculas de dimetoato relativamente aos respetivos locais de ligação existentes na matriz polimérica do MIP, o que pode justificar os elevados valores de Q obtidos. No caso do sistema de impressão molecular dmt-tr-MIP-2, as imagens obtidas por SEM (Figura 19 - b) demonstram que as partículas constituintes do polímero encontram-se agregadas, originando estruturas irregulares de grandes dimensões. Por outro lado, a maioria dos locais de ligação encontram-se localizados no interior da matriz polimérica, dificultando a acessibilidade dos analitos alvo aos locais de ligação, o que poderá explicar a reduzida capacidade de reconhecimento molecular obtida experimentalmente para este material polimérico.

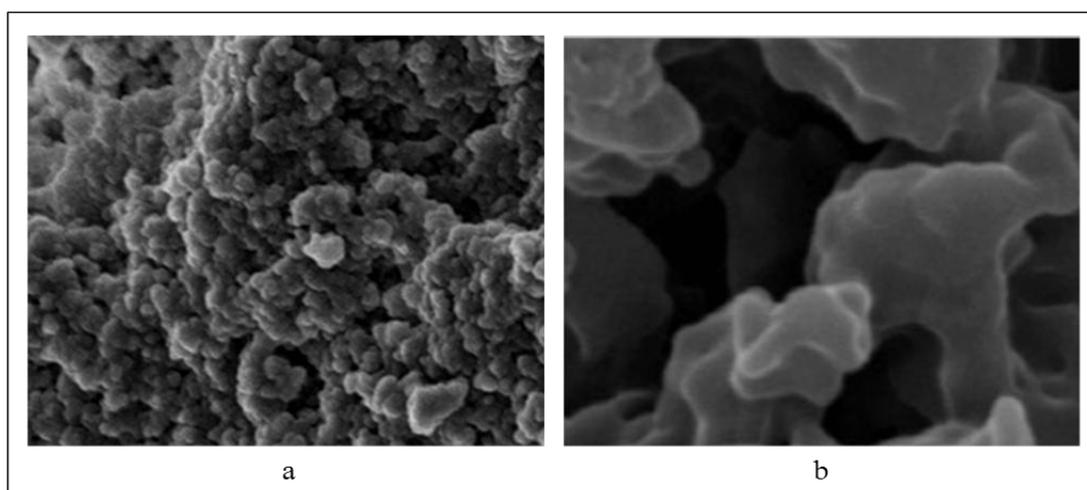


Figura 19. Imagens obtidas por SEM referentes aos sistemas de impressão molecular (a) dmt-tr-MIP-1 e (b) dmt-tr-MIP-2 (voltagem 15 kV, resolução de 30000 x).

Adicionalmente, para avaliar a aplicabilidade destes materiais poliméricos como adsorventes seletivos é crucial obter uma informação mais aprofundada acerca das propriedades dos locais de ligação existentes na sua matriz polimérica. Em concreto, a determinação dos parâmetros de ligação a partir de uma isotérmica requer a aplicação de um modelo matemático específico, o qual deve ser selecionado de acordo com as características do sistema de impressão molecular em análise. Assim, atendendo ao facto de que os MIPs avaliados neste estudo foram produzidos através de sistemas de impressão não-covalentes, o que teoricamente origina uma elevada heterogeneidade dos locais de ligação, devido aos seus diferentes graus de afinidade e seletividade, a avaliação da natureza dos locais de ligação presentes nos MIPs- dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-

MIP-2 e respectivos NIPs foi realizada mediante a aplicação do modelo de Freundlich (MF).

A isotérmica de Freundlich é determinada pela aplicação da equação $B = a C^m$ e consiste numa distribuição contínua, representada pela razão entre a concentração de dimetoato ligado no polímero (B) e a concentração de dmt livre em solução (C) após se estabelecer o equilíbrio. De acordo com o MF existem dois parâmetros de ajuste, o fator a que corresponde ao coeficiente de adsorção de Freundlich e é uma medida da capacidade (NT) e da afinidade média (K_0) dos locais de ligação e, o parâmetro m que representa a constante de Freundlich e traduz o índice de heterogeneidade de cada sistema de impressão molecular, o qual pode assumir valores entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 for o seu valor mais homogêneo será o polímero em estudo. No caso particular do coeficiente de adsorção de Freundlich, o contributo individual de NT e K_0 para o fator a não pode ser diretamente determinado sem a aplicação de modelos adicionais ou suposições, pelo que geralmente é pouco informativo (Umpleby II *et al.*, 2004).

Neste caso, as isotérmicas de ligação obtidas experimentalmente para cada MIP/NIP em estudo foram modeladas mediante a aplicação do modelo de Freundlich através da representação gráfica da isotérmica de ligação na forma logarítmica: $\log B$ vs $\log C$. Deste modo, os dados experimentais que foram ajustados a este modelo apresentam-se linearizados, possuindo um declive com o valor de m e a ordenada na origem com o valor de $\log a$. Por sua vez, o número aparente de locais de ligação foi determinado através da aplicação da seguinte equação $N_{k_{\min}-k_{\max}} = a (1 - m^2) (k_{\min}^{-m} - k_{\max}^{-m})$, sendo que os valores de k_{\min} e k_{\max} foram obtidos com base nas seguintes fórmulas $k_{\min} = 1/C_{\max}$ e $k_{\max} = 1/C_{\min}$, respetivamente, onde C_{\max} corresponde à concentração máxima de dmt livre em solução e C_{\min} à concentração mínima de dmt livre em solução (Rampey *et al.*, 2004; Spivak, 2005; Corton *et al.*, 2007).

Na tabela 11 encontram-se representados os valores referentes aos coeficientes de determinação, aos coeficientes de ajuste para as isotérmicas de ligação de Freundlich e ao número aparente de locais de ligação obtidos para os sistemas de impressão molecular em estudo.

Os coeficientes de determinação (R^2) indicados na tabela 11 permitem avaliar o ajuste dos dados experimentais obtidos ao MF. Assim, por análise dos valores de R^2 calculados para os MIPs, os quais se situam numa gama 0,98 - 0,99, é possível afirmar que o comportamento de reconhecimento molecular destes sistemas poliméricos obedece aos pressupostos do modelo matemático em estudo. Os valores de R^2 obtidos neste trabalho encontram-se de acordo com os resultados obtidos noutros trabalhos de investigação similares (Umpleby II *et al.*, 2001a; Umpleby II *et al.*, 2001b; Rampey *et al.*, 2004; Corton *et al.*, 2007; Valvero-Navarro *et al.*, 2011). Mais precisamente, Rampey e seus colaboradores referem ainda que a isotérmica de Freundlich é uma fórmula empírica que considera que a matriz polimérica apresenta uma superfície heterogénea, com diferentes tipos de interações e, tem sido geralmente aplicada com sucesso aos polímeros molecularmente impressos obtidos por sistemas de impressão não-covalentes (Rampey *et al.*, 2004).

Tabela 11. Coeficientes de determinação (R^2), parâmetros de ligação (m e a) e número aparente de locais de ligação ($N_{k_{\min}-k_{\max}}$) referentes às isotérmicas de Freundlich dos sistemas de impressão molecular dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2 e correspondentes NIPs.

Sistemas de Impressão Molecular	R^2	m	a [$\text{mgg}^{-1}(\text{mLmg}^{-1})^m$]	$N_{k_{\min}-k_{\max}}^*$ (mgg^{-1})
dmt-tr-MIP-1	0,9914	0,53	9,90	3,30
dmt-tr-MIP-2	0,9809	0,65	4,80	1,40
dmt-tr-NIP-1	0,9250	0,21	0,10	0,04
dmt-tr-NIP-2	0,9844	0,28	0,50	0,20

* $N_{k_{\min}-k_{\max}} = a(1 - m^2)(k_{\min}^{-m} - k_{\max}^{-m})$; $k_{\max} = 1/C_{\min}$; $k_{\min} = 1/C_{\max}$.

A análise dos valores de m (Tabela 11), os quais traduzem o índice de heterogeneidade de acordo com o MF, indica que o dmt-tr-MIP-1 ($m = 0,53$) é mais heterogéneo, em termos de locais de ligação, do que o dmt-tr-MIP-2 ($m = 0,65$). Por observação da tabela 11 é ainda possível concluir, atendendo ao valor de m , que os NIPs revelaram ser mais heterogéneos que os respetivos MIPs, apresentando valores de m mais próximos de 0. Os índices de heterogeneidade determinados neste trabalho para os

MIPs podem ser correlacionados com os resultados obtidos noutros estudos de investigação (Rampey *et al.*, 2004; Corton *et al.*, 2007), contudo não é possível estabelecer uma relação direta, uma vez que os sistemas de impressão molecular não são sintetizados nas mesmas condições. Contudo, tendo em conta que estes materiais foram sintetizados pela técnica de polimerização via *bulk*, utilizando um sistema de impressão não-covalente, era expectável que os locais de ligações existentes nos sistemas de impressão molecular em estudo apresentassem uma elevada heterogeneidade.

Relativamente aos valores de a e $N_{k_{\min-k_{\max}}}$, como seria esperado, os MIPs continham um maior número de locais de ligação do que os correspondentes NIPs. Por sua vez, o dmt-tr-MIP-1 possuía um número aparente de locais de ligação superior ($N_{k_{\min-k_{\max}}} = 3,30 \text{ mgg}^{-1}$), quando comparado com o dmt-tr-MIP-2 ($N_{k_{\min-k_{\max}}} = 1,40 \text{ mgg}^{-1}$). Estes valores corroboram os resultados referentes às isotérmicas de ligação obtidas experimentalmente neste trabalho (Figura 18) e podem ainda ser correlacionados com a respetiva estrutura morfológica de cada MIP, como discutido anteriormente. Assim, pode concluir-se que, o dmt-tr-MIP-1 que contém o EGDMA como agente de ligação cruzada apresentou uma capacidade de reconhecimento molecular superior ao dmt-tr-MIP-2 sintetizado com TEGDMA.

Em suma, os resultados obtidos nos estudos de adsorção em solução são indicativos da existência de locais de ligação de natureza heterogénea nos sistemas de impressão molecular em estudo (dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2) o que é característico dos sistemas de impressão não-covalentes, resultante da instabilidade dos complexos molécula molde-monómero funcional formados durante a etapa de pré-polimerização.

5.I.1.3. Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE

Os polímeros molecularmente impressos produzidos pela técnica de polimerização via *bulk*, tal como foi comprovado anteriormente, originam matrizes poliméricas que apresentam uma elevada heterogeneidade para além de um difícil acesso dos analitos alvo aos respetivos locais de ligação. Por outro lado, o facto destes materiais poliméricos necessitarem de serem triturados após a etapa de síntese, a fim de se obterem partículas de tamanhos adequados, pode eventualmente destruir os locais de ligação e, automaticamente reduzir a sua capacidade de reconhecimento molecular (Chen *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2011). Deste modo, na tentativa de obter polímeros

molecularmente impressos com elevada capacidade de reconhecimento molecular e com uma distribuição homogénea dos locais de ligação existentes na sua matriz polimérica, os membros da equipa do projeto de investigação que integram a tarefa de produção dos MIPs, sintetizaram novos materiais poliméricos mediante a aplicação da técnica de polimerização via *iniferter*, tendo sido obtido um novo sistema de impressão molecular, designado por dmt-inif-MIP. A avaliação da sua capacidade de reconhecimento molecular foi efetuada com base em estudos de SPE, em que o material adsorvente utilizado foi o dmt-inif-MIP, de acordo com o procedimento experimental detalhado na secção 4.3.1. (iii – Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE). O facto de a capacidade de reconhecimento molecular deste novo MIP ter sido avaliada com recurso ao SPE em vez do cálculo dos fatores de impressão e dos estudos de adsorção em solução que foram utilizados no caso dos MIP sintetizados pela via *bulk*, prende-se com o facto de esta técnica ser menos morosa e por outro lado permitir testar em simultâneo a viabilidade dos MIPs enquanto materiais adsorventes para serem posteriormente utilizados em extração de fase sólida no desenvolvimento das metodologias MISPE.

Na figura 20 encontram-se sumarizados os resultados obtidos neste estudo na forma de isotérmicas de adsorção, as quais representam a quantidade de dimetoato adsorvido (Q) no dmt-inif-MIP e dmt-inif-NIP em função da concentração inicial (C_i) de dimetoato que é adicionada na etapa de aplicação da amostra, durante o procedimento de extração SPE.

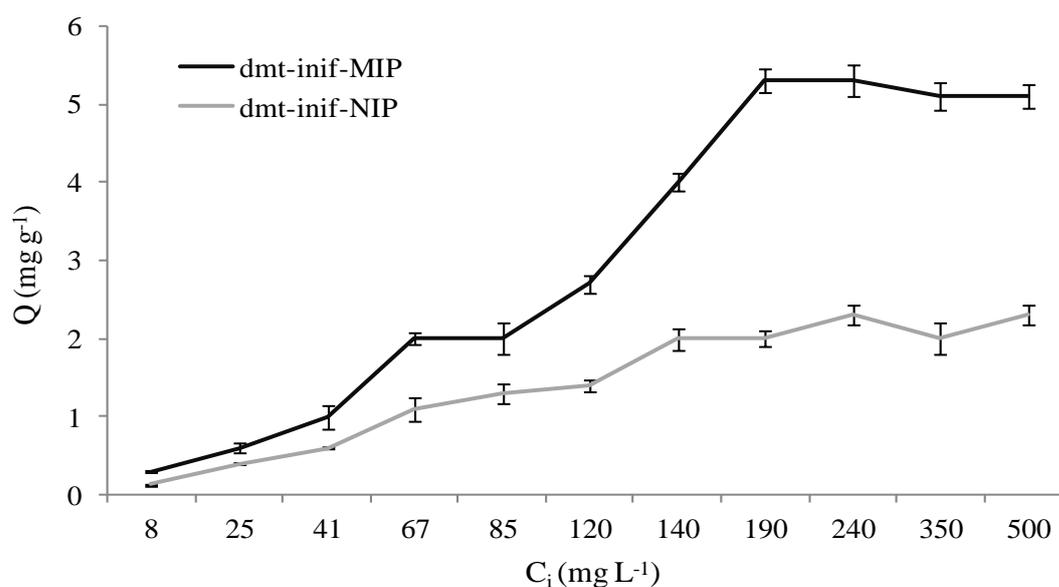


Figura 20. Capacidade de adsorção do dmt-inif-MIP e correspondente NIP.

Em termos gerais, por observação da figura 20 foi possível verificar que a quantidade de dimetoato retido na matriz polimérica, dos sistemas de impressão molecular em estudo, aumentou com o incremento da concentração de dmt aplicada às colunas MISPE/ NISPE durante a etapa de aplicação da amostra. Numa fase inicial, o aumento progressivo da concentração de dimetoato aplicado às colunas MISPE/ NISPE levou à ocupação gradual de um maior número de locais de ligação, traduzindo-se no aumento da capacidade de adsorção dos respetivos sistemas de impressão molecular. Contudo, o contínuo incremento da concentração de dmt fez com que os locais de ligação ficassem completamente preenchidos, assim, dado que os polímeros não possuíam capacidade para acomodar mais moléculas de dmt na sua matriz polimérica, a quantidade de pesticida retida no MIP e no correspondente NIP permaneceu constante, verificando-se um perfil de saturação. No caso particular do dmt-inif-MIP os valores de Q aumentaram significativamente com o incremento da C_i de dmt, sendo que o perfil de saturação foi obtido a partir da concentração de 190 mgL^{-1} . Em contrapartida, no caso do dmt-inif-NIP, a capacidade de adsorção aumentou lentamente em função da C_i e, a saturação foi alcançada mais precocemente, com concentrações superiores a 140 mgL^{-1} . Deste modo, atendendo ao perfil das isotérmicas de adsorção destes materiais poliméricos é possível afirmar que o MIP possui uma elevada capacidade de reconhecimento molecular para o dimetoato quando comparado com o respetivo NIP, o que advém da existência de locais de ligação específicos para o analito alvo, os quais são produzidos durante a tecnologia de impressão molecular.

A realização dos estudos de reconhecimento molecular permitiu ainda concluir que o sistema de impressão molecular dmt-inif-MIP apresentava uma capacidade máxima de retenção (Q_{\max}) na ordem dos $5,3 \text{ mgg}^{-1}$. Por comparação dos valores de Q_{\max} obtidos para os MIPs sintetizados pela técnica de polimerização via *bulk* ($Q_{\max} = 4,5 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-1 e $Q_{\max} = 1,6 \text{ mgg}^{-1}$ para o dmt-tr-MIP-2) com os determinados para o MIP sintetizado pela via *iniferter* (dmt-inif-MIP) foi possível verificar que o dmt-inif-MIP possuía uma capacidade de reconhecimento molecular superior relativamente às moléculas de dimetoato.

A tentativa de correlacionar os resultados obtidos nos ensaios de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular sintetizados pelo método *iniferter* com a sua estrutura morfológica (Figura 21) evidenciou que a estrutura tridimensional do MIP

sintetizado mediante esta técnica de polimerização era composta por microesferas de reduzidas dimensões e formas regulares. De acordo com a imagem SEM apresentada na figura 21 (a) é visível que o dmt-inif-MIP apresenta uma estrutura bastante porosa, o que evidencia a existência de um elevado número de cavidades, promovendo uma melhor acessibilidade do pesticida aos respetivos locais de ligação existentes na matriz polimérica e conseqüentemente uma maior capacidade de reconhecimento molecular. No caso do NIP, a imagem SEM ilustrada na figura 21 (b) mostra que as partículas que constituem a estrutura tridimensional do dmt-inif-NIP formam agregados de grandes dimensões, com formas irregulares e, como seria esperado é notório um reduzido número de cavidades, o que comprova os baixos valores de Q obtidos neste estudo.

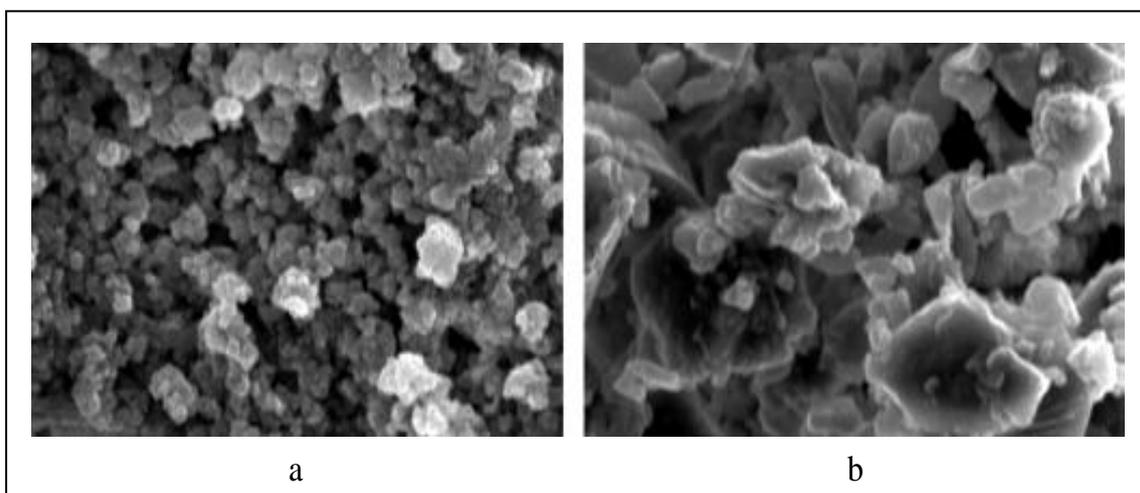


Figura 21. Imagens obtidas por SEM correspondentes aos sistemas de impressão moleculares a) dmt-inif-MIP e b) dmt-inif-NIP, com uma voltagem de aceleração de 10 kV e ampliação de 11,0 mm x 5,00 k SE.

Quando comparada a estrutura morfológica do MIP obtido pela síntese via *iniferter* (Figura 21 - a) com a dos MIPs produzidos pela via *bulk* (Figura 19 - a e b), é evidente que o primeiro possui uma maior homogeneidade e uma estrutura muito mais porosa, o que se traduz num elevado número de cavidades ao longo da matriz polimérica e uma maior facilidade de acesso das moléculas de dimetoato aos respetivos locais de ligação. Em contrapartida, os MIPs sintetizados mediante a técnica de polimerização via *bulk* possuem uma estrutura tridimensional desorganizada e heterogénea, pelo que o acesso do dmt aos locais de ligação encontra-se mais dificultado.

Face ao exposto anteriormente, a análise detalhada da capacidade de reconhecimento molecular dos diversos sistemas de impressão molecular em estudo neste trabalho- dmt-tr-MIP-1, dmt-tr-MIP-2 e dmt-inif-MIP permitiram selecionar o dmt-inif-MIP como adsorvente seletivo de extração em fase sólida para a posterior implementação da metodologia MISPE com vista à deteção e quantificação de dmt em amostras de azeite.

5.1.2. Estudos de Seletividade do dmt-inif-MIP

Os polímeros molecularmente impressos são materiais que devem apresentar uma intrínseca capacidade para reconhecerem de forma seletiva e específica o pesticida alvo, permitindo o seu isolamento e pré-concentração a partir da matriz azeite. Mais precisamente, o sucesso dos MIPs quando aplicados como materiais adsorventes na extração em fase sólida depende essencialmente da sua especificidade para o analito de interesse, pelo que o MIP deve de ser capaz de reter seletivamente apenas as moléculas de dmt, permitindo a posterior remoção das ligações não-específicas que se estabelecem entre os compostos interferentes, provenientes das amostras em análise, e a matriz polimérica destes materiais adsorventes. Dado que a seletividade destes materiais poliméricos é uma característica crucial para a implementação da metodologia MISPE, procedeu-se à realização de estudos de reconhecimento molecular por SPE utilizando compostos análogos do dimetoato, nomeadamente o ometoato, o malatião, o metidatião e o fentião com a finalidade de avaliar a seletividade do dmt-inif-MIP (utilizado como adsorvente seletivo na metodologia MISPE). Na tabela 12 encontram-se resumidos os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 12. Taxas de recuperação, capacidade de adsorção e fator de seletividade referente a cada análogo estrutural do dimetoato, para os sistemas de impressão molecular dmt-inif-MIP e correspondente NIP.

Pesticidas	Taxas de Recuperação \pm SD ^a (%)		Q (mgg ⁻¹)		α^b
	MIP	NIP	MIP	NIP	
Dimetoato	70,0 \pm 1,3	21,7 \pm 0,9	1,10 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	3,6 \pm 0,1
Ometoato	28,7 \pm 0,8	20,0 \pm 0,7	0,50 \pm 0,03	0,30 \pm 0,04	1,7 \pm 0,2
Malatião	9,6 \pm 0,5	n.d.	0,20 \pm 0,01	-	-
Metidatião	6,3 \pm 0,3	4,3 \pm 0,5	0,10 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	1,4 \pm 0,4
Fentião	n.d.	n.d.	-	-	-

n.d.- não detetado; (-) não quantificado; ^amédia \pm desvio padrão (SD); ^bfator de seletividade; $\alpha = Q_{MIP} / Q_{NIP}$, Q_{MIP} e Q_{NIP} correspondem à capacidade de ligação do dmt e dos respetivos análogos para o dmt-inif-MIP e correspondente NIP.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 12 foi possível verificar que o dmt-inif-MIP possui uma reduzida capacidade para reter os diferentes compostos análogos do dmt em análise, sendo que as taxas de recuperação para o ometoato, malatião e metidatião variaram entre 28,7 e 6,3 %, por sua vez o fentião não era retido na matriz polimérica dos sistemas de impressão molecular. De entre os vários compostos análogos, o ometoato foi aquele que apresentou uma maior taxa de recuperação (28,7 %), este facto foi justificado com a semelhança entre a estrutura química deste pesticida e a do dimetoato (Figura 22). Por outro lado, no caso do fentião, a incapacidade do MIP para reter este composto foi atribuída à forma e ao tamanho das suas moléculas e provavelmente ao impedimento estereoquímico do anel de benzeno que se encontrava presente na estrutura química deste pesticida. Em suma, foi possível verificar que a estrutura química dos compostos, fundamentalmente o seu tamanho e forma, tinham um efeito direto na capacidade de retenção do dmt-inif-MIP, pois quanto maior fosse a molécula mais difícil se tornava o seu acesso aos locais de ligação existentes na matriz polimérica do MIP em estudo.

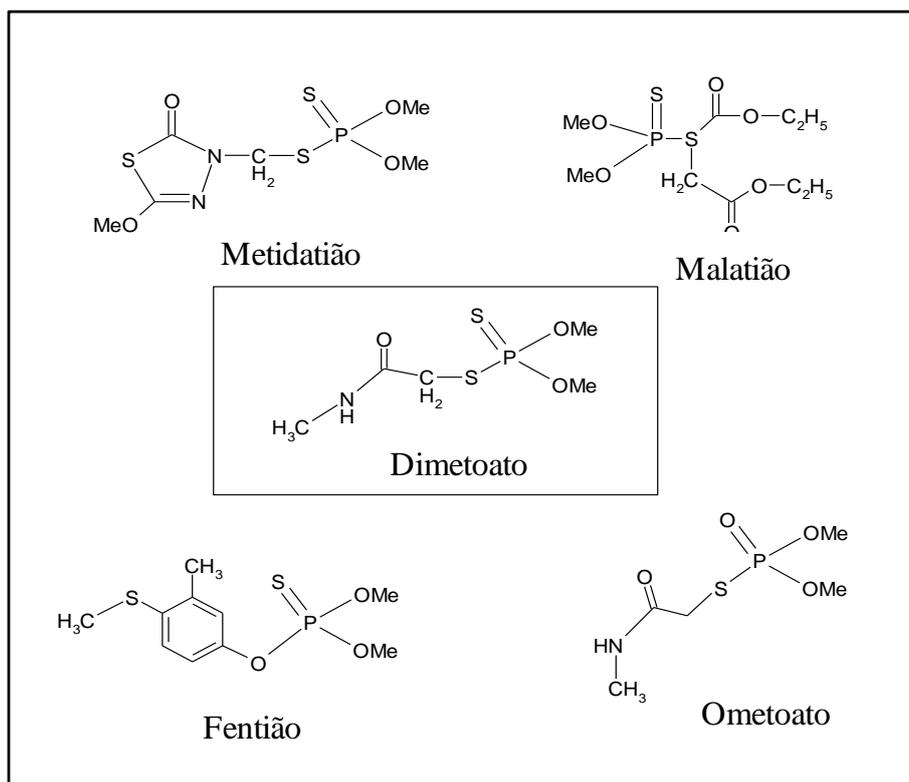


Figura 22. Representação geral das estruturas químicas do dimetoato e dos diferentes compostos análogos pertencentes à classe dos organofosforados.

Noutros trabalhos de investigação existentes na literatura, que avaliam a seletividade dos MIPs, também tem sido demonstrado que os locais de ligação que são formados durante o mecanismo de impressão, possuem uma complementaridade em forma e tamanho para o analito alvo, o que contribui para a capacidade de reconhecimento molecular destes materiais poliméricos (Lv *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2008; Bektaşoğlu *et al.*, 2013). Por outro lado, as interações que são estabelecidas entre o analito alvo e os monómeros funcionais têm uma enorme influência na elevada capacidade dos MIPs para reter seletivamente as moléculas do pesticida alvo (Xu e Chen, 2011), o que pode justificar as reduzidas taxas de recuperação para o ometoato, pois apesar da provável facilidade de acesso aos locais de ligação existentes no MIP, devido à semelhança da sua estrutura química com a do dmt, não se estabelecem interações específicas, suficientemente fortes, entre as moléculas de ometoato e os monómeros funcionais, pelo que na etapa de lavagem este análogo é praticamente todo eluído (70 %).

Em suma, atendendo aos fatores de seletividade determinados para cada análogo estrutural do dmt (Tabela 12), foi possível concluir que o dmt-inif-MIP possuía uma elevada especificidade e seletividade para o pesticida alvo ($\alpha = 3,6$), pois durante a etapa de síntese dos polímeros molecularmente impressos é induzido o efeito de memória para o analito alvo, permitindo assim o reconhecimento seletivo das moléculas de dmt, mesmo em presença de alguns compostos que apresentam uma estrutura química muito idêntica à do analito alvo. Apesar do ometoato apresentar uma estrutura química muito semelhante à do dmt, o valor referente ao fator de seletividade determinado neste ensaio foi reduzido ($\alpha = 1,7$).

5.1.3. Implementação da Metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia de preparação de amostra baseada no uso de sistemas de impressão molecular como adsorventes seletivos para extração em fase sólida (MISPE) com capacidade para o reconhecimento seletivo do dimetoato em amostras de azeite, foi necessário realizar uma prévia otimização das diferentes etapas que se encontram subjacentes à metodologia de preparação de amostra. Assim foi dada particular ênfase, nesta fase de otimização, às etapas de aplicação da amostra e lavagem dos compostos interferentes uma vez que se estes passos não forem adequadamente implementados poderão comprometer a eficiência de extração e a posterior quantificação do composto em análise.

O estudo de otimização da metodologia MISPE iniciou-se com a seleção do solvente mais apropriado para aplicar no passo de carregamento da amostra. Com esse objetivo, foi testada a eficiência de vários solventes de diferentes polaridades na retenção do dimetoato pela coluna MISPE contendo o dmt-inif-MISPE como adsorvente.

Na figura 23 encontram-se sumarizados os resultados obtidos, os quais foram expressos na forma de taxas de recuperação do dmt em função da polaridade dos solventes utilizados na etapa da aplicação da amostra (heptano, diclorometano, acetonitrilo e metanol), de modo a permitir uma comparação direta entre os dados experimentais.

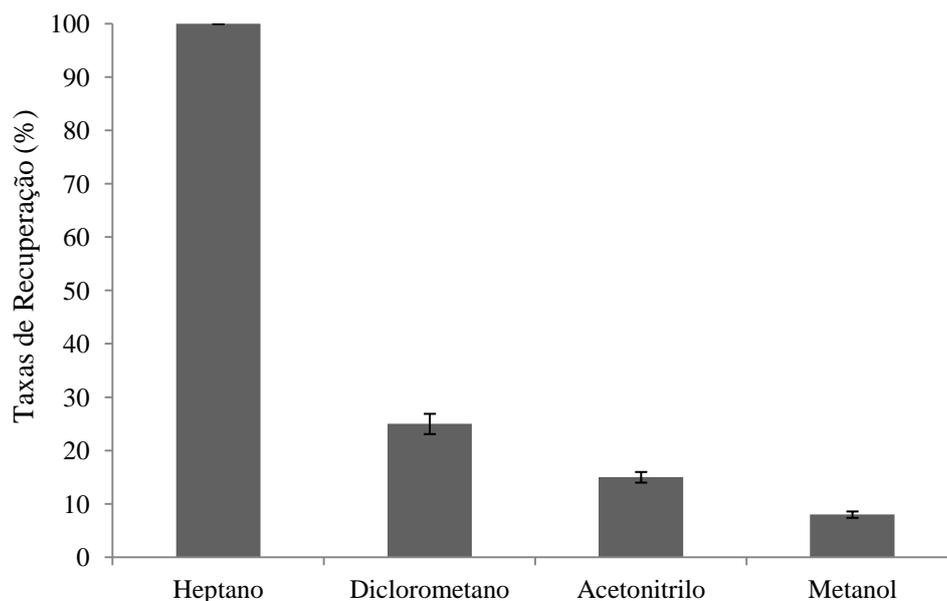


Figura 23. Efeito do uso de diferentes solventes (utilizados na etapa de aplicação da amostra) na taxa de recuperação do dmt.

De um modo geral, a análise dos resultados apresentados na figura 23 mostra que a natureza dos solventes utilizados durante a aplicação da amostra tem uma grande influência na capacidade de retenção do dmt-inif-MIP. Constatou-se experimentalmente, que à medida que a polaridade dos solventes aumentou, a capacidade de retenção do MIP para o dmt diminuiu drasticamente. Mais precisamente, este ensaio revelou que o uso de solventes de natureza polar (acetonitrilo e metanol) na etapa de aplicação da amostra originava taxas de recuperação reduzidas (< 20 %), devido à elevada solubilidade do dmt nestes solventes. Por sua vez, no caso do diclorometano, também se obtiveram taxas de recuperação relativamente baixas ($25 \pm 1,9$ %), uma vez que 75 % da concentração do pesticida era imediatamente eluída durante a etapa de aplicação da amostra. Finalmente, a utilização de um solvente de natureza apolar (heptano) aumentou a capacidade de reconhecimento molecular do dmt-inif-MIP, permitindo que toda a quantidade de dmt aplicada na coluna ficasse totalmente retida na sua matriz polimérica. As elevadas taxas de recuperação obtidas para o heptano (100 %) foram justificadas pelo facto deste solvente promover a formação de ligações por pontes de hidrogénio entre as moléculas de dimetoato e os grupos $-\text{COOH}$ constituintes dos monómeros funcionais (MAA) presentes nas cavidades do MIP. Assim, atendendo aos resultados obtidos neste ensaio, selecionou-se

o heptano como o solvente que seria utilizado na etapa de aplicação da amostra na metodologia dmt-inif-MISPE.

Neste estudo, procedeu-se ainda à otimização do volume de heptano (1, 3, 5 e 10 mL) a utilizar no passo de aplicação da amostra. Os resultados alcançados permitiram verificar que o desempenho da coluna MISPE, não era influenciado pelo volume deste solvente, visto que para todos os extratos analisados o valor obtido para a taxa de recuperação foi de 100 %.

Idealmente, o uso da tecnologia de impressão molecular permite o “design” de polímeros molecularmente impressos que possuem uma seletividade pré-definida para o analito alvo. Contudo, devido à elevada complexidade da matriz azeite, é plausível que alguns compostos interferentes presentes nesta matriz possam sofrer processos de adsorção, através do estabelecimento de interações não específicas, no adsorvente dmt-inif-MIP, aquando da aplicação da amostra. Deste modo, torna-se crucial a otimização da etapa de lavagem, a qual envolveu a escolha criteriosa de um solvente que possua a capacidade para remover os compostos interferentes sem que ocorra a eluição do pesticida em análise. Adicionalmente, este solvente deverá ainda minimizar o estabelecimento de interações não específicas, que eventualmente se podem estabelecer entre o dmt e o MIP.

Face à importância que o passo de lavagem representava para a eficiência do procedimento de extração, procedeu-se à seleção do solvente mais adequado para utilização nesta etapa. Consequentemente, foi avaliado o efeito de diferentes solventes-heptano, diclorometano (CH_2Cl_2) e as misturas destes solventes na eluição do dmt. De modo a concretizar este objetivo realizou-se o procedimento experimental descrito na secção 4.3.3., tendo-se analisado, neste ensaio, as frações eluídas durante os passos de lavagem e eluição para que se consiga ter uma perceção mais concreta da globalidade do processo extrativo. Os resultados obtidos neste estudo foram expressos na forma de taxas de recuperação e encontram-se resumidamente indicados na figura 24.

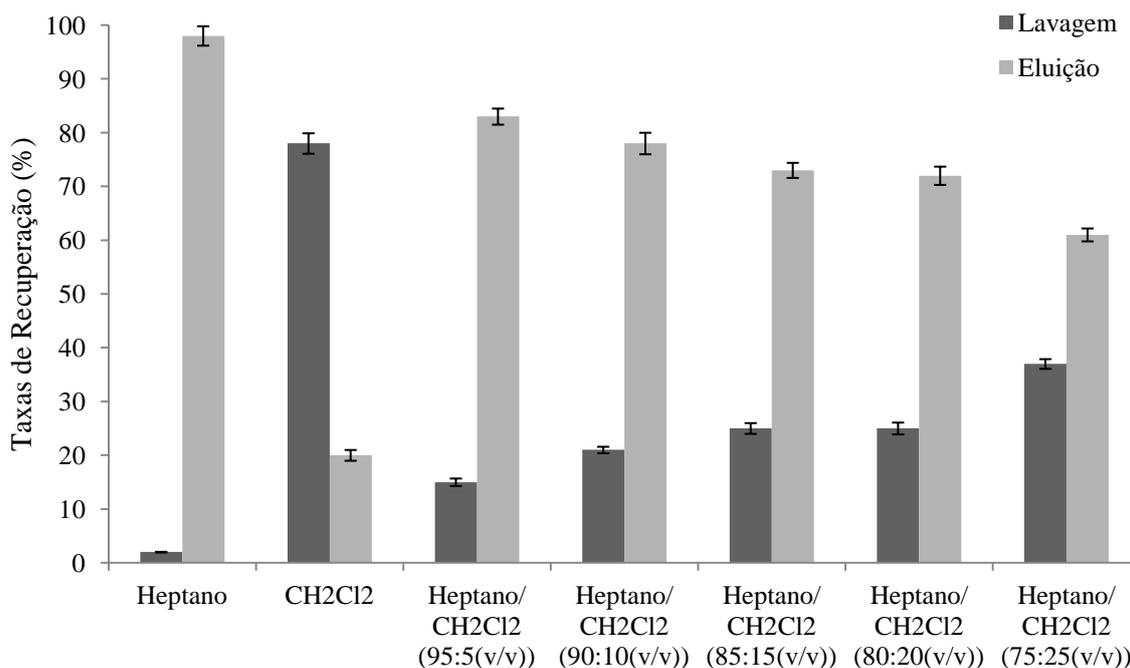


Figura 24. Efeito do uso de diferentes solventes utilizados durante a etapa de lavagem da metodologia dmt-inif-MISPE, a eluição foi efetuada utilizando 2 mL de metanol.

Através da análise da figura anterior constata-se que a utilização de heptano durante a etapa de lavagem não apresenta capacidade para quebrar as interações estabelecidas entre o dmt e o MIP, dado que a totalidade deste pesticida foi praticamente recuperada no passo de eluição ($98 \pm 1,8 \%$). Contudo, atendendo à sua baixa polaridade já era de antever que a utilização deste solvente não fosse suficientemente eficaz para a remoção da maioria dos compostos interferentes provenientes da matriz azeite. Em contrapartida, a aplicação de diclorometano (CH_2Cl_2), durante a etapa da lavagem, promoveu a remoção de $78 \pm 2,0 \%$ do dmt que se encontrava adsorvido na matriz polimérica. Na tentativa de otimização da etapa de lavagem foi ainda testado o efeito do uso de misturas destes dois solventes, com percentagens de diclorometano a variarem na gama 5-25 %. Os resultados mostram que o incremento de diclorometano originou um aumento progressivo da remoção de dmt durante o passo de lavagem e, conseqüentemente, uma redução das taxas de recuperação obtidas na posterior eluição do analito alvo. Atendendo aos resultados expostos anteriormente, a seleção do solvente utilizado no passo de lavagem foi efetuado com base numa situação de compromisso, isto é, optou-se por uma mistura de solventes que permita a maior remoção possível dos compostos interferentes sem, contudo, eluir o dmt que se encontrava seletivamente retido no MIP. Assim, para o passo de lavagem da

metodologia dmt-inif-MIP foi selecionado como solvente uma solução de 2 mL de heptano/ diclorometano (80:20 (v/v)), pois permitiu uma eficiente remoção dos compostos interferentes, mantendo taxas de recuperação aceitáveis durante a eluição do dmt ($72 \pm 1,4 \%$).

Por último, tomando em consideração os resultados apresentados na figura 24 selecionou-se o metanol como solvente da etapa de eluição da metodologia dmt-inif-MISPE pois, devido à natureza extremamente polar, apresentou uma considerável capacidade para remover as moléculas de dimetoato que se encontravam retidas nas cavidades do MIP, proporcionando eficientes taxas de recuperação deste pesticida. É de referir, que o volume de metanol a aplicar na etapa de eluição da metodologia dmt-inif-MISPE também foi otimizado, tendo sido testados diferentes volumes deste solvente (1, 2 e 3 mL). Contudo, os resultados provenientes da análise cromatográfica por HPLC-DAD de alíquotas dos correspondentes eluídos revelaram que as taxas de recuperação de dmt se mantinham inalteradas ($71 \pm 1,1 \%$), pelo que se optou pela utilização do volume de 1 mL de metanol na última etapa (eluição) do procedimento dmt-inif-MISPE.

Face aos resultados apresentados, a metodologia dmt-inif-MISPE a ser utilizada nas amostras de azeite pode ser resumida da seguinte forma: 1) Acondicionamento da coluna MISPE com 4 mL de metanol e 4 mL de heptano; 2) Aplicação de 1 g de azeite diluída com 10 mL de heptano, com um fluxo de aproximadamente 0,5 gotas por segundo; 3) Remoção dos compostos interferentes (etapa de lavagem) mediante a aplicação de 2 mL de uma solução de heptano/ diclorometano (8:2 (v/v)) e um fluxo constante de 1 gota por segundo e 4) Eluição das moléculas de dmt adsorvidas na matriz polimérica do MIP com 1 mL de metanol e um fluxo de 0,5 gotas por segundo. As frações recolhidas durante o passo de eluição são analisadas por HPLC-DAD (Método cromatográfico 2 – secção 4.2.1.).

5.I.4. Validação da Metodologia dmt-inif-MISPE para a Detecção e Quantificação de Dimetoato em Amostras de Azeite Dopado

Como descrito na secção anterior (secção 5.I.3.), a otimização das diversas etapas (aplicação da amostra, lavagem e eluição) envolvidas na metodologia dmt-inif-MISPE revelou-se preponderante para o sucesso da implementação de uma metodologia

de preparação de amostra altamente seletiva baseada no uso de MIPs como adsorventes seletivos de extração em fase sólida para o isolamento/ pré-concentração do dmt.

Consequentemente, com o intuito de validar a metodologia dmt-inif-MISPE em amostras reais de azeite, uma vez que esta constitui a matriz alimentar em estudo neste trabalho, aplicou-se a referida metodologia a amostras de azeite biológico, ao qual foram adicionadas concentrações conhecidas de dimetoato (designado nesta dissertação por azeite dopado), conforme descrito experimentalmente na secção 4.3.4.. É de referir que, neste estudo recorreu-se à utilização de um azeite biológico, o qual foi produzido a partir de azeitonas provenientes de olivais em produção biológica, com o objetivo de assegurar que o azeite não estaria contaminado com resíduos de dimetoato.

Contudo, de forma a averiguar que o azeite biológico não continha resíduos de dimetoato realizou-se um estudo preliminar, que consistiu em aplicar uma alíquota de 1 g do azeite biológico (sem adição de dmt) diluído com 10 mL de heptano na coluna dmt-inif-MISPE e, de seguida a fração recolhida, após o procedimento de extração, foi analisada por HPLC-DAD. Através da análise do perfil cromatográfico do extrato (Figura A1 – Anexos) verificou-se que não eram detetados resíduos de dimetoato. Para além disso, o cromatograma de HPLC do extrato evidenciou ainda que, apesar de estarem presentes alguns compostos interferentes provenientes da matriz azeite, estes não eram eluídos a tempos de retenção similares ao do pesticida alvo, pelo que se antevê, que não ocorram fenómenos de co-eluição permitindo, assim, a quantificação precisa e rigorosa do dmt nas amostras reais.

Na figura 25 (A) encontra-se representado o cromatograma de HPLC-DAD referente ao extrato obtido após aplicação da metodologia de preparação de amostra dmt-inif-MISPE a amostras de azeite dopado com dmt (cujo procedimento experimental foi descrito na secção 4.3.4.). Para efeitos de comparação foi também analisado o extrato relativo à aplicação da mesma metodologia à coluna que continha o dmt-inif-NIP como fase adsorvente, tendo-se obtido o perfil cromatográfico ilustrado na figura 25 (B).

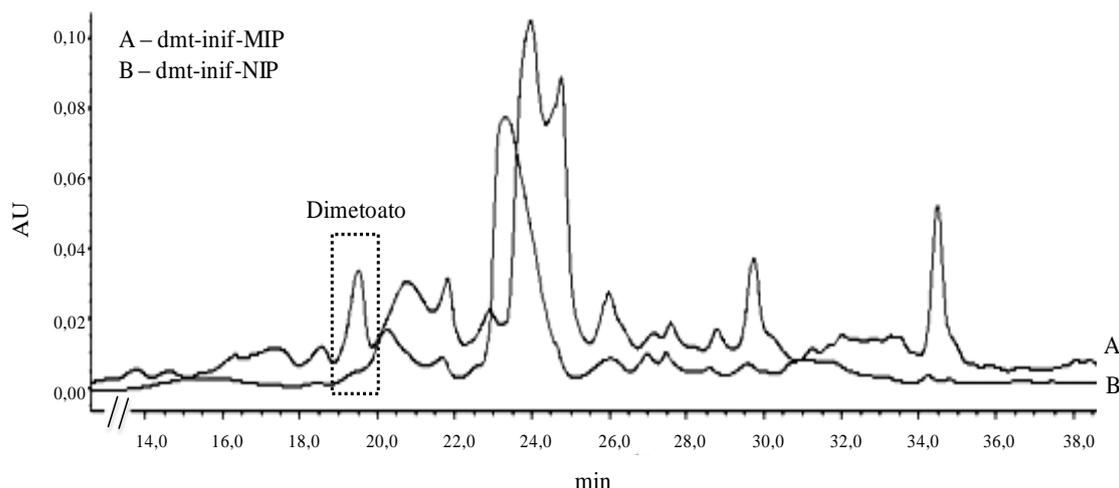


Figura 25. Cromatogramas de HPLC-DAD dos extratos obtidos após a extração de uma alíquota de 1 g de azeite contendo $29,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de dmt, mediante a aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE às colunas contendo como adsorvente o dmt-inif-MIP (A) e o respetivo NIP (B). Taxa de recuperação de dmt referente ao MIP: 64 %.

A análise do cromatograma referente ao extrato obtido através da aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE (Figura 25 - A), possibilitou a identificação do pico cromatográfico relativo ao dimetoato a um tempo de retenção de 19,3 minutos. Apesar de se verificar a existência de alguns compostos interferentes nos extratos analisados estes não influenciam a quantificação dos teores de dmt dado que não se encontram a coeluir com o analito alvo. Para fins comparativos, a metodologia de extração em fase sólida desenvolvida neste trabalho foi ainda aplicada à coluna de SPE contendo o correspondente NIP. A observação do cromatograma obtido (Figura 25 - B) mostrou que não foi possível detetar a presença de dimetoato no extrato analisado uma vez que o pesticida era completamente eluído durante a etapa de remoção dos compostos interferentes (lavagem), devido à natureza não-específica das ligações estabelecidas entre o adsorvente polimérico e as moléculas de dmt. Este facto foi comprovado através da análise por HPLC-DAD dos extratos obtidos para cada uma das etapas do processo de extração (passo de aplicação da amostra e lavagem).

Em suma, a realização deste estudo permitiu a validação da metodologia dmt-inif-MISPE para a determinação de resíduos de dmt em amostras de azeite dopadas com o referido pesticida. A elevada seletividade e capacidade de reconhecimento molecular

para o dimetoato, que a metodologia dmt-inif-MISPE permite alcançar, torna-a bastante promissora nas etapas de isolamento/ pré-concentração, particularmente quando o analito alvo se encontra presente em amostras extremamente complexas, como é o caso particular do azeite.

No contexto agrícola, a implementação dos LMRs é de enorme relevância pois permitem regular o comércio internacional e, assim, minimizar a utilização errônea de pesticidas nas culturas, dado que a presença de pesticidas pode repercutir-se aos produtos provenientes dessas culturas. Em concreto, no caso do azeite, o limite máximo de resíduos de dimetoato permitido por lei é de $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ (Regulamento (CE) n.º 1097/2009). Deste modo, atendendo ao LMR de dmt legalmente estabelecido para o azeite, procedeu-se à avaliação da sensibilidade e precisão da metodologia dmt-inif-MISPE, mediante a aplicação de amostras de azeite contendo uma concentração de dmt igual ao LMR ($2,0 \mu\text{g g}^{-1}$). Por sua vez, foi ainda testado o desempenho da metodologia MISPE mediante a aplicação de amostras de azeite contendo concentrações de dmt superiores ao LMR ($2,9$ e $5,8 \mu\text{g g}^{-1}$). Na tabela 13 encontram-se apresentados os resultados obtidos após a aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE a amostras de azeite contendo diferentes concentrações de dmt.

Tabela 13. Precisão e exatidão da coluna dmt-inif-MISPE na extração de dmt a partir de amostras de azeite dopadas com diferentes concentrações deste pesticida.

Concentração de dmt Adicionado ao Azeite ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração de dmt Adsorvido \pm SD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Taxas de Recuperação (%)
2,0 ^c	1,80 \pm 0,06	3,3	90,0
2,9	2,50 \pm 0,21	8,4	86,2
5,8	5,10 \pm 0,40	7,8	87,9

^aMédia \pm desvio padrão (SD); ^bCoefficiente de Variância (RSD); ^cConcentração de dimetoato correspondente ao LMR.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 13, a aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE, implementada neste trabalho, permitiu uma eficiente recuperação do dmt (> 86 %) a partir de amostras de azeite dopadas com concentrações de 2,9 e 5,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ deste pesticida. Em contrapartida, quando se analisaram amostras de azeite contendo uma concentração de dmt igual ao LMR (2,0 $\mu\text{g g}^{-1}$), obtiveram-se taxas de recuperação de 90 %. Os resultados relativos às taxas de recuperação obtidos neste ensaio (90 %) encontram-se situados na mesma gama de valores dos publicados por Bakas e seus colaboradores (92 %), em estudos que envolveram o desenvolvimento de um MIP e subsequente aplicação da metodologia MISPE na extração de resíduos de dimetoato (2,0 $\mu\text{g g}^{-1}$) presentes em amostras de azeite (Bakas *et al.*, 2013). É de referir que os MIPs desenvolvidos por Bakas e seus colaboradores foram sintetizados mediante a polimerização via *bulk*, pela ação térmica, com a particularidade de se ter utilizando o ometoato como molécula molde. Assim, do ponto de vista da síntese química estes MIPs diferenciam-se dos sintetizados no âmbito desta dissertação, pelo que não é possível efetuar uma comparação direta dos resultados obtidos.

Num trabalho similar, levado a cabo pela mesma equipa de investigação (Bakas *et al.*, 2012), foi desenvolvido um MIP específico para a extração seletiva de metidatião em amostras de azeite. Neste estudo, a metodologia MISPE proposta por Bakas e seus colaboradores possibilitou uma extração eficiente do pesticida em estudo com taxas de recuperação superiores a 90 %. Em particular, com a finalidade de avaliar a seletividade do polímero de impressão molecular em estudo, os investigadores testaram o desempenho da metodologia MISPE, mediante a aplicação de soluções contendo diferentes pesticidas pertencentes à classe dos organofosforados, nomeadamente o dimetoato. Contudo, o resultado deste ensaio mostrou que, no caso concreto do dmt, obtiveram-se taxas de recuperações de apenas 62 %.

Finalmente, o mesmo grupo de investigação dirigido por Bakas produziu ainda um polímero molecularmente impresso, capaz de extrair resíduos de fentião presentes em amostras de azeite, com taxas de recuperação superiores a 96 % (Bakas *et al.*, 2014). Os estudos de seletividade realizados neste trabalho mostram que o MIP apresentava uma elevada especificidade para o fentião, contudo não possuía a capacidade de reter seletivamente as moléculas de dimetoato.

Em síntese, o dmt-inif-MIP desenvolvido neste trabalho, constitui a primeira tentativa de sintetizar polímeros de impressão molecular para o reconhecimento seletivo do dimetoato usando a técnica de polimerização via *iniferter*. De acordo com os resultados obtidos mediante a avaliação da capacidade de reconhecimento molecular deste MIP, verificou-se que a técnica *iniferter*, permitiu um controlo mais eficaz da etapa de polimerização, conferindo uma melhor organização da matriz tridimensional do polímero e a formação de partículas de formas bem definidas e de reduzidas dimensões. Por outro lado, a natureza altamente porosa deste MIP, bem como um aumento considerável da área superficial, facilitou o acesso das moléculas de dimetoato aos respetivos locais de ligação, aumentando a sua capacidade de adsorção. As peculiares características apresentadas pelo polímero molecularmente impresso desenvolvido pela técnica de polimerização via *iniferter*, revelaram-se fundamentais para o sucesso da implementação da metodologia dmt-inif-MISPE. Por sua vez, a utilização do dmt-inif-MIP como materiais adsorventes na extração em fase sólida revelou-se uma abordagem analítica de preparação de amostras com um enorme potencial, para a deteção e quantificação do dimetoato, até mesmo quando este se encontra presente em quantidades vestigiais ($2,0 \mu\text{gg}^{-1}$) na matriz azeite.

5.1.5. Estabilidade e Capacidade de Reutilização da Coluna dmt-inif-MIP

O sucesso da metodologia MISPE desenvolvida neste trabalho está fundamentalmente associada à elevada seletividade e especificidade que os polímeros molecularmente impressos apresentam para o analito alvo. Na literatura encontram-se amplamente mencionadas como vantagens associadas à utilização destes materiais adsorventes poliméricos, a elevada estabilidade química, física e térmica durante longos períodos de tempo, assim como a sua capacidade de reutilização sem perder a seletividade e especificidade para o analito alvo, isto é “o efeito de memória” para o pesticida alvo é preservado (Maier *et al.*, 2004). Em concreto, a capacidade de regeneração da coluna MISPE desempenha um papel fundamental para a sua sucessiva reutilização e é crucial para a implementação da dmt-inif-MISPE como uma metodologia analítica de preparação de amostra relativamente pouco dispendiosa.

Experimentalmente, com a finalidade de avaliar a capacidade de reutilização da coluna dmt-inif-MISPE desenvolvida neste trabalho, procedeu-se à realização de 30 extrações sucessivas mediante a aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE, sendo que o azeite utilizado neste estudo foi dopado com uma concentração de dimetoato coincidente com o LMR ($2,0 \mu\text{g g}^{-1}$). É de salientar que a regeneração da coluna, entre cada extração, foi realizada com 1 ml de uma solução de metanol-ácido acético (8:2 (v/v)), de modo a remover a totalidade do dimetoato que eventualmente poderia permanecer adsorvido no MIP, seguida de 5 mL de metanol, com um fluxo de aproximadamente 2 gotas por segundo. Durante a realização deste ensaio, o material polimérico manteve a capacidade de reconhecimento molecular e apresentou uma elevada seletividade para o pesticida alvo, proporcionando a obtenção de elevadas taxas de recuperação ($93,0 \pm 6,1 \%$). Este resultado mostra que a coluna dmt-inif-MISPE possuía uma elevada reprodutibilidade, permitindo a sua reutilização durante pelo menos 30 ciclos de extração.

5.1.6.Efeito de Matriz - Método de Adição Padrão

Dada a elevada complexidade química que o azeite apresenta, alguns componentes da matriz podem interferir com o sinal analítico, o que conseqüentemente pode originar a sua supressão, dificultando a comparação do sinal obtido para a amostra, com a curva de calibração traçada pela análise cromatográfica dos respetivos padrões. Este fenómeno é vulgarmente designado de efeito de matriz e afeta a exatidão e a precisão das metodologias analíticas utilizadas para a deteção e quantificação dos resíduos de pesticidas presentes em amostras que apresentam uma elevada complexidade. Deste modo, no presente estudo, com o objetivo de avaliar o efeito de matriz recorreu-se ao método de adição padrão (SAM), o qual tem sido mencionado pela literatura como uma poderosa ferramenta, extremamente útil quando a amostra em análise é muito complexa e as interações com a matriz podem originar a quantificação errónea do pesticida alvo (EC, 2013).

O procedimento experimental para a realização do método de adição padrão, aplicado neste estudo, encontra-se detalhadamente descrito na secção 4.3.5.. Em concreto, o número de adições de padrão e a concentração de dmt aplicado a cada fração ($P_1 = 1,0 \text{ mgL}^{-1}$, $P_2 = 1,3 \text{ mgL}^{-1}$, $P_3 = 1,6 \text{ mgL}^{-1}$ e $P_4 = 2,0 \text{ mgL}^{-1}$) foram selecionados de

acordo com as normas de aplicação do SAM frequentemente recomendadas na literatura (Goseti *et al.*, 2010; EC, 2013). A análise cromatográfica das diferentes soluções preparadas durante a realização deste ensaio (S₂, S₃, S₄ e S₅) permitiu traçar um gráfico de regressão linear (Figura 26) com base nas áreas obtidas para cada solução em função das concentrações de dmt adicionadas a cada uma das soluções (P₁, P₂, P₃ e P₄).

A avaliação do efeito de matriz pode ser realizada mediante a comparação do declive correspondente à reta de calibração, convencionalmente traçada com os padrões de dimetoato, com o declive da equação geral da reta obtida mediante as várias adições de padrão (P₁, P₂, P₃ e P₄) aplicadas às diferentes frações da amostra. Na ausência de efeito de matriz os declives de ambas as retas devem apresentar a mesma ordem de grandeza (Goseti *et al.*, 2010). Assim, atendendo ao declive da reta de calibração convencional ($2,7 \times 10^4$) e ao declive da reta obtida com o SAM ($3,3 \times 10^4$) é possível afirmar que não existe efeito de matriz. Por outro lado, a concentração do analito na amostra em análise foi determinada pela extrapolação da reta no ponto onde esta intercepta o eixo das abcissas (EC, 2013), sendo que este valor correspondia em valor absoluto à concentração do analito presente na solução em análise sem qualquer adição de padrão (solução teste). Mais precisamente, dada a similar concentração do extrato da solução teste ($0,42 \mu\text{g g}^{-1}$) com a concentração obtida por extrapolação utilizando o método da adição de padrão ($0,43 \text{ mg L}^{-1}$) é evidente a ausência de efeito de matriz.

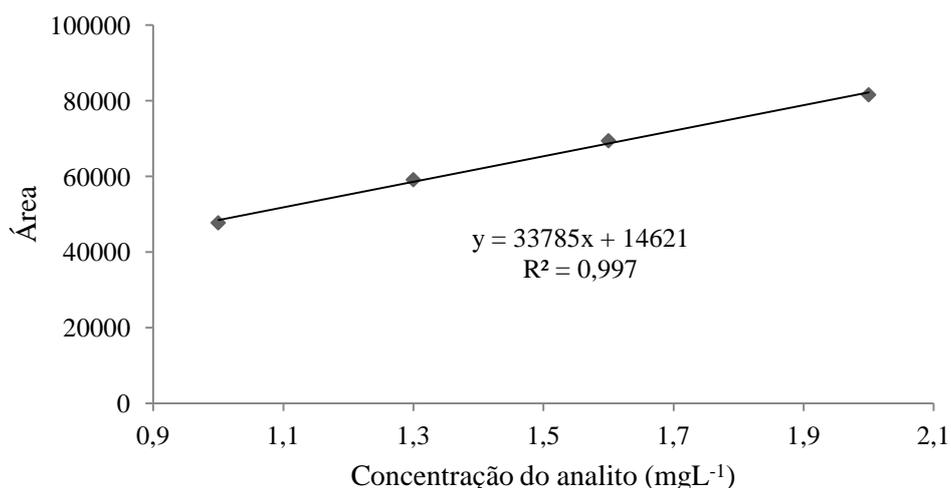


Figura 26. Representação gráfica da regressão linear e respetiva equação geral da reta obtidas mediante a aplicação do método de adição padrão.

5.1.7. Estudos Comparativos da Metodologia dmt-inif-MISPE com os Cartuchos de SPE C₁₈ Comerciais e com a Metodologia QuEChERS

Com a finalidade de comprovar a elevada seletividade da metodologia dmt-inif-MISPE desenvolvida no presente trabalho comparativamente às tradicionais metodologias de extração de amostras que recorrem ao uso de adsorventes não seletivos, procedeu-se primeiramente à realização de estudos comparativos mediante a utilização de cartuchos convencionais de SPE (C₁₈), para a extração de dimetoato a partir de amostras de azeite dopadas com uma concentração de 5,8 µg g⁻¹ deste pesticida. Para atingir este objetivo foi levada a cabo uma metodologia analítica que envolveu o prévio isolamento dos analitos alvo por extração líquido-líquido, seguida da purificação da fração obtida através do cartucho C₁₈. Experimentalmente, este ensaio foi realizado de acordo com o procedimento apresentado na secção 4.3.6.. A fração obtida durante a etapa de eluição do procedimento de extração em fase sólida foi analisada por HPLC-DAD e o perfil cromatográfico obtido encontra-se apresentado na figura 27 (B).

Os resultados obtidos durante este ensaio mostraram que o uso dos cartuchos convencionais C₁₈ origina taxas de recuperação bastante reduzidas (30 % ± 1,02) quando comparadas com as alcançadas pela metodologia dmt-inif-MISPE (88 % ± 3,6). Por outro lado, o perfil cromatográfico dos extratos obtidos mediante a LLE, seguida da extração em fase sólida com o cartucho C₁₈ (Figura 27 - B), apresenta um elevado número de compostos interferentes. Para além disso, através da análise do espectro de UV-Vis obtido para o pico que é eluído com um tempo de retenção similar ao do dimetoato, é possível verificar a co-eluição de compostos interferentes com o analito alvo. Em contrapartida, como se pode observar na figura 27 (A), a aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE permitiu uma eficiente separação do pesticida alvo dos restantes compostos interferentes constituintes da matriz azeite. Esta evidência pode ser comprovada mediante a análise do espectro de UV-Vis referente ao pico cromatográfico do dmt, dado que este espectro é característico deste pesticida. Mais precisamente, a identificação do dmt foi realizada através da comparação do tempo de retenção e do espectro UV-Vis com os obtidos para o respetivo padrão.

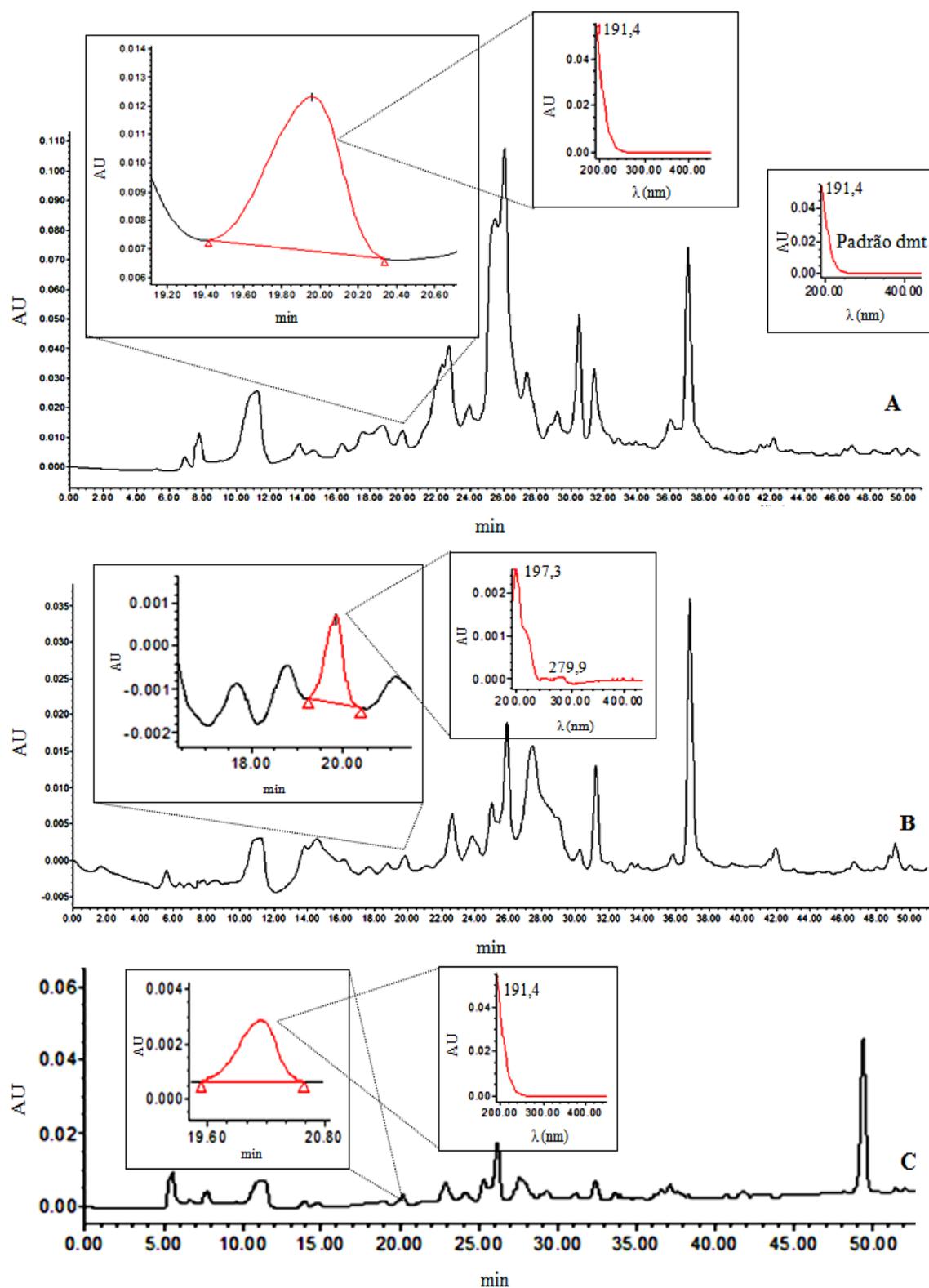


Figura 27. Perfil cromatográfico dos extratos obtidos com a metodologia dmt-inif-MISPE (A), LLE– cartucho C₁₈ (B) e metodologia QuEChERS (C). Nos cromatogramas são apresentadas as ampliações do pico correspondente ao dmt e os respectivos espectros UV-Vis (220 nm), bem como o espectro UV-Vis referente ao padrão dmt.

De um modo geral, os adsorventes convencionais utilizados em extração em fase sólida não possuem seletividade para os analitos alvo, sendo que a sua retenção é fundamentalmente promovida por interações hidrofóbicas não específicas, desencadeando conseqüentemente a co-extração de diversos compostos interferentes, que por sua vez podem co-eluir com o pesticida alvo, dificultando a sua detecção e posterior quantificação. Assim, por forma a minimizar este fenómeno, antes da extração em fase sólida é crucial realizar uma prévia extração líquido-líquido, em concreto, no presente estudo com a finalidade de isolar o dmt da restante matriz azeite, realizaram-se dois ciclos de extração LLE, seguidos da extração por SPE (C₁₈). No entanto, verificou-se que para além desta metodologia analítica se ter mostrado ineficiente na remoção dos compostos interferentes, tal como mostra a figura 27 (B), esta ainda envolveu a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos, para além de ser extremamente morosa e exigir uma elevada manipulação da amostra, quando comparada com a metodologia dmt-inif-MISPE.

Os resultados atingidos neste estudo são corroborados pelos obtidos noutros trabalhos de investigação similares (Bakas *et al.*, 2012; Bakas *et al.*, 2013; Bakas *et al.*, 2014), nos quais a aplicação de polímeros molecularmente impressos como materiais adsorventes na extração em fase sólida (MISPE) apresentam uma elevada seletividade e especificidade para o analito alvo, permitindo uma rigorosa detecção e posterior quantificação do pesticida alvo, minimizando os efeitos da matriz azeite. Por outro lado, a metodologia analítica de preparação de amostra MISPE não necessita de nenhum passo de extração intermédio (do tipo LLE), o que a torna extremamente vantajosa quando comparada com os cartuchos C₁₈.

Nos últimos anos, a metodologia QuEChERS tornou-se uma alternativa viável aos métodos convencionais de preparação de amostra, podendo mesmo afirmar-se que veio revolucionar esta etapa do processo analítico, apresentando uma ampla gama de aplicabilidade a diversas matrizes alimentares. Em termos gerais, esta metodologia apresenta inúmeras vantagens, quando comparada com os procedimentos de extração convencionais, sendo de destacar a obtenção de extratos com menores teores de compostos interferentes e a recuperação dos analitos de interesse com elevadas taxas de recuperação. Assim, devido às vantagens que se encontram associadas à sua utilização, a metodologia QuEChERS tem vindo a adquirir um grande enfoque, sendo que

atualmente é o método de extração mais vulgarmente utilizado para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras alimentares complexas (Cunha *et al.*, 2007; Garcia-Reyes *et al.*, 2007), encontrando-se portanto implementada em vários laboratórios para a realização de análises de rotina.

Deste modo, neste trabalho, procedeu-se ainda à realização de estudos comparativos da metodologia MISPE com o método QuEChERS. De modo a alcançar este objetivo, o isolamento do dimetoato a partir de amostras de azeite dopadas com $5,8 \mu\text{g g}^{-1}$ deste pesticida foi efetuado de acordo com o procedimento experimental que se encontra detalhadamente descrito na secção 4.3.7.. As frações obtidas mediante a aplicação da metodologia QuEChERS foram analisadas por HPLC-DAD e calculadas as taxas de recuperação para o dmt. Na figura 27 (C) é apresentada a análise por HPLC-DAD de um extrato obtido por aplicação do método QuEChERS.

A análise do perfil cromatográfico (Figura 27 - C) permitiu verificar que este método de preparação de amostras deu origem a extratos relativamente limpos, quando comparados com as restantes metodologias analíticas em estudo. Apesar da utilização do MgSO_4 e do NaCl , juntamente com os diferentes adsorventes (PSA, C_{18} e GCB), continua a observar-se a co-extração de algumas substâncias interferentes. Contudo, esta metodologia possibilitou uma eficiente separação do analito alvo em relação aos restantes compostos interferentes, permitindo atingir elevadas taxas de recuperação ($95 \% \pm 6,1$). Os resultados obtidos neste ensaio estão de acordo com os apresentados num estudo levado a cabo por Cunha e seus colaboradores (Cunha *et al.*, 2007), no qual se procedeu à otimização da metodologia QuEChERS, para a posterior determinação de diversos pesticidas presentes em quantidades vestigiais em amostras de azeitonas e azeites. Em concreto, neste trabalho, os investigadores obtiveram taxas de recuperação de 100 % no caso particular do dimetoato.

De um modo geral, a utilização de acetonitrilo como solvente de extração na metodologia QuEChERS permite solubilizar menores teores de compostos lipídicos, nomeadamente algumas ceras, gorduras e pigmentos, quando comparado com outros solventes orgânicos (Mařtovská e Lehotay, 2004). A adição dos sais- MgSO_4 anidro e NaCl na etapa de extração promove o fenómeno de *salting-out*, o que facilita a transferência das substâncias para a fase orgânica, com um conseqüente aumento do rendimento do processo de extração. Por sua vez, o PSA tem tendência a estabelecer

pontes de hidrogénio com grupos hidroxilo e/ ou carboxílicos, permitindo a remoção de compostos como os ácidos gordos e alguns pigmentos. Finalmente, o GCB possui uma elevada afinidade para compostos de estrutura planar, permitindo a remoção de substâncias como esteróis e pigmentos, tais como as clorofilas e os carotenoides (Anastassiades *et al.*, 2003).

Em suma, apesar das indiscutíveis vantagens que se encontram associadas à utilização do método QuEChERS para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras complexas, convém salientar que este método, quando comparado com a metodologia dmt-inif-MISPE, tem como limitações o facto de ser uma técnica relativamente morosa, pois compreende diversas etapas de purificação, exige a realização de inúmeras pesagens (sais e adsorventes), por outro lado, envolve um elevado manuseamento da amostra, o que pode originar perdas do analito alvo durante a sua execução.

Nas últimas décadas, têm-se assistido a um rápido desenvolvimento de novos métodos analíticos, visando a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos. Estes avanços tiveram como objetivo a substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos que apresentavam como limitações a morosidade das diversas etapas, a utilização de grandes volumes de solventes orgânicos e o elevado custo. No caso particular da matriz azeite, devido à inerente complexidade que esta amostra alimentar apresenta, a determinação dos resíduos de pesticidas representa um enorme desafio analítico. Deste modo, no presente trabalho procurou-se ultrapassar estas limitações mediante a aplicação dos polímeros de impressão molecular como materiais adsorventes seletivos na extração em fase sólida, o que permitiu a implementação da metodologia dmt-inif-MISPE, a qual se revelou extremamente promissora para a extração do dimetoato a partir de amostras de azeite. Por outro lado, a capacidade de reutilização das colunas MISPE sem perder a especificidade para o dmt (pelo menos 30 utilizações), torna esta metodologia muito vantajosa economicamente, relativamente à metodologia QuEChERS e aos cartuchos convencionais C₁₈, frequentemente utilizados nas extrações por SPE.

5.1.8. Aplicação da Metodologia dmt-inif-MISPE para a Detecção e Quantificação de Dimetoato em Diferentes Azeites Comerciais

O dimetoato é um inseticida pertencente à classe dos organofosforados que apresenta uma apreciável utilização na proteção de muitas culturas, entre as quais se destaca o olival. Em termos gerais, se eventualmente não se obedecerem aos critérios técnicos de aplicação dos pesticidas, isto é, caso não se respeitem as dosagens recomendadas, o número de aplicações, o intervalo entre aplicações, e fundamentalmente o intervalo de segurança, no momento da colheita, as azeitonas podem conter resíduos deste pesticida na sua composição. Deste modo, atendendo a que o azeite é produzido exclusivamente por processos físicos e/ ou mecânicos, não existindo nenhum processo metabólico que degrade a substância ativa, estes compostos altamente tóxicos podem estar presentes nesta matriz alimentar.

Para que se verifique o aparecimento das diferentes pragas do olival é necessário que se reúnam um conjunto de condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Uma vez que as condições edafo-climáticas diferem nas várias regiões do país, é facilmente compreensível que a intensidade dos ataques provocados por estes organismos patogénicos sejam variáveis de região para região. Deste modo, o tipo de substância ativa e o número de tratamentos fitossanitários efetuados para controlar estas pragas são consequentemente distintos. Neste contexto, a metodologia dmt-inif-MISPE implementada no presente trabalho foi utilizada para estudar a eventual presença e posterior quantificação de dimetoato num conjunto de amostras de azeites comerciais produzidos em diferentes regiões de Portugal. Mais precisamente, para cada região de produção (Alentejo, Trás-os-Montes e Beiras) selecionaram-se aleatoriamente três produtores distintos, por sua vez para cada produtor analisaram-se três garrafas do mesmo lote e, por último realizaram-se três repetições para cada garrafa.

A pesquisa de dmt nas amostras de azeite anteriormente referidas foi realizada mediante a aplicação da metodologia dmt-inif-MISPE, de acordo com o procedimento experimental que se encontra detalhadamente descrito na secção 4.3.9..

A realização deste ensaio permitiu concluir que nas amostras de azeite analisadas, não foi detetada a presença de dimetoato, independentemente do produtor e da região em estudo.

Adicionalmente, com o objetivo de assegurar a performance da coluna dmt-inif-MISPE utilizada para estudar a eventual presença de dimetoato nos diversos azeite em análise, quando se iniciavam os estudos para os diversos produtores de cada região, foram aplicadas amostras dos respectivos azeites contendo uma concentração de dmt igual ao LMR ($2,0 \mu\text{g g}^{-1}$). Este estudo permitiu verificar que a metodologia dmt-inif-MISPE possuía uma elevada reprodutibilidade, mostrando-se extremamente eficiente no isolamento deste pesticida em amostras de azeite de diferentes proveniências, com taxas de recuperação superiores a $90 \pm 4,7 \%$.

II

Polímeros Molecularmente Impressos Seletivos para a Terbutilazina: Aplicação como Adsorventes na Extração em Fase Sólida para a sua Detecção e Quantificação em Azeite

A maioria dos resultados apresentados nesta secção foram publicados no formato de artigo científico nas seguintes revistas internacionais com arbitragem científica: Garcia R., Martins N., Carreiro E. P., Simões M., Carrott M. M. L. R., Carrot P. J. M., Burke A. J., Cabrita M. J. (2015). Journal of Separation Science, 38, 1204-1212.

5.II.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular

5.II.1.1.Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE

Com a finalidade de desenvolver uma metodologia analítica precisa, robusta e fiável para a deteção e quantificação de terbutilazina presente em quantidades vestigiais em amostras de azeite foi sintetizado, no âmbito do plano de trabalhos que integram o projeto de investigação, um polímero molecularmente impresso (tbz-tr-MIP) específico para o reconhecimento molecular da terbutilazina, o qual foi posteriormente utilizado como material adsorvente na extração em fase sólida.

Em termos gerais, o tbz-tr-MIP foi produzido mediante a técnica de polimerização via *bulk*, por ação da radiação UV, de acordo com as seguintes condições de síntese: como molécula molde usou-se a terbutilazina, o MAA foi selecionado como monómero funcional, o EGDMA como agente de ligação cruzada, o AIBN como iniciador radicalar e como solvente porogénico aplicou-se o diclorometano, obedecendo a uma razão estequiométrica de 0,25:0,06:1:5 (T:I:M:A). Por sua vez, o correspondente NIP (tbz-tr-NIP) foi sintetizado reproduzindo as mesmas condições de síntese do MIP, à exceção da adição da molécula molde.

De modo a avaliar o sucesso da etapa de síntese e a verificar se o sistema de impressão molecular MIP/ NIP produzido pelos membros da equipa de investigação que se encontravam dedicados a esta tarefa específica possuía as propriedades pretendidas, após a síntese foi efetuada, pela mesma equipa de investigação, uma pormenorizada caracterização química e morfológica destes materiais poliméricos.

De seguida, a avaliação da capacidade de reconhecimento molecular do tbz-tr-MIP foi efetuada mediante a realização de estudos de reconhecimento molecular por SPE, utilizando este material polimérico como adsorvente seletivo.

Durante a realização deste trabalho de investigação verificou-se que os sistemas de impressão molecular na presença de solventes polares sofrem um aumento substancial do seu volume, pelo que o enchimento das colunas de SPE utilizando os polímeros molecularmente impressos “secos” deu origem a uma camada adsorvente não homogênea e extremamente comprimida, promovendo uma reduzida capacidade de

reconhecimento molecular dos MIPs, devido ao difícil acesso dos analitos alvos aos respetivos locais de ligação (Maier *et al.*, 2004). Deste modo, neste estudo, o enchimento das colunas foi realizado com os diferentes sistemas de impressão molecular previamente umedecidos em metanol, de seguida, para que a camada polimérica não ficasse demasiado comprimida, a adição do segundo filtro foi realizada cuidadosamente, após se observar o aumento máximo de volume. O enchimento foi realizado mediante a utilização de metanol, uma vez que o uso deste solvente promoveu o maior aumento de volume (*swelling*) dos sistemas de impressão molecular em análise, quando comparado com outros solventes (heptano, diclorometano e acetonitrilo). Adicionalmente, durante o enchimento das colunas de SPE com os respetivos materiais poliméricos verificou-se que o tbz-tr-MIP sofreu um aumento de volume consideravelmente superior ao correspondente NIP. O fenómeno de *swelling* tem vindo a ser frequentemente referido por vários autores, os quais afirmam que o aumento de volume por parte dos MIPs na presença de solventes polares é uma característica inerente aos sistemas de impressão molecular sintetizados pela técnica de polimerização via *bulk* (Maier *et al.*, 2004). Após o empacotamento das colunas MISPE/ NISPE, procedeu-se a uma prévia lavagem dos materiais poliméricos que constituíam as fases adsorventes das respetivas colunas de extração e, em seguida realizou-se o procedimento de extração por SPE de acordo com a metodologia experimental detalhada na secção 4.3.1. (iii – Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE).

Na figura 28 encontram-se representadas as isotérmicas de adsorção que traduzem a quantidade de dimetoato adsorvido (Q) no MIP e correspondente NIP em função da concentração inicial (C_i) de terbutilazina que é adicionada no passo de aplicação da amostra, durante o procedimento de extração em fase sólida.

De um modo geral, a análise da figura 28, mostra que a quantidade de terbutilazina que se encontrava retida na matriz polimérica dos sistemas de impressão molecular, avaliados neste ensaio, aumentou com o incremento da concentração inicial de terbutilazina aplicada nas colunas que continham o tbz-tr-MIP e correspondente NIP. Contudo, a partir da concentração de 612 mgL^{-1} as isotérmicas de adsorção tendem a adquirir um perfil de saturação, isto é, por mais que a concentração inicial de tbz aumente, a quantidade deste pesticida adsorvido na matriz polimérica permanece constante, pois os locais de ligação encontram-se totalmente preenchidos.

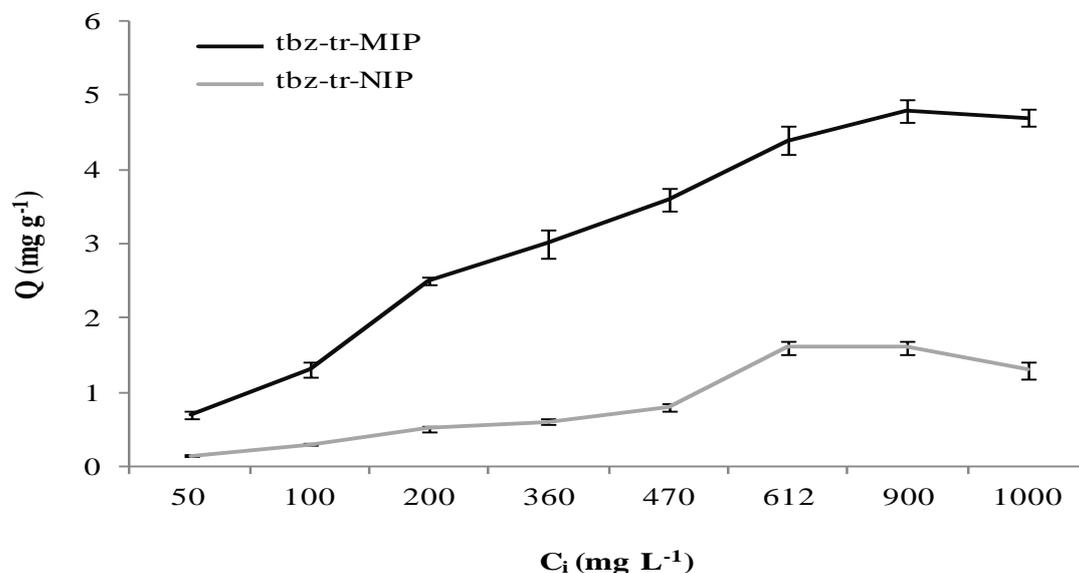


Figura 28. Capacidade de adsorção do tbz-tr-MIP e correspondente NIP.

Mais precisamente, comparando o MIP com o respetivo NIP foi perfeitamente visível que o polímero molecularmente impresso exibiu uma capacidade de reconhecimento molecular significativamente superior, apresentando uma capacidade máxima de adsorção de cerca de 5 mg g^{-1} . Estes resultados sugerem a existência de locais de ligação específicos para a terbutilazina na matriz polimérica, os quais foram formados durante o processo de impressão molecular, mediante a formação de uma estrutura tridimensional (polimerização) em torno do complexo molécula molde-monómero funcional. Por sua vez, como seria esperado, o NIP possui uma reduzida capacidade de reconhecimento molecular para a tbz, o que pode ser comprovado através dos baixos valores de Q obtidos neste estudo ($Q_{\text{max}} < 1,5 \text{ mg g}^{-1}$), sendo que as interações que se estabeleceram entre as moléculas de tbz e a matriz polimérica do NIP foram, muito provavelmente, mediadas por ligações de natureza não específica.

Vulgarmente, nos protocolos de síntese de sistemas de impressão molecular mediante a técnica de polimerização via *bulk*, e fundamentalmente quando se usam sistemas de impressão não-covalentes, é necessário a utilização de grandes quantidades de monómero funcional relativamente ao número de moles de molécula molde, por forma a maximizar a formação dos complexos molécula molde-monómero funcional. Em concreto, no presente estudo obedeceu-se a uma razão estequiométrica entre a

molécula molde e o monómero funcional da ordem de 1:4 (T:M). Contudo, o excesso de monómeros livres que não estabelecem ligações com as moléculas molde é incorporado na matriz polimérica, originando a formação de locais de ligação não específicos e ainda a formação de locais de ligação heterogéneos devido à natureza fraca das ligações não-covalentes (Vasapollo *et al.*, 2011). Por sua vez, dado que o polímero não molecularmente impresso (NIP) foi obtido reproduzindo as condições de síntese do correspondente MIP, à exceção da adição da molécula molde, é facilmente perceptível que a quantidade de monómeros funcionais aplicada durante o processo de produção do NIP ficou dispersa na sua matriz, originando consequentemente a formação de ligações não específicas entre as moléculas de tbz e os monómeros MAA, aquando da realização dos estudos de reconhecimento molecular por SPE.

O desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos seletivos para os pesticidas pertencentes à classe das triazinas tem-se focado essencialmente na molécula alvo atrazina (Mhaka *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014). Nalguns estudos, a síntese deste tipo de MIPs tem vindo a ser explorada recorrendo à utilização de técnicas de polimerização mais recentes (CLRP), com a finalidade de ultrapassar as limitações associadas à via *bulk* (Xu e Chen, 2011). Contudo, até à data, poucos estudos têm sido dedicados à análise de vestígios de terbutilazina em matrizes alimentares, baseada na utilização de materiais adsorventes seletivos produzidos pela tecnologia de impressão molecular. Um dos trabalhos de investigação que culminou com a introdução de um MIP seletivo para a terbutilazina foi desenvolvido por Ferrer e seus colaboradores. Estes investigadores exploraram o desenvolvimento de polímeros de impressão molecular usando a terbutilazina como molécula molde, para a extração seletiva de diferentes triazinas, das quais se destacam a terbutilazina, a propazina, a atrazina e a simazina, presentes em amostras de sedimentos e águas naturais (Ferrer *et al.*, 2000). Mais recentemente, num estudo dirigido por Chapuis juntamente com a sua equipa de investigação, foram sintetizados dois MIPs distintos, mediante a aplicação de terbutilazina e ametrina como moléculas moldes, os quais foram avaliados para a extração seletiva de vários pesticidas pertencentes à classe das triazinas presentes em matrizes complexas, nomeadamente em amostras de sumo de uva e extratos de solo (Chapuis *et al.*, 2004). Neste contexto, dada a reduzida informação disponível na literatura não foi possível estabelecer uma relação direta com os resultados obtidos no presente ensaio, com outros trabalhos similares.

Os resultados alcançados durante os estudos de reconhecimento molecular por SPE foram ainda correlacionados com a caracterização morfológica do tbz-tr-MIP e respectivo NIP, obtida pela análise SEM dos sistemas de impressão molecular em estudo (Figura 29).

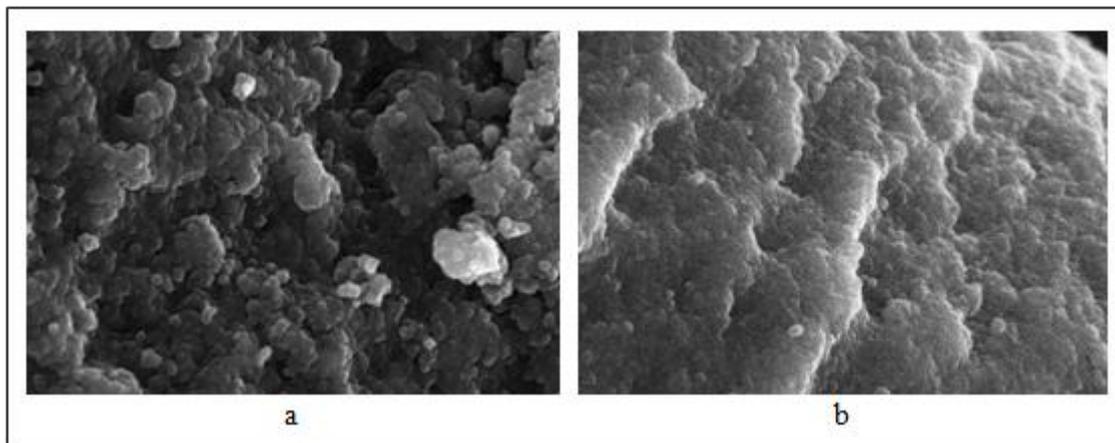


Figura 29. Imagens obtidas por SEM do a) tbz-tr-MIP e b) correspondente NIP (voltagem 10 kV, resolução de 6,7 mm x 8,00 k SE).

A análise das imagens SEM (Figura 29) revelou a existência de diferenças significativas entre a morfologia do tbz-tr-MIP e do respectivo NIP. Em particular, o MIP possuía uma superfície mais rugosa e heterogênea, enquanto que o NIP apresentava uma aparência mais homogênea, desprovida de cavidades, a qual sugeria a ausência de locais de ligação. Deste modo, a morfologia dos sistemas de impressão molecular em estudo permitiu comprovar a elevada capacidade de reconhecimento molecular do MIP relativamente ao NIP. Como mostra a figura 29 (a) a estrutura tridimensional do MIP é constituída por partículas que formam agregados de grandes dimensões, com formas relativamente irregulares. Contudo como descrito na literatura, esta evidência não é considerada como uma limitação para a aplicação destes materiais como adsorventes de SPE (Qiao *et al.*, 2006). Por sua vez, a estrutura microporosa da matriz polimérica do tbz-tr-MIP é indicativa da existência de inúmeras cavidades, permitindo uma maior facilidade de acesso das moléculas de tbz aos respectivos locais de ligação.

5.II.2. Estudos de Seletividade do tbz-tr-MIP para a Terbutilazina

O sucesso da etapa de síntese dos polímeros molecularmente impressos não pode ser avaliado exclusivamente pela capacidade que estes materiais possuem para adsorver o analito alvo, pois para além de uma elevada capacidade de reconhecimento molecular, os MIPs devem ainda apresentar uma aptidão para reconhecer o analito de interesse em detrimento de compostos estruturalmente análogos.

Neste contexto, a seletividade dos MIPs é um fator primordial para a sua aplicação como materiais adsorventes na extração em fase sólida. Deste modo, com a finalidade de avaliar a especificidade do tbz-tr-MIP para o reconhecimento molecular das moléculas de terbutilazina, foram realizados estudos de reconhecimento molecular por SPE utilizando compostos que possuem uma estrutura química análoga à do pesticida alvo (atrazina e ametrina), cuja representação geral se encontra ilustrada na figura 30.

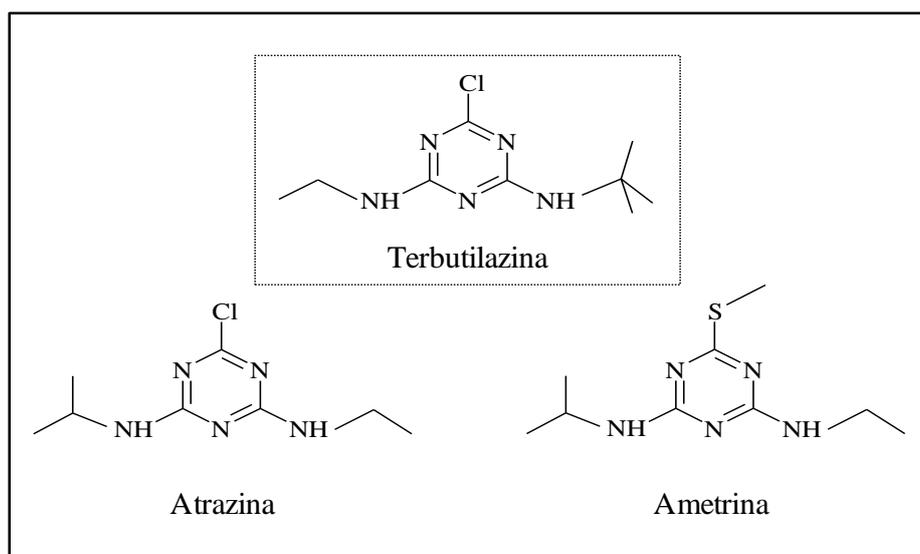


Figura 30. Representação geral das estruturas químicas da terbutilazina e de compostos análogos pertencentes à classe das triazinas.

De modo a concretizar este objetivo seguiu-se o procedimento experimental que se encontra sucintamente detalhado da secção 4.3.2.. A análise cromatográfica (HPLC-DAD) dos extratos obtidos durante a realização deste ensaio permitiu determinar as taxas de recuperação da terbutilazina e dos seus análogos estruturais, bem como a sua

capacidade de adsorção e os respectivos fatores de seletividade. Na tabela 14 encontram-se resumidos os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 14. Taxas de recuperação, capacidade de adsorção e fator de seletividade referente a cada pesticida, relativamente ao tbz-tr-MIP e correspondente NIP.

Pesticidas	Taxas de Recuperação \pm SD ^a (%)		Q (mgg ⁻¹)		α ^b
	MIP	NIP	MIP	NIP	
Terbutilazina	73,0 \pm 1,6	15,8 \pm 1,9	0,73 \pm 0,01	0,160 \pm 0,007	4,6 \pm 0,2
Atrazina	64,8 \pm 1,0	18,8 \pm 0,7	0,65 \pm 0,01	0,190 \pm 0,007	3,4 \pm 0,1
Ametrina	61,9 \pm 0,1	22,6 \pm 0,3	0,62 \pm 0,03	0,230 \pm 0,005	2,7 \pm 0,1

^aMédia \pm desvio padrão (SD); ^bfator de seletividade: $\alpha = Q_{MIP} / Q_{NIP}$, Q_{MIP} e Q_{NIP} correspondem à capacidade de ligação da tbz e dos respectivos análogos para o tbz-tr-MIP e correspondente NIP.

De acordo com os valores apresentados na tabela 14 verificou-se que as interações formadas entre a terbutilazina e a matriz polimérica do tbz-tr-MIP foram bastante superiores às que se estabeleciam com o NIP, evidenciando mais uma vez a existência de locais de ligação específicos para o analito alvo, razão pela qual as taxas de recuperação obtidas para o MIP são superiores às obtidas com o NIP.

Por outro lado, foi também possível observar que o MIP apresentava uma afinidade sensivelmente superior para as moléculas de terbutilazina ($\alpha = 4,6 \pm 0,2$) relativamente aos seus análogos estruturais- atrazina ($\alpha = 3,6 \pm 0,1$) e ametrina ($\alpha = 2,7 \pm 0,1$). No entanto, atendendo às taxas de recuperação e aos valores de Q determinados para a atrazina e para a ametrina, observou-se uma similar capacidade do MIP para reter estes dois pesticidas.

Durante a síntese do MIP, são criados locais de ligação específicos para o analito alvo, nos quais se estabelecem ligações por pontes de hidrogénio entre os monómeros

funcionais MAA e as moléculas de tbz (Figura 31). Deste modo, como mostra a figura 30, dada a semelhança entre as estruturas químicas da terbutilazina e dos seus análogos, é facilmente compreensível, que quando as moléculas de atrazina ou ametrina acedem aos locais de ligação existentes na matriz polimérica do MIP, são estabelecidas ligações intermoleculares por pontes de hidrogénio dos monómeros funcionais com os grupos -NH- e os átomos de azoto do anel triazínico que se encontram presentes na composição química destes pesticidas. Este fenómeno justifica o facto de neste ensaio se terem observado taxas de recuperação semelhantes para os três pesticidas em estudo.

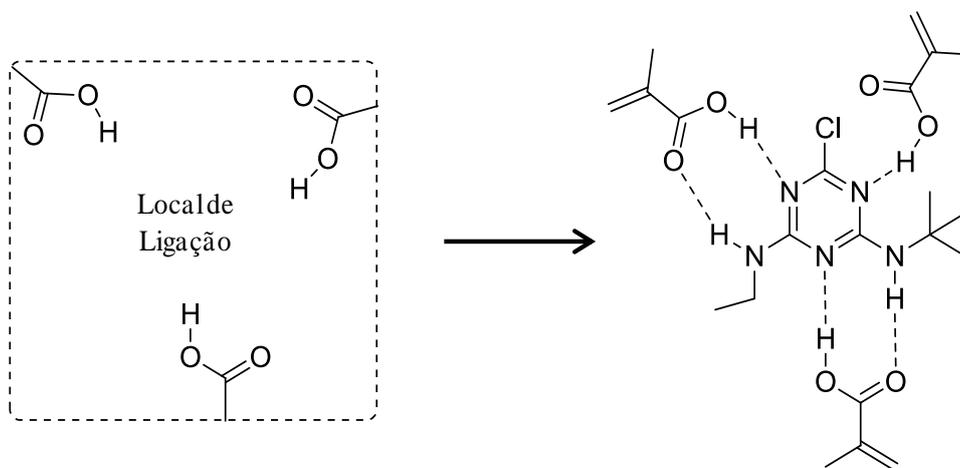


Figura 31. Representação esquemática das ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre o MAA e as moléculas de tbz nos locais de ligação formados durante a síntese do MIP.

Os resultados alcançados neste estudo estão em concordância com os obtidos num ensaio similar desenvolvido por Chapuis e os seus colaboradores. Em concreto, os investigadores testaram a seletividade de um MIP, sintetizado com terbutilazina como molécula molde, face a diferentes compostos estruturalmente análogos da tbz, cujas moléculas possuíam o mesmo tamanho e polaridade. Com a realização deste estudo, os cientistas obtiveram taxas de recuperação de 100 % para vários pesticidas em análise (terbutilazina, propazina, atrazina, cianazina e simazina). Especificamente, para a ametrina obtiveram taxas de recuperação na ordem dos 26 %, ao passo que no presente trabalho as taxas de recuperação obtidas para este composto foram próximas às da atrazina. A elevada capacidade que o MIP apresentava para reconhecer alguns dos pesticidas alvo desse estudo, foi indicativo de uma reduzida especificidade, a qual foi

atribuída às semelhantes estruturas químicas que esses compostos apresentavam entre si (Chapuis *et al.*, 2004).

Em suma, o comportamento de reconhecimento molecular do MIP avaliado mediante a realização dos estudos de seletividade, sugere que o mecanismo de impressão que ocorre durante a síntese destes materiais poliméricos adsorventes desempenha um papel fundamental na interação do analito alvo, com os grupos funcionais existentes no interior da rede polimérica tridimensional, originando a formação de locais de ligação complementares em tamanho e forma para a terbutilazina.

5.II.3.Implementação da metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração

De um modo geral, as metodologias analíticas utilizadas para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras alimentares envolvem geralmente duas etapas distintas. Primeiramente, é necessário realizar um passo prévio de preparação das amostras a analisar, de modo a isolar e pré-concentrar o pesticida de interesse da restante matriz, seguido da detecção e quantificação do analito alvo, mediante a análise cromatográfica dos extratos obtidos após o processo de extração.

Como tem vindo a ser referido ao longo deste trabalho, a matriz azeite apresenta uma enorme complexidade, mais concretamente, na sua composição química a fração saponificável representa 98,5 - 99,5 % sendo constituída essencialmente por substância de natureza lipídica, tais como triglicéridos, ácidos gordos livres e fosfolípidos (Bakas *et al.*, 2014). Atendendo a que os pesticidas são compostos extremamente lipossolúveis, a etapa de preparação de amostra representa um enorme desafio analítico, pois deve possuir a capacidade de isolar o analito alvo dos restantes compostos interferentes que constituem a matriz azeite, de modo a não comprometer a subsequente análise cromatográfica.

Neste contexto, no presente trabalho procurou-se desenvolver uma metodologia, baseada na utilização dos polímeros molecularmente impressos como materiais adsorventes na extração em fase sólida (MISPE), a qual deveria apresentar a capacidade para reconhecer seletivamente as moléculas de terbutilazina em amostras de azeite, minimizando o efeito de matriz. Assim, de modo a concretizar este objetivo foi crucial

realizar uma prévia otimização das diferentes etapas que constituíam o procedimento de extração da metodologia MISPE (acondicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição).

Em concreto, com a finalidade de promover a retenção das moléculas de terbutilazina nos respetivos locais de ligação presentes na matriz polimérica do MIP e maximizar a sua capacidade de reconhecimento molecular, procedeu-se à otimização da etapa de aplicação da amostra, mediante a avaliação da eficiência de vários solventes, com diferentes polaridades (heptano, diclorometano, acetonitrilo e metanol), na retenção da tbz pelas colunas tbz-tr-MISPE e tbz-tr-NISPE. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na figura 32 e de modo a facilitar a sua comparação foram expressos sob a forma de taxa de recuperação de terbutilazina.

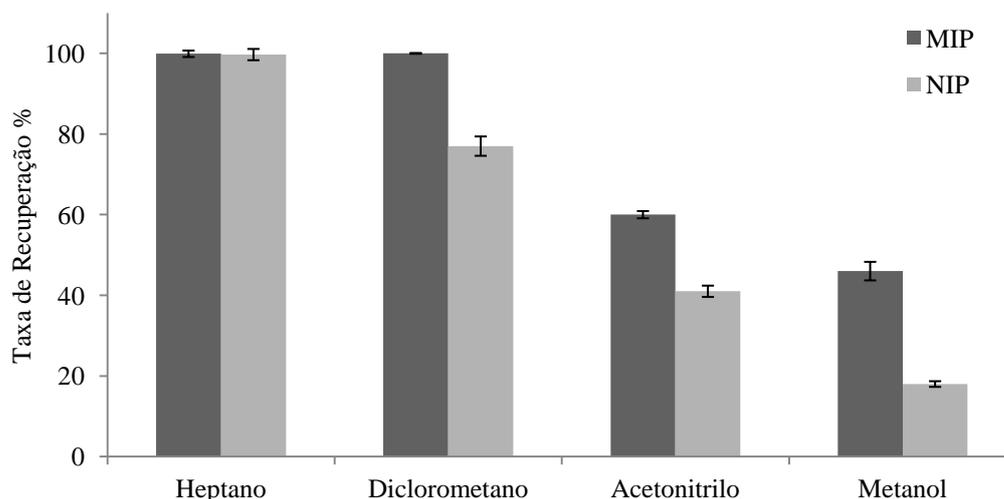


Figura 32. Efeito da utilização de diferentes solventes durante a otimização da etapa de aplicação da amostra.

De acordo com a informação apresentada na figura 32, e tal como esperado, foi possível verificar que a natureza dos solventes utilizados durante a etapa da aplicação da amostra afeta a retenção das moléculas de tbz pelos sistemas de impressão molecular em estudo. Estes resultados foram consistentes com os relatados na literatura, os quais mencionam que a intensidade da interação estabelecida entre o analito e os locais de ligação existentes no MIP aumenta com a diminuição da polaridade do solvente utilizado na etapa da aplicação da amostra (Sellergren e Andersson, 2000).

Mais concretamente, o uso de solventes polares, tais como o acetonitrilo e o metanol, originou taxas de recuperação relativamente reduzidas (inferiores a 60 %), uma vez que as moléculas de tbz apresentavam uma elevada solubilidade nestes solventes e, portanto, durante a etapa da aplicação da amostra verificou-se que uma quantidade substancial de tbz sofria de imediato uma eluição da coluna. Em contrapartida, a aplicação de um solvente apolar (heptano) permitiu que a quantidade de tbz aplicada na respetiva coluna MISPE ficasse praticamente toda retida na sua matriz polimérica. As elevadas taxas de recuperações alcançadas mediante o uso de heptano foram justificadas pelo facto de este solvente não interferir nas interações estabelecidas entre os monómeros funcionais e as moléculas de tbz (Yan e Ramström, 2005). Apesar das elevadas taxas de recuperação obtidas para o tbz-tr-MIP ($99,9 \pm 0,8$ %), verificou-se que o NIP apresentava também uma elevada capacidade para reter o pesticida alvo, com recuperações da ordem dos $99,7 \pm 1,4$ %, dado que o heptano promovia a formação de ligações não-específicas entre a tbz e os monómeros funcionais que se encontravam presentes na matriz polimérica dos sistemas de impressão molecular. Finalmente, de modo a alcançar uma maior diferenciação entre as taxas de recuperação do MIP e do NIP, utilizou-se um solvente de polaridade intermédia (diclorometano), tendo-se obtido, nestas condições, taxas de recuperação extremamente elevadas ($100 \pm 0,1$ %) para o MIP e a redução das interações não específicas que ocorriam no NIP, o que consequentemente originou um decréscimo na taxa de recuperação para $77,0 \pm 2,4$ %

A variação da capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros molecularmente impressos em função da natureza do solvente usado durante a etapa de aplicação da amostra pode ser explicada pelo efeito de memória do MIP que é induzido pelo solvente porogénico (Cai e Gupta, 2004). De acordo com esta teoria, a adsorção das moléculas do analito alvo é favorecida quando o ambiente de síntese é reproduzido (Caro *et al.*, 2006). Como o tbz-tr-MIP foi sintetizado utilizando o diclorometano como solvente porogénico, a utilização deste solvente no passo de aplicação da amostra permitiu alcançar uma elevada retenção das moléculas de tbz nos locais de ligação presentes na matriz polimérica do MIP.

Os resultados obtidos neste ensaio, indicaram que o diclorometano foi evidentemente o solvente mais adequado para a realização da etapa de aplicação de amostra, pelo que foi utilizado em estudos posteriores durante a otimização do protocolo de tbz-tr-MISPE.

Por sua vez, com a finalidade de avaliar a capacidade da coluna tbz-tr-MISPE para pré-concentrar a terbutilazina, procedeu-se à aplicação de diferentes volumes de diclorometano (1, 5 e 10 mL) contendo a mesma quantidade do pesticida alvo (0,05 mg). De seguida, as alíquotas aplicadas à coluna tbz-tr-MISPE foram recolhidas e analisadas por HPLC-DAD. Os resultados obtidos neste ensaio permitiram verificar que a eficiência de extração da coluna MISPE não foi influenciada pelo volume do solvente e, por outro lado demonstraram que a coluna possuía uma elevada capacidade para pré-concentrar o analito alvo, mesmo quando este se encontrava presente em quantidades vestigiais em grandes volumes (10 mL), obtendo-se taxas de recuperação para o analito alvo da ordem dos $100 \pm 0,7$ % aquando da utilização dos diferentes volumes de diclorometano em análise durante a etapa de aplicação da amostra.

Devido à inerente complexidade que as amostras de azeite apresentam, nomeadamente a elevada quantidade de compostos de natureza lipídica que podem co-eluir com o analito alvo, é crucial que o procedimento de extração associado à metodologia MISPE contenha uma eficiente etapa de remoção dos compostos interferentes. Nesta etapa, vulgarmente designada de lavagem, pretende-se reduzir os teores de substâncias interferentes no extrato final, sem afetar as ligações específicas estabelecidas entre a tbz e o MIP, isto é, este passo deverá ser otimizado de modo a evitar que as moléculas de tbz sejam arrastadas ao longo do adsorvente e eluídas da coluna.

Neste contexto, de modo a otimizar a etapa de lavagem testou-se o efeito de diferentes solventes (heptano, diclorometano e acetonitrilo) na extração da terbutilazina (mantendo sempre o metanol como solvente de eluição), encontrando-se uma sùmula dos resultados obtidos na figura 33.

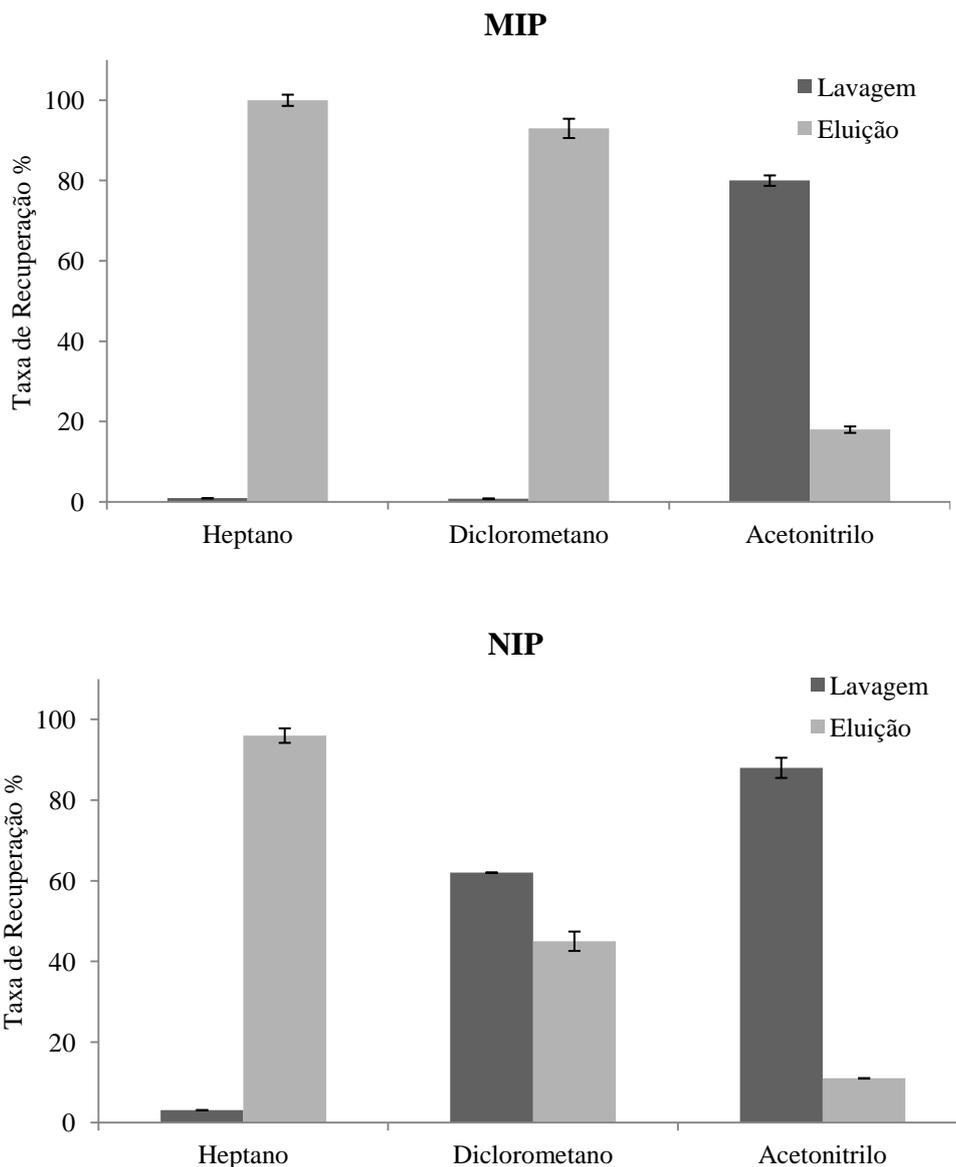


Figura 33. Estudo da influência da natureza do solvente utilizado na otimização da etapa de lavagem. A eluição foi efetuada utilizando 2 mL de metanol.

Por análise da figura 33 constatou-se que o uso de acetonitrilo como solvente de lavagem removia praticamente toda a quantidade de tbz que se encontrava seletivamente retida na matriz polimérica do MIP ($80 \pm 1,3$ %), bem como as ligações não específicas que ocorriam no respectivo NIP ($88 \pm 2,5$ %). Estes resultados foram explicados pela elevada capacidade que este solvente, de natureza polar, possuía para quebrar as interações estabelecidas entre as moléculas de tbz e os sistemas de impressão molecular. Por sua vez, a utilização de um solvente apolar, nomeadamente o heptano, praticamente não afetou as ligações formadas entre o pesticida em estudo e o MIP

(Figura 33 - a), contudo, dada a sua reduzida polaridade, este solvente não foi capaz de suprimir as interações não específicas entre as moléculas de tbz e a estrutura polimérica do NIP (Figura 33 - b). Finalmente, a aplicação de 1 mL de diclorometano durante a etapa de lavagem, permitiu a remoção de $62 \pm 0,1$ % da quantidade total de tbz que se encontrava adsorvida no NIP, sem afetar a quantidade de terbutilazina seletivamente retida nos locais de ligação do MIP, permitindo a obtenção de elevadas taxas de recuperação deste pesticida ($93 \pm 2,4$ %) durante a posterior etapa de eluição. Em suma, os resultados obtidos durante a otimização do passo de lavagem da metodologia tbz-tr-MIP/ tbz-tr-NIP indicaram que o diclorometano seria o solvente mais adequado para a realização desta etapa, dado que seria eficiente na remoção dos compostos interferentes, constituintes da matriz azeite, sem remover as moléculas de tbz adsorvidas no MIP.

Por outro lado, de acordo com os dados experimentais conclui-se ainda que o metanol seria o solvente mais eficaz para a eluição do analito alvo (Figura 33 - a), pois a sua elevada polaridade permitia quebrar as interações que se estabeleciam entre a terbutilazina e os monómeros funcionais presentes nos respetivos locais de ligação. Deste modo, com o intuito de avaliar qual o volume de metanol mais adequado para eluir a totalidade dos analitos retidos na matriz polimérica do MIP, durante a etapa de eluição, recolheram-se frações sucessivas de 1 mL deste solvente, as quais foram analisadas por HPLC-DAD. A análise dos cromatogramas obtidos mostrou que a tbz era totalmente eluída na primeira fração (1 mL), sendo que nas restantes frações não foi detetada a presença deste pesticida através da análise por HPLC-DAD.

Em suma, a otimização das várias etapas envolvidas no procedimento de extração em fase sólida, utilizando como adsorvente seletivo o tbz-tr-MIP, permitiu a implementação de uma metodologia MISPE específica para o isolamento e pré-concentração da terbutilazina, a qual foi denominada de tbz-tr-MISPE. O procedimento experimental desta metodologia pode então ser resumido da seguinte forma: 1) Acondicionamento da coluna MISPE com 5 mL de metanol e 5 mL de diclorometano; 2) Aplicação de 1 g de azeite diluída com 10 mL de diclorometano, com um fluxo de aproximadamente 0,5 gotas por segundo; 3) Remoção dos compostos interferentes (etapa de lavagem) mediante a aplicação de 2 mL de heptano, seguido de 1 mL de diclorometano, com um fluxo constante de 1 gota por segundo e 4) Eluição das moléculas de terbutilazina adsorvidas na matriz polimérica do MIP com 1 mL de

metanol e um fluxo de 0,5 gotas por segundo. As frações recolhidas durante o passo de eluição são analisadas por HPLC-DAD (Método cromatográfico 3 – secção 4.2.1.). De seguida, para testar o desempenho desta metodologia em amostras reais, procedeu-se à sua validação com amostras de azeite biológico dopado com concentrações conhecidas deste pesticida.

5.II.4. Validação da Metodologia tbz-tr-MISPE para a Detecção e Quantificação de Terbutilazina em Amostras de Azeite Dopado

Para a validação da metodologia implementada neste trabalho, foi necessária a determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, limites de deteção (LOD), limites de quantificação (LOQ), precisão, exatidão e taxas de recuperação do analito alvo.

O estudo da linearidade do método foi efetuado numa fase inicial do desenvolvimento do processo cromatográfico, mediante a construção de uma curva de calibração, utilizando uma série de soluções-padrão contendo concentrações conhecidas de terbutilazina (secção 4.3.10.) em acetonitrilo, sendo que o intervalo de concentrações foi concordante com a quantidade de pesticida esperada nas amostras de azeite dopado (0,01 - 0,07 mgL⁻¹). Em particular, o indicador de linearidade da curva analítica, ou seja, o coeficiente de correlação (R^2) foi superior a 0,999, indicando uma boa linearidade do método. Por sua vez, obtiveram-se ainda valores de LOD e LOQ para a terbutilazina de 0,002 e 0,006 mg L⁻¹, respetivamente.

Em termos gerais, a seletividade não é mais do que a capacidade que um determinado método analítico deve possuir para quantificar com exatidão o analito de interesse na presença de substâncias interferentes presentes na amostra em análise. Os compostos interferentes são essencialmente substâncias quimicamente relacionadas com o analito alvo, tais como compostos análogos, isómeros, metabolitos, produtos de degradação dos pesticidas, impurezas, entre outras substâncias que se encontram presentes na matriz. Deste modo, com o objetivo de avaliar a eventual presença de compostos interferentes, provenientes da matriz, que pudessem comprometer a determinação do pesticida alvo, foi efetuado um estudo preliminar que consistiu em aplicar 1 g de azeite biológico não dopado, diluído com 10 mL de diclorometano na coluna de extração em fase sólida que contém tbz-tr-MIP, seguida da aplicação da

metodologia tbz-tr-MISPE, sendo o extrato obtido analisado por HPLC-DAD. A observação do cromatograma relativo ao extrato obtido mediante a análise cromatográfica (Figura A2 – Anexos) provou que não existem substâncias interferentes com tempos de retenção similares ao da tbz.

Para que possam ser comercializados, os produtores de azeite têm que garantir que os seus produtos não possuem na sua composição teores de pesticidas em quantidades superiores aos limites máximos de resíduos legalmente impostos. No caso particular da terbutilazina encontra-se definido um LMR de 0,05 µg deste pesticida por grama de azeite (Regulamento (CE) n.º 149/2008). Neste contexto, inicialmente testou-se a eficiência da metodologia tbz-tr-MISPE para a extração de quantidades vestigiais de terbutilazina, presentes em amostras de azeite dopadas com uma concentração deste pesticida coincidente com o LMR, seguida da sua deteção e quantificação recorrendo a técnicas cromatográficas (HPLC-DAD). Na figura 34 apresenta-se o resultado da análise cromatográfica correspondente a este ensaio experimental.

A análise dos cromatogramas obtidos para os extratos resultantes da aplicação da metodologia tbz-tr-MISPE (Figura 34) mostrou um perfil cromatográfico idêntico entre o MIP e o NIP, contudo é notória a elevada seletividade que o tbz-tr-MIP apresenta para a terbutilazina, quando comparado com o respetivo NIP. Para além da observação dos cromatogramas, as taxas de recuperação determinadas para este pesticida (Tabela 15) também comprovaram a especificidade do MIP para reter as moléculas de tbz nos respetivos locais de ligação, dado que se obtiveram taxas de recuperação na ordem dos 92 %. Em contrapartida, o NIP possuía uma reduzida capacidade para reter as moléculas de tbz, logo nos extratos obtidos foram apenas detetadas quantidades residuais deste pesticida, cujos teores não foram quantificados, dado que se encontravam abaixo do limite de quantificação do método. Por sua vez, mediante a análise por HPLC-DAD dos extratos obtidos em cada uma das etapas do processo de extração MISPE, verificou-se que a tbz era eluída praticamente na sua totalidade durante as etapas de aplicação da amostra e remoção dos compostos interferentes (lavagem), o que foi justificado pela natureza não específica das interações formadas entre a matriz polimérica do NIP e as moléculas de terbutilazina.

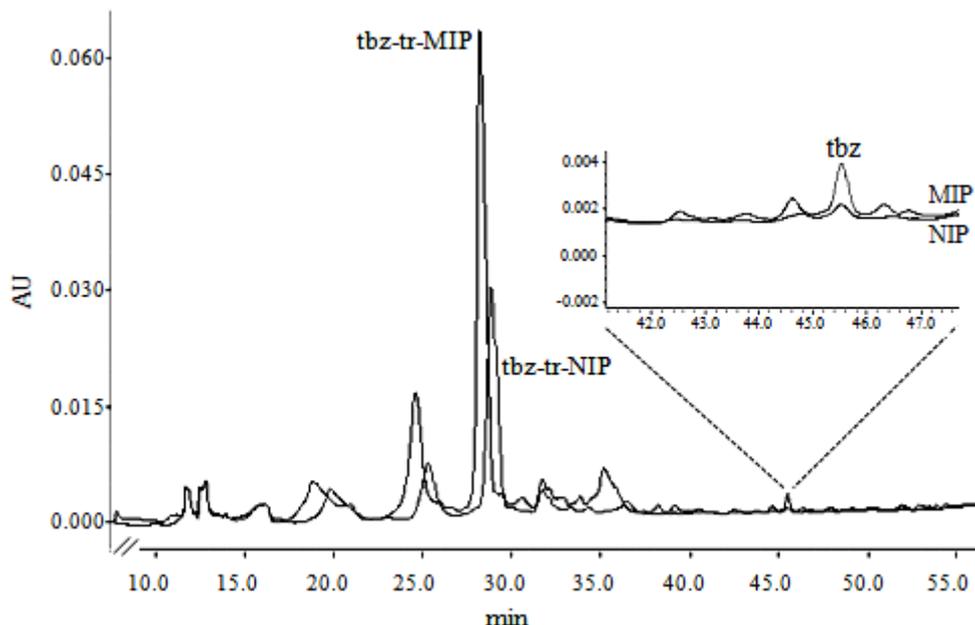


Figura 34. Cromatogramas de HPLC-DAD referentes aos extratos obtidos mediante a aplicação das metodologias de preparação de amostra tbz-tr-MIP e tbz-tr-NIP. Tempo de retenção da tbz: 45,8 min.

Por outro lado, apesar de se verificar a existência de algumas substâncias interferentes nos extratos analisados, estes compostos não influenciaram a quantificação dos teores de tbz, uma vez que aparecem a tempos de retenção muito diferenciados do tempo de retenção do analito alvo (Figura 34). Adicionalmente, a análise do espectro de UV-Vis correspondente ao pico atribuído à tbz confirmou tratar-se mesmo deste pesticida, confirmando ainda a ausência de compostos interferentes a co-eluir com o pesticida alvo.

Dada a atual conjuntura e a crescente preocupação com a segurança alimentar a que se tem vindo a assistir nos últimos anos, prevê-se que os limites máximos de resíduos de pesticidas presentes em amostras alimentares sejam cada vez mais reduzidos, a fim de assegurar a saúde dos consumidores. Deste modo, no presente estudo testou-se ainda a eficiência da metodologia tbz-tr-MISPE, para a extração seletiva de terbutilazina em amostras de azeite dopadas com uma concentração deste pesticida inferior ao LMR ($0,025 \mu\text{gg}^{-1}$). Os resultados obtidos neste estudo encontram-se detalhados na tabela 15.

Tabela 15. Precisão e exatidão da coluna tbz-tr-MISPE na extração de terbutilazina a partir de amostras de azeite dopadas com diferentes concentrações deste pesticida.

Concentração de tbz Adicionada ao Azeite ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração de tbz Adsorvida \pm SD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Taxas de Recuperação (%)
0,05 ^c	0,046 \pm 0,001	2,2	92
0,025	0,024 \pm 0,002	8,3	96

^aMédia \pm desvio padrão (SD); ^bCoefficiente de Variância (RSD); ^cConcentração de tbz correspondente ao LMR. Os ensaios foram realizados em triplicado (n = 3).

Em termos gerais, os resultados apresentados na tabela 15 demonstram que a metodologia MISPE revelou-se bastante eficaz para a extração de terbutilazina em amostras de azeite dopadas com quantidades deste pesticida inferiores ao LMR (0,025 $\mu\text{g g}^{-1}$). Por sua vez, foi também evidente uma reduzida influência da matriz durante o processo de extração, isto é, apesar da elevada complexidade que as amostras possuíam, associada às quantidades vestigiais em que o analito se encontrava presente nas mesmas, a coluna MISPE conseguia reter 0,024 μg das 0,025 μg de tbz inicialmente adicionadas ao azeite, o que se repercutiu em taxas de recuperação da ordem dos 96 %.

Os valores de RSD determinados neste ensaio indicam que os resultados apresentavam uma reduzida dispersão, o que juntamente com as elevadas taxas de recuperação alcançadas para as diferentes concentrações em estudo, permitiu concluir que a metodologia tbz-tr-MISPE possuía uma elevada precisão e exatidão.

Finalmente, com o objetivo de avaliar a capacidade de reutilização e a reprodutibilidade da coluna MISPE realizaram-se 50 extrações sucessivas mediante a aplicação da metodologia tbz-tr-MISPE, utilizando diferentes amostras de azeite dopadas com uma concentração de tbz de 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$. Entre cada extração a coluna foi regenerada com 1 ml de uma solução de metanol-ácido acético (8:2 (v/v)), seguido de 5 mL de metanol. Com a finalidade de avaliar a eficiência da etapa de regeneração, aplicou-se 1 mL de metanol à coluna MISPE, o qual foi recolhido e analisado por

HPLC-DAD, sendo que os cromatogramas obtidos permitiram confirmar a ausência de do pesticida alvo.

Em concreto, os resultados obtidos neste ensaio mostraram que a coluna MISPE possuía uma elevada reprodutibilidade, possibilitando a sua reutilização durante pelo menos 50 extrações, sem perda da especificidade para o analito alvo e com uma média de taxas de recuperação de $93 \pm 2,8$ % ($n = 50$), para concentrações de tbz coincidentes com o LMR.

Em síntese, a metodologia tbz-tr-MISPE, implementada neste trabalho de investigação, revelou-se extremamente eficiente para o isolamento e pré-concentração do analito alvo, permitindo a sua deteção e quantificação em amostras de azeite dopadas com concentrações deste pesticida iguais ao LMR e até mesmo para teores inferiores aos limites impostos pela legislação. O sucesso desta metodologia como técnica de preparação de amostras dependeu, fundamentalmente, da elevada capacidade de reconhecimento molecular do tbz-tr-MIP, aliada à sua especificidade para o pesticida em estudo. Em concreto, durante a etapa de aplicação da amostra que compreende o procedimento de extração da metodologia tbz-tr-MISPE, as moléculas de terbutilazina acedem aos locais de ligação presentes na matriz polimérica do MIP e estabelecem ligações por pontes de hidrogénio com os monómeros funcionais. Deste modo, dada a elevada estabilidade das interações formadas entre o pesticida alvo e os monómeros funcionais existentes nos locais de ligação, foi possível realizar um passo de lavagem relativamente forte, o qual se revelou eficaz na remoção de uma quantidade considerável de compostos interferentes proveniente da matriz azeite, permitindo assim minimizar o efeito de matriz.

À data da elaboração da dissertação de doutoramento, este trabalho, representa a primeira abordagem para a deteção e quantificação de resíduos de pesticidas pertencentes à classe das triazinas em amostras de azeite, mediante a utilização de polímeros de impressão molecular como materiais adsorventes de extração em fase sólida. Deste modo, não foi possível realizar uma comparação direta dos resultados obtidos neste estudo, com outros trabalhos similares disponíveis na literatura.

5.II.5. Estudos Comparativos da Metodologia tbz-tr-MISPE com os Métodos Convencionais de Preparação de Amostras e com os Cartuchos (SupelMIP™ SPE – Triazine 10)

Usualmente, os protocolos de análise de pesticidas em azeites envolvem uma prévia etapa de isolamento dos analitos de interesse a partir desta matriz, seguidos da sua separação e quantificação através de técnicas cromatográficas apropriadas. A fase de preparação da amostra é, como já foi mencionado anteriormente, uma das etapas mais críticas do processo analítico, devido, essencialmente, à grande variedade de fatores que condicionam o processo extrativo, tais como a complexidade da matriz, a presença de elevadas quantidades de substâncias com caráter lipídico às quais podem estar ligados os pesticidas alvo, e as reduzidas concentrações em que os analitos se encontram frequentemente presentes nas amostras (Gilbert-López *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas tem-se vindo a assistir ao desenvolvimento de inúmeras técnicas de preparação de amostras, as quais têm como objetivo ultrapassar as limitações que se encontram vulgarmente associadas à determinação de pesticidas em amostras alimentares complexas. De todas as técnicas até então utilizadas para a extração de pesticidas em matrizes vegetais com elevado teor em gordura, uma das estratégias mais frequentemente utilizada é a extração líquido-líquido, seguida de uma etapa de limpeza por SPE (Picó *et al.*, 2007).

Neste contexto, com a finalidade de aferir o sucesso da metodologia desenvolvida no presente trabalho foram realizados estudos comparativos da eficiência de extração da metodologia tbz-tr-MISPE com a dos cartuchos convencionais de SPE (C₁₈) disponíveis comercialmente. Por forma a concretizar este objetivo, aplicou-se uma metodologia analítica desenvolvida por Bakas e seus colaboradores (Bakas *et al.*, 2012), a qual compreendeu o prévio isolamento das moléculas de tbz presentes na matriz azeite utilizando a extração líquido-líquido, seguido da purificação das frações obtidas através da extração em fase sólida, mediante a utilização de cartuchos C₁₈, daí a designação de LLE - C₁₈. O procedimento experimental utilizado na realização deste estudo encontra-se sucintamente descrito na secção 4.3.6.. A inerente complexidade química associada à matriz azeite que advém, fundamentalmente, da presença de um elevado número de substâncias de natureza lipídica que muitas vezes co-eluem com o analito alvo,

justificam a utilização de uma etapa prévia no procedimento experimental envolvendo a LLE, de forma que os extratos ao serem aplicado no cartucho C₁₈ já apresentem uma menor quantidade de compostos interferentes, de modo a tentar contornar a limitação associada à ausência de seletividade dos adsorventes C₁₈ e a garantir uma maior recuperação da tbz. Uma vez finalizado o passo de pré-concentração do analito (através do uso de dois ciclos de extração LLE) e eliminação de alguns compostos interferentes, realizou-se a etapa de purificação através do recurso a SPE.

A análise do extrato obtido por HPLC-DAD evidenciou que ao tempo de retenção da terbutilazina existe um pico cromatográfico, cuja análise por espectrometria de UV-Vis revela a presença de substâncias interferentes a co-eluir com o analito alvo (Figura 35 - B), o que automaticamente inviabilizou a sua exata detecção e quantificação, tornando impossível o cálculo da taxa de recuperação deste pesticida.

Na tentativa de obter uma eficiente separação cromatográfica entre o analito de interesse e os restantes compostos interferentes presentes no extrato foram efetuadas diversas modificações a alguns parâmetros do método cromatográfico, nomeadamente o fluxo, os passos do gradiente (percentagens dos solventes e duração) e, foi monitorizado, de que forma essas variáveis influenciavam o fenómeno da co-eluição, mediante a utilização de HPLC-DAD. No entanto, apesar de todos os esforços desenvolvidos não foi possível obter um método cromatográfico que permitisse obter uma eficiente separação cromatográfica entre o pico da tbz e os compostos interferentes, pelo que não se revelou possível a quantificação da tbz presente no extrato.

É de salientar que a LLE possui uma reduzida eficiência para a extração de pesticidas polares, pelo que o seu uso pode conduzir a taxas de recuperação relativamente reduzidas. Por outro lado, a elevada quantidade de solventes orgânicos que são necessários para executar a extração e a dificuldade de automatização constituem as principais desvantagens desta metodologia (Picó *et al.*, 2007).

A comparação dos cromatogramas referentes aos extratos obtidos mediante a utilização da metodologia LLE - C₁₈ (Figura 35 - B), com os alcançados através da metodologia tbz-tr-MISPE (Figura 35 - A), permitiu observar que as colunas MISPE apresentavam uma elevada capacidade de reconhecimento molecular para as moléculas de tbz, possibilitando uma seletiva e eficiente separação do analito alvo dos restantes

compostos interferentes constituintes da matriz azeite, sem a necessidade de realizar uma etapa prévia de extração. A identificação da terbutilazina foi executada pela comparação do tempo de retenção do pico cromatográfico bem como do espectro de UV-Vis correspondente, com os do respetivo padrão. Em concreto, no cromatograma de HPLC-DAD do extrato obtido por aplicação da metodologia tbz-tr-MISPE, a análise do espectro de UV-Vis relativo ao pico da tbz, confirmou ainda a ausência de fenómenos de co-eluição, o que conseqüentemente permitiu a determinação exata dos teores do pesticida em análise. Podem ainda inferir-se destes ensaios que a metodologia MISPE, quando comparada com os cartuchos convencionais C₁₈, possuía uma excelente capacidade para extrair as moléculas de terbutilazina presentes em amostras de azeite, dopadas com uma concentração deste pesticida similar ao LMR, permitindo atingir taxas de recuperação superiores a 90 %.

Adicionalmente, é de realçar que os extratos obtidos mediante a metodologia LLE - C₁₈ possuem enormes quantidades de substâncias interferentes (Figura 35 - B). Esta evidência foi justificada pela elevada capacidade que a extração LLE possui para extrair compostos de natureza apolar (Picó *et al.*, 2007) e, ainda pela reduzida seletividade que os cartuchos C₁₈ possuíam para o pesticida alvo.

Os resultados deste estudo estão de acordo com os mencionados num trabalho de investigação similar, desenvolvido por Ferrer e seus colaboradores (Ferrer *et al.*, 2000). Neste trabalho, os investigadores testaram a eficiência da coluna MISPE, mediante a sua comparação com cartuchos C₁₈, na extração de diferentes pesticidas, pertencentes à classe das triazinas, presentes em amostras de água subterrânea. Como resultados deste ensaio observaram que a aplicação de polímeros de impressão molecular na extração em fase sólida revelou-se uma técnica bastante vantajosa, quando comparada com os convencionais cartuchos C₁₈, pois a sua especificidade para os pesticidas selecionados, permitiu a obtenção de extratos com menores teores de compostos interferentes.

Face às limitações que os sistemas de extração convencionais apresentavam na extração de pesticidas de matrizes alimentares complexas, em 2003, Anastassiades e os seus colaboradores introduziram um novo procedimento de preparação de amostras, denominado de QuEChERS. Desde então, este método tem sido amplamente utilizado na deteção de resíduos de pesticidas em diferentes matrizes vegetais altamente complexas, tais como as azeitonas e o azeite (Gilbert-López *et al.*, 2009).

De um modo geral, o desenvolvimento do método QuEChERS baseia-se na tentativa de reunir numa única etapa de extração, as vantagens da técnica LLE com as dos sistemas que fazem uso de fases sólidas, de que são exemplo o MSPD e o SPE. Para além de proporcionar a obtenção de extratos com menores teores de substâncias interferentes, quando comparados com o processo de extração convencional, esta metodologia possibilita a determinação dos analitos de interesse com elevadas taxas de recuperação (García-Reyes *et al.*, 2007). Deste modo, atendendo às vantagens que esta técnica apresentava, no presente trabalho realizaram-se ainda alguns estudos comparativos entre a metodologia tbz-tr-MISPE e o método QuEChERS.

Com a finalidade de concretizar este objetivo, procedeu-se à aplicação da metodologia QuEChERS para a extração de terbutilazina presente em amostras de azeite, às quais foram previamente adicionadas concentrações de $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ deste pesticida. O protocolo experimental utilizado durante a realização deste ensaio encontra-se detalhadamente descrito na secção 4.3.7.. Adicionalmente, os extratos finais obtidos após o processo de extração foram analisados por HPLC-DAD, sendo que o perfil cromatográfico obtido encontra-se apresentado na figura 35 (C).

A análise do perfil cromatográfico referente aos extratos obtidos mediante a utilização da metodologia QuEChERS (Figura 35 - C) permitiu verificar que esta metodologia de preparação de amostras originou elevadas taxas de recuperação do pesticida alvo ($100 \pm 6,1 \%$), no entanto deu origem a extratos com um elevado teor em compostos interferentes, provenientes da matriz azeite. Estes resultados estão de acordo com os obtidos num estudo realizado por Chamkasem e Harmon (Chamkasem e Harmon, 2014). Porém, de acordo com os reduzidos teores em que este composto se encontrava presente no extrato analisado e, atendendo ao correspondente espectro de UV-Vis do pico cromatográfico, não é possível garantir a ausência de fenómenos de co-eluição entre a terbutilazina e eventuais substâncias interferentes. Por outro lado, convém ressaltar que este método, quando comparado com a metodologia tbz-tr-MISPE, tem como limitações o facto de ser uma técnica relativamente morosa, que compreende um elevado manuseamento da amostra, nomeadamente inúmeras operações de pesagem e centrifugações, o que conseqüentemente pode causar perdas do analito alvo durante a sua execução.

Finalmente, à data da realização deste trabalho experimental, existiam disponíveis comercialmente cartuchos MISPE seletivos para a classe das triazinas (SupelMIPTM SPE – Triazine 10), os quais, tal como o próprio nome sugere, foram exclusivamente desenvolvidos para a extração/ pré-concentração de 10 pesticidas pertencentes à classe das triazinas de amostras de água. Apesar da terbutilazina não se encontrar contemplada no grupo de substâncias para as quais esta metodologia foi delineada, decidiu-se aplicar os cartuchos SupelMIPTM SPE – Triazine 10 na extração deste pesticida a partir de amostras de azeite dopado, com o objetivo de comparar esta metodologia baseada em sistemas de impressão molecular disponível comercialmente com a implementada neste trabalho (tbz-tr-MISPE). Assim, procedeu-se à avaliação da sua eficiência e seletividade no isolamento/ pré-concentração de terbutilazina em amostras de azeite dopadas com uma concentração de 0,05 µg⁻¹ deste pesticida. A escolha desta concentração é fundamentada pelo facto de esta corresponder ao LMR para a tbz na matriz azeite.

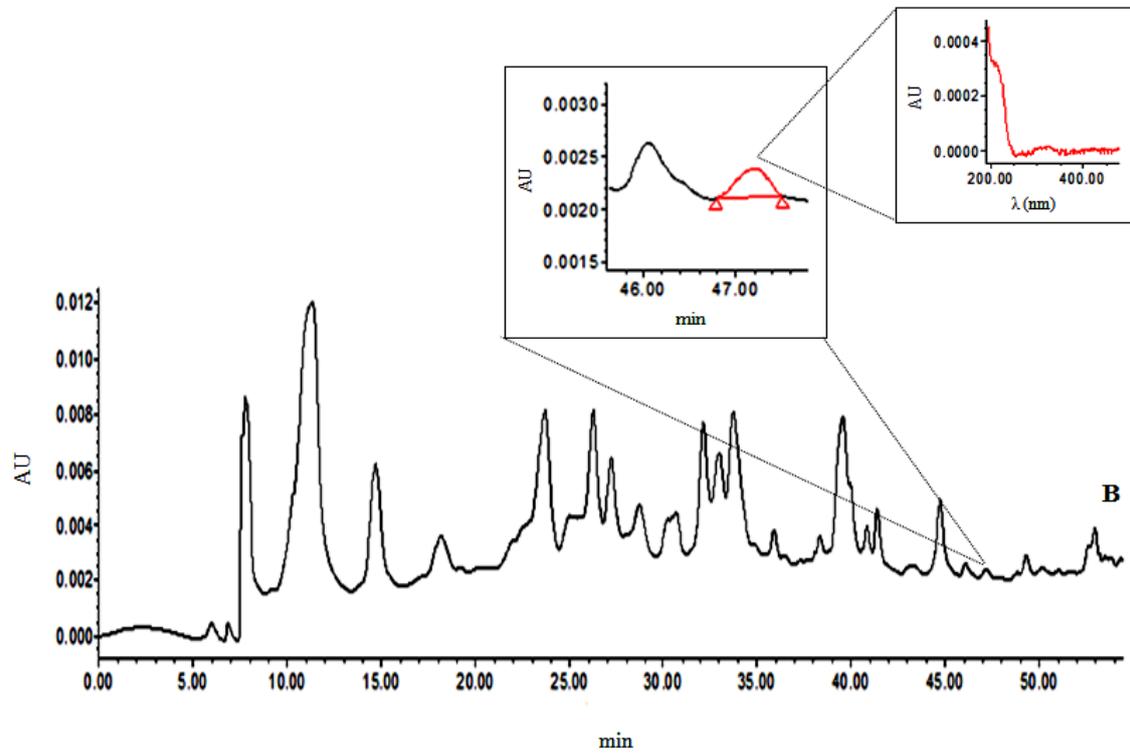
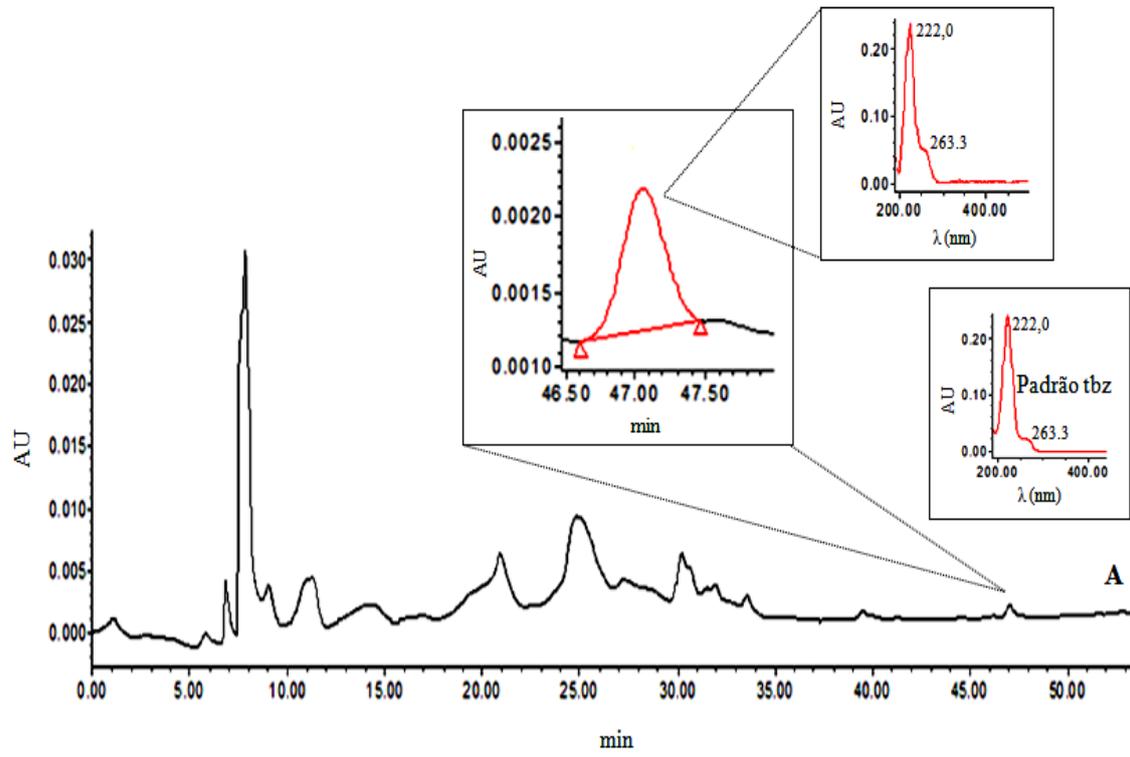
Dado que o procedimento geral de extração desenvolvido para os cartuchos MISPE comerciais (SupelMIPTM SPE – Triazine 10) encontra-se vocacionado para a análise de águas não sendo previsivelmente o mais adequado para aplicação a amostras de azeite, foi necessário executar uma prévia otimização das diferentes condições envolvidas em cada uma das etapas do processo de extração em fase sólida (acondicionamento, aplicação de amostra, lavagem e eluição). Assim, no procedimento de extração originalmente estabelecido para os cartuchos MISPE comerciais, na etapa de aplicação de amostra, as amostras de água a analisar eram diretamente aplicadas às colunas MISPE, sem recorrer a qualquer tipo de diluição. Contudo, no caso particular do azeite, dada a sua complexidade não foi possível a aplicação direta de uma toma da amostra às colunas MISPE, tendo-se selecionado o diclorometano como solvente de modo a permitir a sua solubilização e posterior aplicação no passo do carregamento da amostra. Por outro lado, este solvente revelou-se bastante eficiente uma vez que origina uma elevada retenção das moléculas de tbz na matriz polimérica da fase adsorvente. Atendendo a que a natureza do solvente utilizado no passo da aplicação da amostra tem efeito na performance da coluna MISPE, foi necessário adequar os solventes usados nas restantes etapas do processo de extração a fim de obter uma maior eficiência extrativa. De seguida, após a implementação desta nova metodologia, procedeu-se à sua aplicação

a amostras de azeite, de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 4.3.8..

Na figura 35 (D) encontra-se representado o cromatograma de HPLC-DAD dos extratos resultantes da aplicação da metodologia SupelMIP™ SPE – Triazine 10, após a sua aplicação a amostras de azeite dopado ($0,05 \mu\text{g g}^{-1}$).

A observação da figura 35 (D) evidenciou que os cartuchos MISPE comerciais revelaram-se bastante eficientes e seletivos na separação da tbz dos restantes compostos interferentes, permitindo a obtenção de extratos relativamente limpos. Apesar de a terbutilazina não ser mencionada na lista de pesticidas para os quais estes cartuchos possuíam especificidade, o facto deste composto apresentar um estrutura química similar à dos restantes pesticidas, permitiu que as moléculas de tbz fossem seletivamente adsorvidas nos locais de ligação existentes na matriz polimérica do cartucho MISPE. Em concreto esta metodologia originou recuperações na ordem dos $88,2 \pm 2,7 \%$, os quais estão de acordo com a informação disponível na ficha técnica deste produto, que menciona taxas de recuperação superiores a 80 %.

Adicionalmente, neste trabalho estudou-se também a eventual capacidade de regeneração e reutilização dos cartuchos MISPE comerciais SupelMIP™ SPE – Triazine 10, porém, dado que esta característica não era referida no protocolo de utilização, usou-se o mesmo processo de regeneração desenvolvido para a coluna tbz-tr-MISPE, o qual consistia na adição de 1 ml de uma solução de metanol-ácido acético (8:2 (v/v)), seguido de 5 mL de metanol. Como resultados confirmou-se que os cartuchos MISPE comerciais perdiam a capacidade de reconhecimento molecular para a terbutilazina ao longo das sucessivas utilizações, sendo que as taxas de recuperação diminuiriam drasticamente para $29 \pm 3,2 \%$ após a primeira utilização.



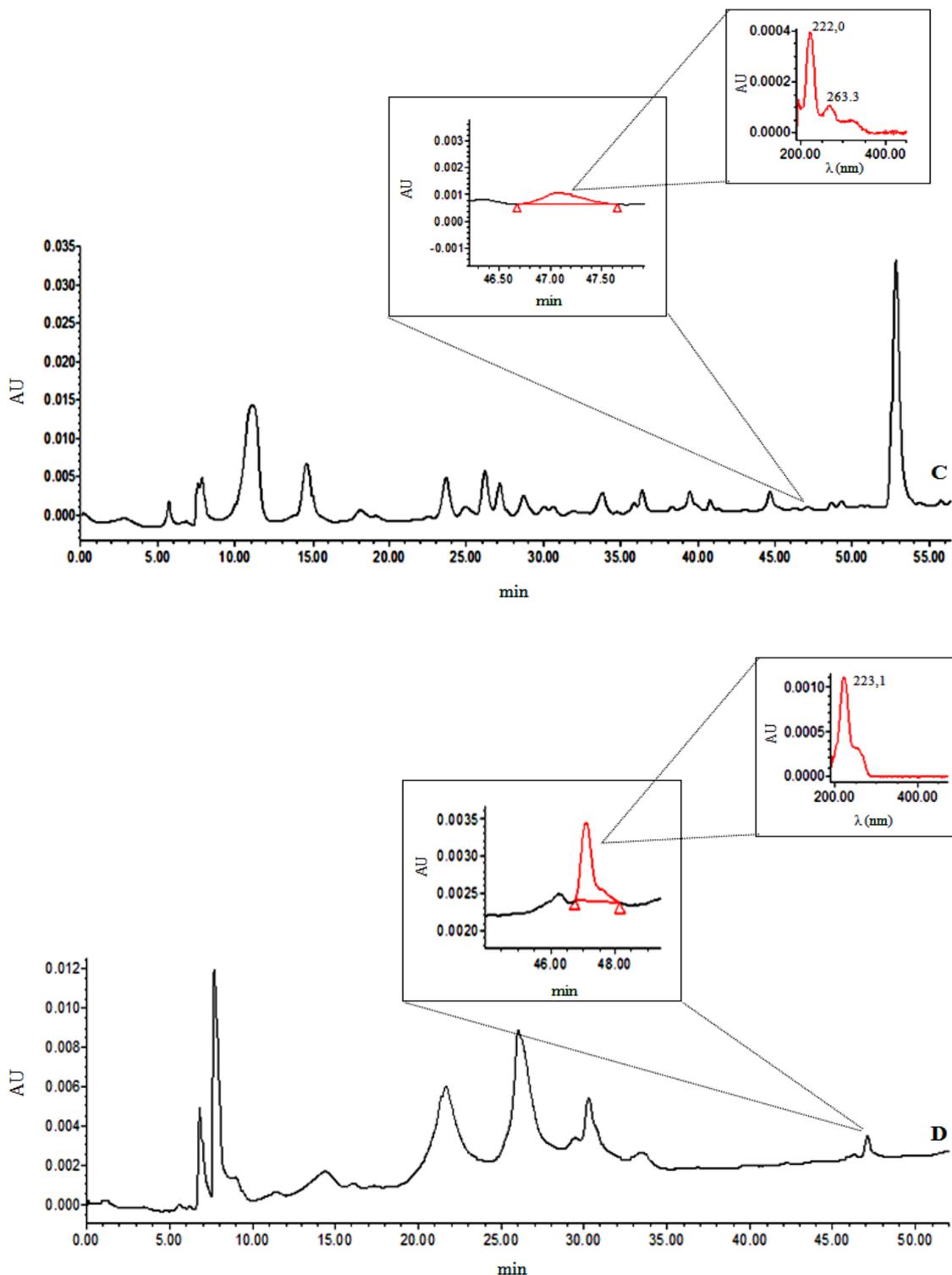


Figura 35. Cromatogramas de HPLC-DAD dos extratos obtidos com a metodologia tbz-tr-MISPE (A), LLE – cartucho C₁₈ (B), metodologia QuEChERS (C) e cartucho comercial para a classe das triazinas (D). Nos cromatogramas são apresentadas as ampliações do pico correspondente à tbz e os respectivos espectros UV-Vis (220 nm), bem como o espectro UV-Vis referente ao padrão de tbz.

Em suma, a metodologia MISPE revelou-se uma técnica de preparação de amostras de fácil aplicação, rápida, precisa e que requer um reduzido manuseamento das amostras. Por sua vez, é de salientar que permite a obtenção de extratos relativamente limpos e elevadas taxas de recuperações do pesticida alvo, mesmo quando este se encontra presente em quantidades vestigiais (inferiores ao LMR) em amostras extremamente complexas, como é o caso particular do azeite. Adicionalmente, a possibilidade de reutilização destes materiais adsorventes poliméricos (pelo menos 50 utilizações), associada à elevada estabilidade durante longos períodos de armazenamento à temperatura ambiente, mantendo a elevada especificidade para o analito alvo, torna esta metodologia economicamente rentável relativamente às tradicionais técnicas de preparação de amostra testadas neste trabalho. Por último, a metodologia tbz-tr-MISPE demonstrou uma elevada especificidade para o pesticida alvo, a qual foi induzida durante o processo de síntese do MIP, pela formação de locais de ligação complementares em tamanho e forma para o analito alvo, permitindo assim o reconhecimento seletivo das moléculas de terbutilazina, minimizando o efeito de matriz e a existência de substâncias interferentes que eventualmente poderiam danificar o sistema cromatográfico.

5.II.6. Aplicação da Metodologia tbz-tr-MISPE para a Detecção e Quantificação de Terbutilazina em Diferentes Azeites Comerciais

De um modo geral, o uso de herbicidas no olival é uma prática frequente que tem como finalidade combater as ervas daninhas (infestantes) que competem diretamente pela água e nutrientes disponíveis no solo. De modo a obter uma melhor eficácia durante a utilização destes pesticidas, sem por em causa a própria cultura é fundamental uma adequada seleção do herbicida, a qual deve ser realizada com base no tipo de infestantes que se pretende controlar, na idade do olival, no teor de água existente no solo, na natureza do solo e no declive (Silva, 2007). Por outro lado, com a finalidade de alcançar uma maior eficácia do herbicida é importante tomar em consideração o modo e as condições de aplicação, nomeadamente a época de aplicação, as doses e o volume de calda a aplicar por hectare.

A terbutilazina é um herbicida pertencente à classe das triazinas que apresenta uma ação residual, quanto ao seu mecanismo de penetração é classificado como um

pesticida de ação sistémica, usado para o controlo de diferentes infestantes, ao inibir a sua taxa fotossintética (WHO, 1998). Este pesticida tem um largo espectro de ação sobre diferentes dicotiledóneas anuais e vivazes, gramíneas anuais e algumas gramíneas vivazes (Silva, 2007).

Neste contexto, a metodologia tbz-tr-MISPE, implementada no atual trabalho de investigação, foi utilizada para determinar a eventual presença de resíduos de terbutilazina num conjunto de amostras de azeites comerciais produzidos em diferentes regiões de Portugal (Alentejo, Trás-os-Montes e Beiras). A pesquisa de tbz nas amostras de azeite anteriormente referidas foi efetuada mediante a aplicação da metodologia tbz-tr-MISPE, de acordo com o procedimento experimental que se encontra sucintamente descrito na secção 4.3.9..

De acordo com os resultados obtidos, após a realização deste estudo foi possível concluir que de todas as amostras de azeite analisadas, apenas foi detetada a presença de terbutilazina nas amostras referentes a um dos produtores pertencentes à região Alentejo, sendo que os resíduos deste pesticida foram detetados nas três garrafas pertencentes ao mesmo lote, bem como nas três repetições realizadas para cada garrafa. Após a identificação do pesticida alvo nas amostras em estudo, procedeu-se à quantificação dos seus teores, o que permitiu verificar que este se encontrava presente no azeite em teores inferiores ao LMR, com concentrações de $0,034 \pm 0,003 \mu\text{gg}^{-1}$.

A terbutilazina é um herbicida que fundamentalmente é aplicado ao solo, sendo absorvido sobretudo pela via radicular das plantas e, posteriormente translocado pelo xilema para todos os tecidos vegetais, onde exerce a sua ação fitotóxica. Deste modo, é fácil de perceber que este composto pode também ser adsorvido pelas raízes das oliveiras e transportado para os diferentes órgãos da planta (tronco, ramos, folhas e frutos), nos quais pode permanecer depositado na forma de reservas durante longos períodos de tempo. Este fenómeno pode justificar a presença de terbutilazina nas amostras pertencentes a um dos produtores estudados neste trabalho.

III

Polímeros Molecularmente Impressos Seletivos para a Deltametrina: Aplicação como Adsorvente na Extração em Fase Sólida para a sua Detecção e Quantificação em Azeite

A maioria dos resultados apresentados nesta secção foram publicados no formato de artigo científico nas seguintes revistas internacionais com arbitragem científica: Martins N., Carreiro E. P., Locati A., Ramalho J. P. P., Cabrita M. J., Burke A. J., Garcia R. (2015) Journal of Chromatography A, 1409,1-10.

5.III.1.Avaliação da Capacidade de Reconhecimento Molecular

5.III.1.1.Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE

O desenvolvimento de estratégias alternativas que possibilitem, de modo seletivo, extrair pesticidas presentes em quantidades vestigiais a partir de uma matriz de elevada complexidade como a matriz azeite, evitando todas as desvantagens associadas às técnicas convencionais de preparação de amostra, é uma tarefa de extrema relevância, dado que se esta for associada a uma técnica cromatográfica para a sua deteção e quantificação, permite garantir a segurança alimentar dos consumidores. Neste contexto, com a finalidade de desenvolver uma metodologia analítica seletiva para o isolamento/pré-concentração e, posterior, quantificação de deltametrina a partir de amostras de azeite, recorreu-se ao “design” e desenvolvimento de sistemas de impressão molecular cuja capacidade de reconhecimento molecular foi pré-definida para este analito alvo, seguida da aplicação destes sistemas de impressão molecular, como adsorventes seletivos na extração em fase sólida.

De modo a atingir este objetivo, a equipa responsável pela tarefa específica de produção dos polímeros molecularmente impressos sintetizou dois MIPs diferentes (dn-tr-MIP-1 e dn-tr-MIP-2), mediante a técnica de polimerização via bulk pela ação térmica (60 °C), utilizando a deltametrina como molécula molde, como monómeros funcionais usaram-se o MAA (dn-tr-MIP-1) e a AM (dn-tr-MIP-2), o EGDMA como agente de ligação cruzada, o AIBN como iniciador radicalar e o diclorometano como solvente porogénico, de acordo com a razão estequiométrica de 1:1,9:4:20 (T:I:M:A). Após o processo de síntese, os MIPs foram previamente triturados, moídos e peneirados, a fim de obter partículas de tamanhos adequados (63-125 µm). De seguida, de modo a remover as moléculas moldes localizadas no locais de ligação, as partículas foram lavadas num extrator de Soxhlet, utilizando uma solução de metanol e ácido acético (1:1, (v/v)) e, finalmente para eliminar os resíduos de ácido acético realizou-se uma lavagem com metanol. Os respetivos NIPs foram sintetizados reproduzindo o mesmo procedimento embora na ausência da molécula molde.

Com a finalidade de estudar a aplicabilidade deste materiais poliméricos como adsorventes de SPE, procedeu-se à avaliação da sua capacidade de reconhecimento

molecular de acordo com o procedimento experimental que se encontra descrito na secção 4.3.2. (iii - Estudos de Reconhecimento Molecular por SPE).

A análise dos cromatogramas referentes a cada um dos extratos obtidos nas várias etapas do processo de extração MISPE permitiu avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos MIPs em estudo através da determinação da quantidade de deltametrina retida nos diferentes sistemas de impressão molecular em estudo e do cálculo dos fatores de impressão de cada MIP (Tabela 16).

Tabela 16. Capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular dn-tr-MIP-1/ dn-tr-NIP-1 e dn-tr-MIP-2/ dn-tr-NIP-2 para a deltametrina.

Sistemas de Impressão Molecular	Quantidade de dn Adsorvida \pm SD^a (mg)	IF \pm SD^b
dn-tr-MIP-1	0,28 \pm 0,01	2,00 \pm 0,10
dn-tr-NIP-1	0,140 \pm 0,005	
dn-tr-MIP-2	0,930 \pm 0,007	4,65 \pm 0,01
dn-tr-NIP-2	0,20 \pm 0,01	

^aMédia \pm desvio padrão (SD); ^bfator de impressão \pm desvio padrão (SD); IF (fator de impressão) = quantidade de dn adsorvida no MIP/ quantidade de dn adsorvida no NIP.

Em termos gerais, pela análise dos resultados apresentados na tabela 16 constata-se que os MIPs possuem uma capacidade de reconhecimento molecular superior à dos respetivos NIPs, refletindo-se no facto de que a quantidade de deltametrina retida no polímero ser superior para os sistemas MIPs. Por sua vez, comparando os dois MIPs em estudo é evidente que o MIP sintetizado com acrilamida como monómero funcional (dn-tr-MIP-2) apresenta uma maior apetência para o reconhecimento do pesticida alvo, dado que das 1,0 mg de deltametrina aplicadas à coluna durante o processo de extração 0,93 mg ficavam seletivamente retidas na matriz polimérica do MIP. Em contrapartida, como seria previsível, o correspondente NIP apenas conseguiu adsorver 0,20 mg de dn. Estes resultados sugerem a existência de

locais de ligação específicos para a deltametrina, os quais foram formados durante o processo de síntese dos polímeros de impressão molecular. Por outro lado, a análise dos fatores de impressão determinados para cada MIP permitiram corroborar os resultados anteriormente referidos, dado que o dn-tr-MIP-2 possuía valores de IF 2,3 vezes superiores aos do dn-tr-MIP-1, comprovando assim a elevada capacidade para reter seletivamente as moléculas de deltametrina.

A utilização do monómero funcional acrilamida durante a etapa de síntese do dn-tr-MIP-2 promoveu um significativo mecanismo de impressão e, conseqüentemente a formação de locais de ligação capazes de reconhecer e reter seletivamente a deltametrina. Esta evidência é justificada pela potencial capacidade que as moléculas de AM possuem para estabelecer interações por pontes de hidrogénio, ligações dipolo-dipolo e interações π - π com as moléculas de deltametrina, formando complexos estáveis entre as moléculas molde e os monómeros funcionais durante a etapa de pré-polymerização. Deste modo, dado o efeito de memória que estes materiais apresentam, quando em presença de amostras contendo as moléculas de dn, estas são seletivamente retidas nos locais de ligação dos sistemas de impressão molecular, devido ao estabelecimento de interações entre a AM e o analito alvo (Figura 36).

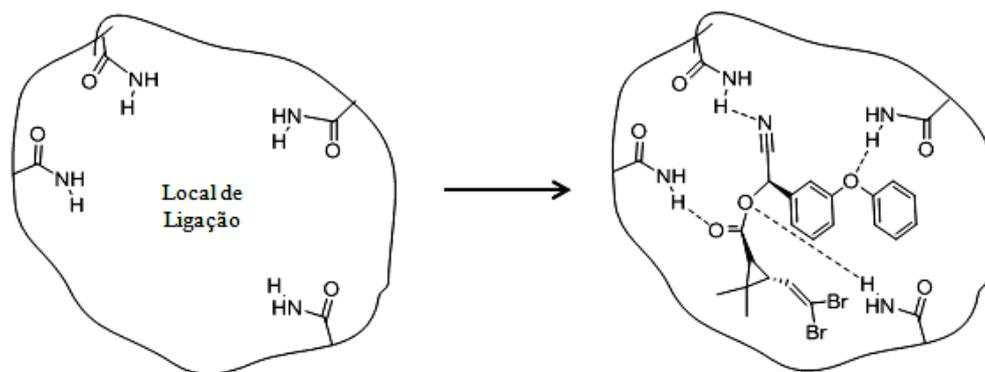


Figura 36. Representação esquemática das interações estabelecidas entre a AM e as moléculas de deltametrina nos ensaios de reconhecimento molecular, mediante a formação de ligações por pontes de hidrogénio nos locais de ligação existente no material polimérico.

Dado que a morfologia deste tipo de materiais poliméricos condiciona a sua capacidade de reconhecimento molecular tentou-se correlacionar a estrutura

morfológica dos polímeros (Figura 37), a qual foi obtida através de microscopia eletrônica de varrimento (SEM), com os dados dos ensaios de adsorção para estes sistemas de impressão molecular sumarizados na tabela 16.

Como exemplificado na figura 37 para o sistema de impressão molecular dn-tr-MIP-2/ dn-tr-NIP-2 é notório, através da análise das micrografias obtidas, que o MIP (Figura 37 - a) apresenta uma superfície heterogênea, constituída por micropartículas, aproximadamente esféricas, que formam agregados de tamanhos e formas irregulares. A natureza porosa e a área superficial do MIP resulta da presença de inúmeros espaços vazios, localizados entre os agregados de partículas, de espaços intersticiais de um dado grupo de partículas, ou até mesmo dentro das próprias partículas que se formam durante a etapa de síntese (Spivak, 2005). Deste modo, a elevada porosidade que o MIP apresenta, para além de evidenciar a existência de um grande número de cavidades, permite um melhor acesso da deltametrina aos locais de ligação existentes na matriz polimérica do MIP, o que conseqüentemente se traduz numa elevada capacidade para o reconhecimento molecular do pesticida alvo. Por sua vez, a micrografia obtida para o NIP (Figura 37 - b) possuía uma aparência mais homogênea e compacta, a qual parece indicar a ausência de locais de ligação neste material polimérico.

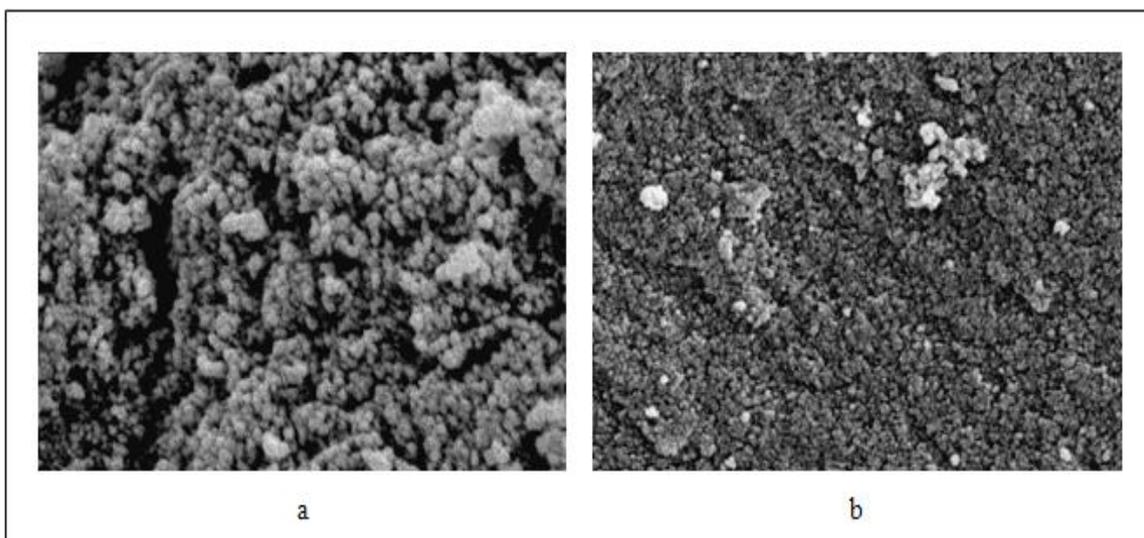


Figura 37. Imagens obtidas por SEM do a) dn-tr-MIP-2 e b) correspondente NIP.

A análise dos dados obtidos, que englobaram duas vertentes – por um lado, a avaliação de capacidade de reconhecimento molecular dos sistemas de impressão molecular e, por outro, a sua caracterização morfológica, evidenciou que, de entre os

materiais poliméricos em estudo, o dn-tr-MIP-2 mostrou-se como o mais promissor para a posterior aplicação como adsorvente seletivo para a extração em fase sólida (MISPE).

5.III.2. Estudos de Seletividade do dn-tr-MIP-2 para a deltametrina

A implementação de uma metodologia seletiva de preparação de amostra que visa o isolamento/ pré-concentração da deltametrina presente em quantidades vestigiais na matriz azeite pressupõe que o polímero molecularmente impresso utilizado como adsorvente seletivo na extração em fase sólida apresente uma elevada seletividade e especificidade para o pesticida alvo. De modo a avaliar esta característica, a qual é preponderante para o desenvolvimento da metodologia MISPE, procedeu-se à realização de estudos de seletividade do dn-tr-MIP-2 face a alguns análogos estruturais da deltametrina, tais como a λ -cialotrina, fenpropatrina e fenotrina (Figura 38), os quais permitiram inferir a ocorrência de seletividade cruzada.

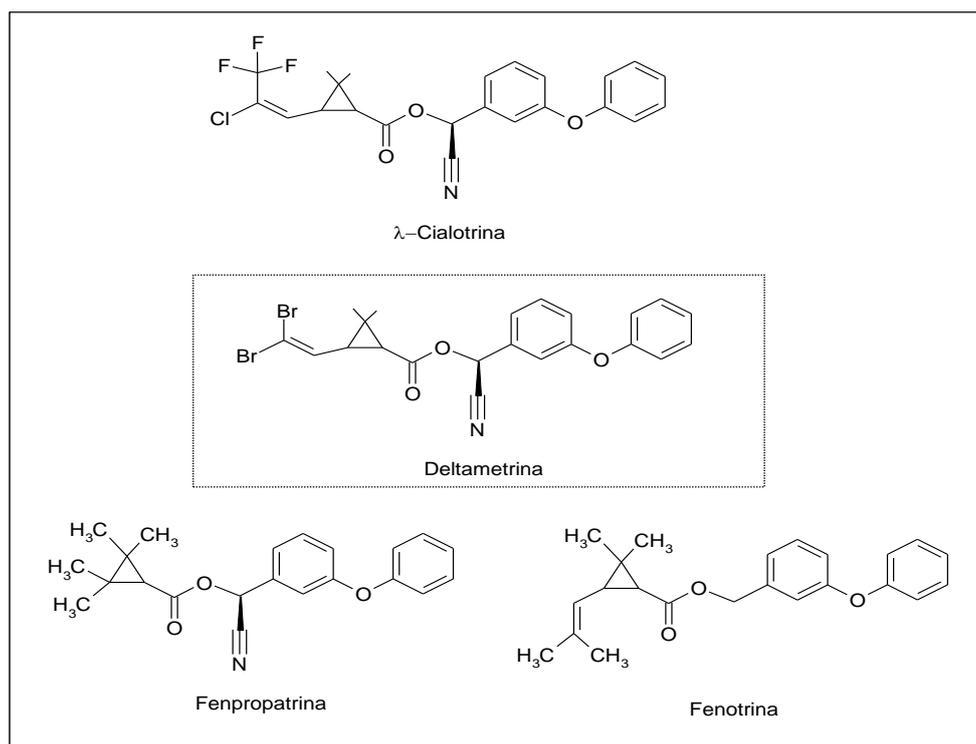


Figura 38. Estruturas químicas da deltametrina e dos diferentes compostos análogos pertencentes à classe dos piretróides, em estudo neste trabalho.

Os dados experimentais resultantes deste estudo, nomeadamente as taxas de recuperação de cada pesticida para os diferentes sistemas de impressão molecular (MIP/

NIP), a quantidade de pesticida adsorvido por grama de polímero, bem como o fator de seletividade, encontram-se indicados na tabela 17.

Tabela 17. Taxas de recuperação, capacidade de adsorção e fatores de seletividade referentes a cada pesticida, relativamente ao dn-tr-MIP-2 e correspondente NIP.

Pesticidas	Taxas de Recuperação \pm SD ^a (%)		Q (μgg^{-1})		α^b
	MIP	NIP	MIP	NIP	
Deltametrina	94,0 \pm 0,7	20,0 \pm 0,1	20,0 \pm 0,8	6,0 \pm 0,02	3,3 \pm 0,15
λ -cialotrina	55,0 \pm 2,1	11,0 \pm 0,1	10,0 \pm 0,9	2,0 \pm 0,05	5,0 \pm 0,5
Fenpropratrina	67,0 \pm 0,7	9,3 \pm 0,2	13,0 \pm 1,1	2,0 \pm 0,01	6,5 \pm 0,5
Fenotrina	10,0 \pm 1,4	2,0 \pm 0,1	2,0 \pm 0,02	0,4 \pm 0,006	5,0 \pm 0,09

^aMédia \pm desvio padrão (SD); ^bfator de seletividade: $\alpha = Q_{\text{MIP}} / Q_{\text{NIP}}$, Q_{MIP} e Q_{NIP} correspondem à capacidade de ligação da dn e dos respectivos análogos para o dn-tr-MIP-2 e correspondente NIP, respetivamente.

De acordo com a informação apresentada na tabela 17, apesar do valor referente ao fator de seletividade para a deltametrina ser inferior ao dos compostos estruturalmente análogos, os valores das taxas de recuperação bem como de Q revelaram que o dn-tr-MIP-2 possui uma elevada seletividade para as moléculas de deltametrina. Em concreto, os elevados valores de α obtidos para os compostos homólogos deveu-se ao facto de existir uma grande diferença entre a quantidade de pesticida adsorvido no MIP comparativamente à adsorvida pelo correspondente NIP. Adicionalmente verificou-se que o MIP exibia uma moderada capacidade para reter a fenpropratrina (TR = 67,0 %) e a λ -cialotrina (TR = 55,0 %), quando comparados com a deltametrina (TR = 94 %), o que muito provavelmente se deve ao facto de estes análogos apresentarem uma estrutura similar à da deltametrina (Figura38). Por sua vez, o MIP apresentou uma reduzida capacidade para reter na sua matriz polimérica as moléculas de fenotrina (TR = 10,0 %). E por último, a realização deste estudo

confirmou ainda que o MIP possui uma capacidade de reconhecimento molecular superior ao respetivo NIP para todos os pesticidas em análise, o que sugere a presença de locais de ligação específica na estrutura tridimensional do MIP, permitindo reter as moléculas de deltametrina com uma elevada seletividade, mesmo na presença de compostos estruturalmente análogos.

Na literatura é mencionado um trabalho similar ao realizado no presente ensaio (Shi *et al.*, 2012), no qual a equipa de investigação desenvolveu um polímero molecularmente impresso utilizando as mesmas condições de síntese aplicadas na produção do dn-tr-MIP-2, à exceção da aplicação do MAA como monómero funcional. Os ensaios de seletividade desenvolvidos por estes investigadores mostraram que o MIP sintetizado com deltametrina como molécula molde possuía uma elevada capacidade para reter este analito, assim como algumas substâncias homólogas estruturalmente, com taxas de recuperação superiores a 80%, evidenciando uma baixa especificidade para a deltametrina. Assim, estes resultados parecem sugerir que a acrilamida, usada como monómero funcional na síntese do dn-tr-MIP-2, conduziu a um incremento na especificidade do sistema de impressão molecular, tornando-o altamente seletivo para a retenção do pesticida alvo.

Os resultados obtidos neste ensaio foram ainda corroborados com os alcançados num estudo levado a cabo por Xu e seus colaboradores (Xu *et al.*, 2013), no qual testaram a seletividade de dois MIPs sintetizados pela técnica de polimerização via *bulk* utilizando a deltametrina como molécula molde, o dimetilsulfóxido como solvente porogénico e o tolueno 2,4-diisocianato como agente de ligação cruzada, sendo que os dois sistemas de impressão molecular em estudo diferiam no monómero funcional utilizado durante o processo de síntese (ciclodextrina e ciclodextrina funcionalizada). Os estudos de seletividade foram elaborados mediante a realização de ensaios de adsorção molecular, utilizando diferentes compostos estruturalmente semelhantes à deltametrina. Os dados experimentais referentes a estes ensaios mostraram que os MIPs possuíam uma alta capacidade para reter as moléculas de deltametrina, comparativamente aos restantes compostos homólogos.

Em suma, a análise dos resultados obtidos nos estudos de reconhecimento molecular aliado com a dos dados experimentais relativos aos ensaios de seletividade evidenciou o elevado potencial do dn-tr-MIP-2 como adsorvente seletivo de SPE,

perspetivando-se a sua promissora utilização para a implementação da metodologia MISPE no isolamento/ pré-concentração de deltametrina a partir de amostras de azeite.

5.III.3.Implementação da metodologia MISPE: Otimização das Várias Etapas Envolvidas no Procedimento de Extração

Como já foi referido anteriormente, a implementação da metodologia MISPE para a determinação de resíduos de deltametrina em amostras de azeite, requer uma otimização de todas as variáveis que influenciam as diferentes etapas que constituem o processo de extração em fase sólida (acondicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição).

Inicialmente, com a finalidade de aumentar a capacidade de reconhecimento molecular do MIP, garantindo uma eficaz retenção das moléculas de dn nos locais de ligação existentes no polímero, procedeu-se à otimização da etapa de aplicação da amostra, mediante a avaliação do efeito da natureza de diferentes solventes (heptano, diclorometano, acetonitrilo e metanol) no estabelecimento das interações entre a dn e os locais de ligação existentes no MIP. Na figura 39 é apresentada uma sùmula dos resultados obtidos neste ensaio.

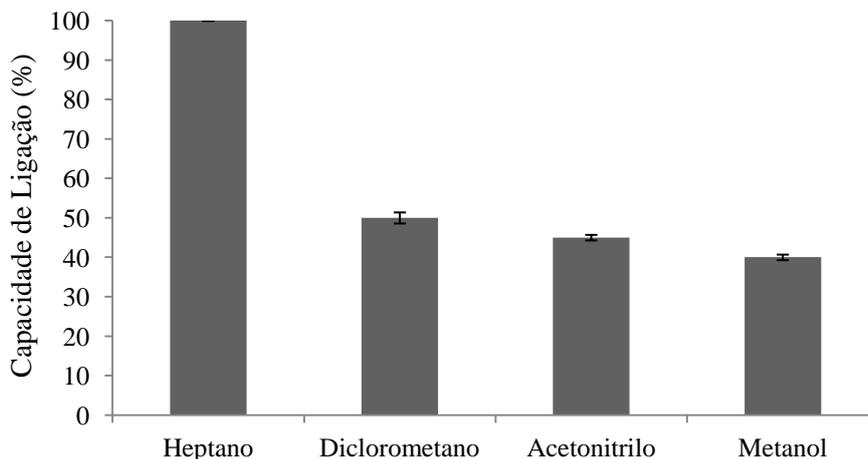


Figura 39. Efeito da natureza dos solventes utilizados durante a otimização da etapa de aplicação da amostra, na capacidade de ligação do dn-tr-MIP-2 à deltametrina.

A análise do gráfico apresentado na figura 39 mostra que a polaridade do solvente utilizado durante a aplicação da amostra afeta a capacidade de retenção do dn-

tr-MIP-2, uma vez que em presença de solventes de elevada polaridade o MIP revela uma diminuta capacidade para reter as moléculas de deltametrina. Mais precisamente, a utilização de solventes polares, tais como o acetonitrilo e o metanol, originaram taxas de retenção do analito alvo inferiores a 45 %, sendo que mais de 50 % da concentração inicialmente aplicada era eluída durante a aplicação da amostra. Esta evidência foi atribuída à elevada solubilidade das moléculas de deltametrina em solventes polares, o que impedia a interação do analito alvo com os monómeros funcionais.

Em diversos estudos realizados no âmbito da tecnologia de impressão molecular é referido que a capacidade de reconhecimento molecular destes materiais poliméricos é favorecida quando se reproduzem as mesmas condições usadas durante a síntese (Caro *et al.*, 2006). Deste modo e, atendendo a que, o dn-tr-MIP-2 foi produzido usando o diclorometano como solvente porogénico, era expectável que o uso deste solvente durante a aplicação da amostra favorecesse a retenção da deltametrina nos respetivos locais de ligação. No entanto, esta estratégia não se revelou eficiente, dado que se continuavam a obter perdas de aproximadamente 50 % do pesticida alvo. Por forma a contornar esta situação, testou-se ainda o efeito de um solvente de natureza apolar (heptano), na capacidade do MIP para reter as moléculas de deltametrina. A utilização do heptano como solvente de aplicação da amostra aumentou drasticamente a capacidade de reconhecimento molecular do dn-tr-MIP-2, permitindo que toda a quantidade de pesticida adicionada na coluna MISPE ficasse totalmente adsorvida na matriz polimérica do MIP. As elevadas taxas de retenção obtidas, mediante o uso de heptano, podem ser explicadas com base no facto de este solvente (de baixa polaridade), não interferir nas interações formadas entre as moléculas de deltametrina e os monómeros funcionais (Yan e Ramström, 2005). Finalmente, face aos resultados obtidos durante a execução deste ensaio, concluiu-se que o heptano seria o solvente mais adequado para a realização da etapa de aplicação da amostra.

Após a seleção do solvente que favorecia a retenção do pesticida alvo nas colunas MISPE, realizou-se um estudo adicional, que teve como objetivo avaliar qual o volume de heptano (1, 3 e 5 mL) mais adequado para a aplicação da amostra. Para a execução deste estudo, reproduziu-se o procedimento experimental anteriormente descrito na secção 4.3.3.. Os resultados alcançados permitiram verificar que a capacidade de retenção da coluna MISPE não foi afetada pelo volume do solvente usado

durante o carregamento da amostra, uma vez que se obtiveram taxas de recuperação do analito alvo de 100 % para os diferentes volumes de heptano em estudo, dado que a totalidade de deltametrina ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) aplicada durante esta etapa do procedimento de extração ficava retida na matriz polimérica da coluna MISPE.

Nas matrizes vegetais com elevado teor de gordura, como é o caso particular do azeite, a etapa de preparação da amostra é uma tarefa extremamente complicada, devido à dificuldade em extrair os analitos de interesse sem extrair simultaneamente compostos polares, os quais podem interferir na quantificação do pesticida alvo. Em particular, os problemas podem surgir quando existem compostos interferentes que competem com os analitos alvo, originando a diminuição da resposta analítica referente ao analito em estudo, durante a sua análise cromatográfica. Por outro lado, a presença de substâncias interferentes nos extratos, essencialmente compostos de natureza lipídica, pode danificar o sistema cromatográfico (Gilbert-López *et al.*, 2009).

Neste contexto, a introdução de uma eficiente etapa de remoção dos compostos interferentes (lavagem), após a aplicação da amostra, permite contornar as limitações associadas ao isolamento e subsequente quantificação de pesticidas em amostras extremamente complexas. No entanto, é importante ressaltar que o solvente usado durante a etapa de lavagem deve possuir a capacidade de eliminar elevados teores de compostos interferentes sem, no entanto, remover os analitos de interesse que se encontram seletivamente retidos no MIP. Deste modo, com o objetivo de otimizar o passo de lavagem testou-se o efeito do uso de diferentes solventes (heptano, diclorometano e misturas destes dois solventes) na remoção das moléculas de deltametrina adsorvidas na coluna MISPE, a qual contém o dn-tr-MIP-2 como adsorvente seletivo. Por sua vez, para obter uma precisa perceção dos teores de dn que ficavam retidos no MIP após a etapa de lavagem, procedeu-se à realização de um subsequente passo de remoção da deltametrina (etapa de eluição) mediante a utilização de 2 mL de metanol.

As alíquotas obtidas durante as etapas de lavagem e eluição foram recolhidas e analisadas por HPLC-DAD, permitindo quantificar as concentrações de deltametrina que eram eluídas mediante a utilização de cada solvente em estudo, nas diferentes etapas do procedimento de extração (lavagem e eluição). Os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 40.

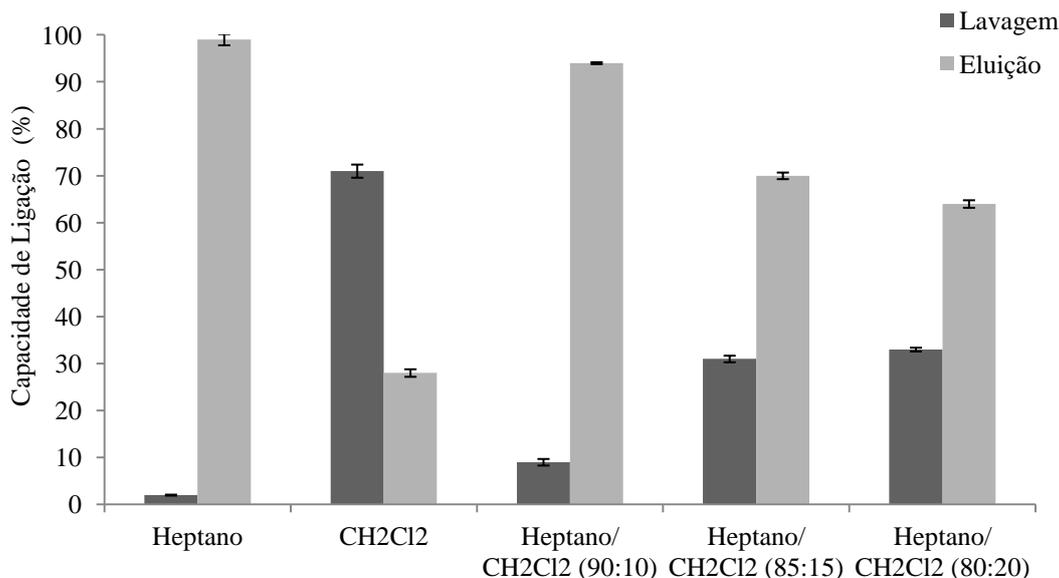


Figura 40. Efeito da utilização de diferentes solventes na otimização da etapa de lavagem, através da análise da capacidade de ligação do dn-tr-MIP-2 à deltametrina. A eluição foi efetuada utilizando 2 mL de metanol.

De acordo com a informação exposta na figura 40 é notório que a aplicação de heptano como solvente de lavagem, não conduziu a perdas significativas do analito neste passo do procedimento de extração em fase sólida, permitindo a obtenção de taxas de recuperação de aproximadamente $99 \pm 1,2$ % do analito alvo na etapa de eluição. Esta evidência experimental pode ser devida ao facto deste solvente não interferir com as interações estabelecidas entre o analito alvo e a matriz do MIP, no entanto, dada a sua reduzida polaridade era expectável que a utilização de 1 mL de heptano não fosse suficientemente eficaz na remoção dos compostos interferentes provenientes da matriz azeite. Em contrapartida, a utilização de um solvente de polaridade superior (diclorometano) durante a lavagem originou perdas do pesticida em análise superiores a $70 \pm 0,7$ %. Adicionalmente testou-se o efeito da mistura destes dois solventes com diferentes percentagens de diclorometano (10, 15 e 20 %). Os resultados obtidos mostram que à medida que se incrementou a percentagem de diclorometano em heptano, a quantidade de deltametrina removida durante a lavagem aumentou gradualmente. Mais precisamente, a aplicação de 1 mL de heptano contendo 10 % de diclorometano, permitiu a obtenção de resultados satisfatórios, dado que eram removidos apenas $9 \pm 0,7$ % da totalidade de dn adsorvida no MIP, o que se traduziu em recuperações superiores a $90 \pm 0,2$ % durante a etapa de eluição. Porém, a utilização de

porções superiores de diclorometano (15 e 20 %) originou recuperações do pesticida alvo inferiores a 70 %.

Em síntese, atendendo aos resultados alcançados neste ensaio, de modo a tornar a etapa de lavagem mais eficiente, em estudos futuros aplicaram-se 2 mL de heptano, seguido de 1 mL de heptano contendo 10 % de diclorometano, uma vez que este protocolo experimental de SPE revelou-se eficaz na remoção dos compostos interferentes, mantendo elevadas taxas de recuperação do pesticida alvo.

Finalmente, como solvente de eluição selecionou-se o metanol, uma vez que este solvente possuía uma elevada aptidão para quebrar as ligações formadas entre a matriz polimérica do MIP e a deltametrina, possibilitando o isolamento/ pré-concentração deste analito. No entanto, de modo a avaliar qual o volume de metanol mais adequado para eluir a totalidade do analito retido no adsorvente da coluna MISPE, durante a etapa de eluição, recolheram-se frações sucessivas de 1 mL deste solvente, as quais foram analisadas por HPLC-DAD. A análise dos resultados provou que a dn era totalmente eluída na primeira fração (1 mL), sendo que nas restantes frações não foi detetada a presença de quaisquer teores de deltametrina. Por outro lado, dado que todos os extratos provenientes das diferentes etapas do procedimento de extração (aplicação da amostra, lavagem e eluição) foram analisadas por HPLC-DAD, foi possível monitorizar a quantidade de dn eluída em cada um destes passos, permitindo assim concluir que 1 mL de metanol era suficiente para eluir a totalidade de analito alvo seletivamente retido na matriz polimérica da coluna MISPE.

Em síntese, a metodologia experimental desenvolvida durante a otimização das várias etapas envolvidas no procedimento de extração pode ser sucintamente resumida da seguinte forma: 1) Acondicionamento da coluna MISPE com 5 mL de metanol e 5 mL de heptano; 2) Aplicação de 1 g de azeite diluída com 5 mL de heptano, com um fluxo de aproximadamente 0,5 gotas por segundo; 3) Remoção dos compostos interferentes mediante a aplicação de 2 mL de heptano, seguido de 1 mL de uma solução de heptano/ diclorometano (90:10 (v/v)), com um fluxo constante de 1 gota por segundo e 4) Eluição das moléculas de deltametrina retidas na matriz polimérica do MIP com 1 mL de metanol e um fluxo de 0,5 gotas por segundo. As frações recolhidas durante o passo de eluição são analisadas por HPLC-DAD (Método cromatográfico 3 – secção 4.2.1.).

5.III.4. Validação da Metodologia dn-tr-MISPE para a Detecção e Quantificação de Deltametrina em Amostras de Azeite Dopado

A otimização das diferentes etapas que envolvem o procedimento de extração em fase sólida, realizada na secção anterior (5.III.3.), permitiu a implementação de uma metodologia MISPE altamente específica para a extração de deltametrina, a qual foi denominada de dn-tr-MISPE.

De modo a avaliar a eventual presença de compostos interferentes, provenientes da matriz azeite, os quais poderiam comprometer a determinação do pesticida alvo, foi realizado um estudo preliminar que consistiu em aplicar 1 g de azeite biológico (não dopado), diluído com 5 mL de heptano na coluna de extração MISPE, de acordo com a metodologia tbz-tr-MISPE, sendo o extrato obtido analisado por HPLC-DAD. A observação do perfil cromatográfico relativo ao extrato (Figura A3 - Anexos) obtido mediante a análise cromatográfica provou que não existiam substâncias interferentes com tempos de retenção similares ao da deltametrina.

De seguida, com a finalidade de avaliar o desempenho da metodologia dn-tr-MISPE em amostras reais procedeu-se à sua aplicação a amostras de azeite biológico ao qual foram adicionadas concentrações conhecidas de deltametrina. Posteriormente, os extratos obtidos após o passo de eluição foram analisados por HPLC-DAD e os resultados experimentais deste ensaio encontram-se resumidos na tabela 18.

Como evidenciado na tabela 18, a aplicação da metodologia dn-tr-MISPE a amostras de azeite contendo uma concentração de dn igual ao LMR (Regulamento (CE) n.º 839/2008), permitiu atingir taxas de recuperação de cerca de 90 % do analito alvo, revelando-se como uma técnica de preparação de amostra bastante eficiente, robusta e rigorosa na extração da deltametrina a partir da matriz azeite, com elevadas taxas de recuperação.

A validação do método analítico foi realizada para garantir que a metodologia que se pretende implementar é suficientemente exata, reprodutível e capaz de abranger o intervalo de concentrações em que o analito se encontra frequentemente presente nas amostras em análise. Desde modo, no presente estudo testou-se ainda a eficiência da metodologia dn-tr-MISPE para a determinação de deltametrina em amostras de azeite

biológico previamente dopado com concentrações deste pesticida abaixo do LMR. Na tabela 18 encontram-se sumarizados os resultados obtidos durante a realização deste ensaio.

Tabela 18. Precisão e exatidão da coluna dn-tr-MISPE na extração de dn a partir de amostras de azeite dopadas com diferentes concentrações deste pesticida.

Concentração de dn Adicionada ao Azeite ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração de dn adsorvida \pm SD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD ^b (%)	TR \pm SD ^c (%)
1,00 ^d	0,90 \pm 0,03	3,33	90,00 \pm 2,50
0,80	0,69 \pm 0,01	1,45	87,00 \pm 1,70
0,60	0,54 \pm 0,01	1,85	90,00 \pm 1,50
0,40	0,38 \pm 0,01	0,88	94,00 \pm 1,70

^aMédia \pm desvio padrão (SD); ^cCoefficiente de Variância (RSD); ^cTaxa de recuperação média \pm desvio padrão (SD); ^dConcentração de deltametrina correspondente ao LMR.

Em concreto, a análise dos dados presentes na tabela 18 permitiu afirmar que a metodologia MISPE possui uma elevada capacidade para isolar e pré-concentrar as moléculas de deltametrina presentes no azeite em quantidades abaixo do LMR (até 0,40 $\mu\text{g g}^{-1}$), com taxas de recuperação que variam entre 87 e 94 %. Por outro lado, apesar da elevada complexidade que as amostras possuíam, associada às quantidades vestigiais em que o analito se encontrava presente nas mesmas, verificou-se uma reduzida influência da matriz durante o processo de extração, o que se refletiu numa rigorosa quantificação do analito alvo.

Os valores referentes ao coeficiente de variância indicados na tabela 18 mostram que os resultados obtidos durante a realização deste estudo apresentavam uma reduzida dispersão (RSD < 3,4 %), este facto, associado às elevadas taxas de recuperação de dn alcançadas para as diferentes concentrações em estudo, permitiu afirmar que a metodologia dn-tr-MISPE possuía uma elevada precisão e exatidão na extração da deltametrina presente em quantidades vestigiais em amostras extremamente complexas.

Neste estudo procedeu-se também à avaliação da capacidade de reutilização e, consequentemente, da reprodutibilidade da coluna MISPE utilizando amostras de azeite biológico dopado com uma concentração em deltametrina coincidente com o LMR. A análise cromatográfica dos extratos obtidos para cada coluna MISPE permitiu determinar as respetivas taxas de recuperação para a deltametrina. Por sua vez, o procedimento de extração em fase sólida foi realizado em triplicado para cada coluna, sendo que os resultados obtidos encontram-se sumarizados na tabela 19. É de referir que as colunas foram regeneradas entre cada ciclo de extração com 1 ml de uma solução de metanol-ácido acético (8:2 (v/v)), seguido de 5 mL de metanol, de modo a garantir que os locais de ligação se encontravam livres para a re-ligação das moléculas do composto de interesse.

Tabela 19. Reprodutibilidade e capacidade de reutilização das colunas dn-tr-MISPE.

Ensaio	Taxa de Recuperação (%)			TR ± SD ^a
	1	2	3	
Coluna MISPE 1	89,0	90,0	92,0	90,0 ± 1,5
Coluna MISPE 2	88,0	87,0	89,0	88,0 ± 0,7
Coluna MISPE 3	95,0	93,0	92,0	93,0 ± 1,5

^aTaxa de recuperação média ± desvio padrão (SD); A concentração de deltametrina usada nos ensaios foi coincidente com o LMR para este pesticida.

A análise dos dados presentes na tabela 19 mostram que existe uma reduzida variação entre os resultados obtidos pelas três repetições efetuadas para cada coluna. Por outro lado, as três colunas MISPE em estudo apresentaram taxas de recuperação similares entre si. Estes resultados são indicativos de uma elevada reprodutibilidade entre cada coluna, o que comprova a reprodutibilidade em termos da síntese química destes polímeros molecularmente impressos. Como era expectável, atendendo aos vários estudos desenvolvidos, os dados experimentais sumarizados na tabela 19 demonstraram ainda uma enorme capacidade de reutilização destes sistemas de impressão molecular, que foram usados como adsorventes nas colunas de SPE.

Finalmente, a realização de um ensaio adicional com vista a averiguar a capacidade de reutilização de uma das colunas MISPE permitiu verificar que o dn-tr-

MIP-2 em estudo, podia ser reutilizado durante pelo menos 20 ciclos de extração, mantendo uma elevada seletividade para a deltametrina e taxas de recuperação de cerca de $91,0 \pm 3,4$ %.

Em suma, a metodologia de preparação de amostra dn-tr-MISPE desenvolvida neste trabalho, revelou-se como uma ferramenta analítica extremamente robusta e fiável para o isolamento/ pré-concentração de resíduos de deltametrina em amostras de azeite. À data da realização do presente trabalho de investigação, esta foi a primeira abordagem para a determinação de resíduos de deltametrina em amostras de azeite, recorrendo à aplicação de polímeros de impressão molecular como materiais adsorventes em colunas de SPE (MISPE). Assim, a introdução desta promissora abordagem pode ser considerada como um grande contributo para a área da química analítica, mais especificamente, para a temática das metodologias seletivas de preparação de amostra, permitindo a implementação de métodos analíticos que possibilitem ultrapassar algumas das desvantagens associadas aos métodos vulgarmente utilizados para a deteção e quantificação dos pesticidas em amostras com elevado teor de gordura.

5.III.5.Efeito de Matriz - Método de Adição Padrão

O azeite é maioritariamente constituído por compostos de natureza lipídica (glicéridos) e ácidos gordos e, minoritariamente por ceras, pigmentos, fosfolípidos, compostos fenólicos, esteróis, tocoferóis e algumas vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), entre outros compostos (Boskou, 2009). Deste modo, dada a elevada complexidade que esta matriz alimentar apresenta, durante o processo de preparação das amostras podem ser co-eluídos compostos interferentes juntamente com o analito alvo, os quais podem interferir com o sinal analítico, originando a supressão da resposta analítica durante a análise cromatográfica, dificultando a exata quantificação do pesticida em estudo.

O método de adição de padrão é geralmente utilizado em amostras complexas, de modo a compensar os efeitos da matriz, bem como algumas perdas do analito alvo durante o processo de extração, no entanto não permite ultrapassar problemas associados a extrações ineficientes ou a interferências cromatográficas causadas pela sobreposição de vários compostos co-extraídos durante a etapa de preparação de amostra. Esta técnica pressupõe algum conhecimento dos teores dos resíduos da

substância a analisar na amostra, de modo a que a quantidade de analito adicionado seja semelhante à sua concentração originalmente presente na amostra (EC, 2013).

Com a finalidade de avaliar o efeito da matriz azeite no presente estudo recorreu-se ao método de adição padrão. Em concreto, o protocolo experimental desenvolvido para a realização deste ensaio encontra-se descrito na secção 4.3.5.. O número de adições padrão foi selecionado de acordo com o recomendado na literatura, por outro lado a validação para o efeito de matriz foi realizada escolhendo uma concentração da substância a analisar de $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$, dado que este teor corresponde ao LMR e, desta forma, é o mais próximo do valor esperado nas amostras reais (Goseti *et al.*, 2010).

A aplicação do método de adição de padrão possibilitou a elaboração de um gráfico que representa as áreas determinadas para cada solução em análise em função das concentrações de deltametrina adicionadas às diferentes frações, conforme ilustrado na figura 41. A regressão linear foi aplicada aos dados experimentais e calculada a respetiva equação geral da reta.

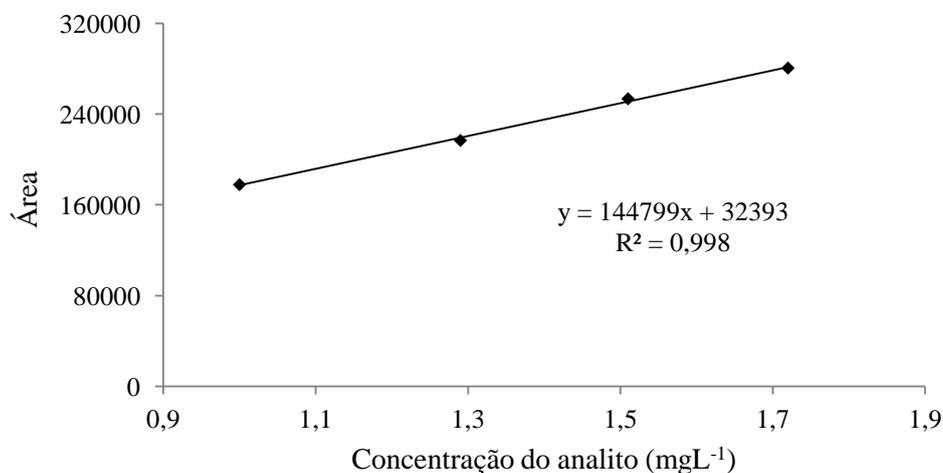


Figura 41. Representação gráfica da regressão linear e respetiva equação geral da reta obtidas mediante a aplicação do método de adição padrão.

De um modo geral, a comparação do declive da reta de calibração traçada convencionalmente mediante a análise de soluções de deltametrina com concentrações rigorosamente conhecidas ($m = 1,45 \times 10^5$), com o valor correspondente ao declive da

equação geral da reta traçada pela aplicação do método de adição padrão ($m = 1,36 \times 10^5$), evidenciou que não existe efeito de matriz, uma vez que esses valores apresentam a mesma ordem de grandeza (Goseti *et al.*, 2010), podendo mesmo afirmar-se que os declives são muito similares.

A ausência de efeito de matriz foi ainda confirmada mediante a realização de um estudo adicional o qual envolveu a análise e quantificação por HPLC-DAD do teor em deltametrina presente na solução teste (que, de acordo com o protocolo do método da adição padrão, corresponde à solução à qual não é adicionada deltametrina). Este ensaio permitiu determinar a concentração de deltametrina existente na fração sem adição de solução padrão dn (solução teste), recorrendo à reta de calibração convencional (secção 4.3.10.), a qual apresenta o valor de $0,2 \mu\text{gg}^{-1}$. Por outro lado, a concentração do analito na amostra em análise (solução teste) foi também determinada pela extrapolação da reta, obtida mediante a aplicação do SAM (Figura 41), no ponto onde esta intercepta o eixo das abcissas, o qual correspondia em valor absoluto à concentração da solução sem adição de padrão (EC, 2013). Desde modo, atendendo à equação da reta $y = 144799 x + 32393$, para $y = 0$ obtém-se uma concentração de $0,2 \mu\text{gg}^{-1}$. Assim, por comparação da concentração do extrato da amostra de teste não dopada ($0,2 \mu\text{gg}^{-1}$), com a concentração do analito obtida por extrapolação utilizando o método da adição de padrão ($0,2 \mu\text{gg}^{-1}$) e, uma vez que, estes valores são coincidentes foi evidente a ausência de efeito da matriz neste estudo.

Assim, com base nestes resultados é possível afirmar que a matriz em estudo não interferia na quantificação dos teores de deltametrina presentes nas amostras de azeite. Esta evidência demonstrou o sucesso da metodologia dn-tr-MISPE, a qual se revelou bastante eficiente na extração seletiva das moléculas de dn em detrimento de algumas substâncias interferentes que poderiam afetar a resposta analítica do cromatografo.

5.III.6. Estudos Comparativos da Metodologia dn-tr-MISPE com os Cartuchos de SPE C₁₈ Comerciais e com a Metodologia QuEChERS

Com o objetivo de avaliar o sucesso da metodologia dn-tr-MISPE desenvolvida no presente trabalho de investigação, realizou-se um estudo comparativo, da sua

eficiência na determinação de resíduos de deltametrina em amostras de azeite, com os cartuchos de SPE comerciais (C₁₈).

Como já foi anteriormente referido, é crucial realizar uma prévia etapa de extração líquido-líquido, para isolar o analito alvo da restante matriz azeite, seguido da purificação da fração obtida através da extração por SPE com cartuchos C₁₈. Tal facto fica a dever-se à elevada complexidade da matriz azeite, associado à baixa selectividade dos adsorventes convencionalmente utilizados na extração em fase sólida, o que pode originar a co-extração de substâncias interferentes, as quais por sua vez podem co-eluir com o pesticida alvo, dificultando a sua deteção e posterior quantificação. O procedimento experimental realizado para a execução deste ensaio encontra-se descrito na secção 4.3.6.. O extrato obtido mediante a realização do protocolo de extração foi analisado por HPLC-DAD, sendo o perfil cromatográfico apresentado na figura 42 (B).

A análise dos cromatogramas obtidos durante a realização deste ensaio (Figura 42 - B) permitiram verificar que ao tempo de retenção característico da deltametrina não existe nenhum pico cromatográfico, assim, na tentativa de investigar a presença deste pesticida nos extratos analisados, foi traçado o espectro de UV-VIS para o composto que sai próximo do tempo de retenção da dn (80,2 min), no entanto verificou-se que não se tratava do pesticida alvo. Este facto revela que o protocolo utilizado durante a preparação das amostras não foi eficiente na extração da deltametrina, mesmo realizando-se dois ciclos de extração líquido-líquido. Por outro lado, para além da incapacidade para isolar a deltametrina da matriz azeite, verificou-se ainda a existência de inúmeros compostos interferentes nos extratos analisados, os quais podem prejudicar o correto funcionamento do equipamento cromatográfico.

Em contrapartida, a análise do perfil cromatográfico obtido mediante a aplicação da metodologia dn-tr-MISPE (Figura 42 - A) revelou que apesar de, este método de preparação de amostra conduzir à extração de alguns compostos interferentes, esta metodologia permitiu um eficiente isolamento/ pré-concentração da deltametrina, relativamente aos restantes compostos presentes nos extratos. Adicionalmente, a identificação da deltametrina foi efetuada pela comparação do tempo de retenção e espectro UV-Vis referentes ao pico cromatográfico com os do respetivo padrão. Em concreto, a análise do espectro de UV-Vis confirmou ainda a ausência de compostos interferentes a co-

eluir com o analito alvo, permitindo a determinação exata dos teores de deltametrina a partir de amostras extremamente complexas, como é o caso particular do azeite.

Por sua vez, de acordo com as vantagens que têm vindo a ser apontadas pela literatura, relativamente à utilização do método QuEChERS na extração de resíduos de pesticidas a partir de amostras alimentares complexas, as quais se encontram mencionadas nas secções 5.I.7. e 5.II.5, neste trabalho foram ainda efetuados estudos de comparação entre a metodologia dn-tr-MISPE e a metodologia QuEChERS. Para concretizar este objetivo, procedeu-se à aplicação do procedimento QuEChERS proposto por Cunha e seus colaboradores (Cunha *et al.*, 2007), o qual se encontra detalhadamente descrito na secção 4.3.7..

Na figura 42 (C) é apresentado um cromatograma obtido através da análise cromatográfica dos extratos provenientes da aplicação da metodologia QuEChERS. O perfil cromatográfico mostra que esta técnica de preparação de amostra consegue remover uma grande quantidade de substâncias interferentes provenientes da matriz azeite, permitindo uma eficaz separação cromatográfica do analito alvo dos restantes interferentes. Porém, as taxas de recuperação da deltametrina obtidas por esta técnica de preparação de amostras foram de aproximadamente $75 \pm 4,1$ %. Estes resultados foram corroborados com os apresentados num trabalho de investigação efectuado por Cunha e seus colaboradores (Cunha *et al.*, 2007), os quais também obtiveram recuperações relativamente baixas para a dn, da ordem dos 51 %, sendo que estes resultados foram atribuídos à natureza química das moléculas de deltametrina. Adicionalmente, estes investigadores também verificaram um decréscimo nas taxas de recuperações deste pesticida com o aumento do teor de gordura na amostra.

Por outro lado, a observação da ampliação do pico cromatográfico (Figura 42 - C) que é eluído com um tempo de retenção igual ao da deltametrina (80,6 min) permitiu verificar a existência de efeito de *tailing*, o que sugeria a co-eluição de compostos interferentes com o analito alvo. Contudo, o espectro de UV-VIS obtido para o composto em causa é característico do espectro referente ao padrão da deltametrina, embora os valores dos comprimentos de onda sejam sensivelmente diferentes.

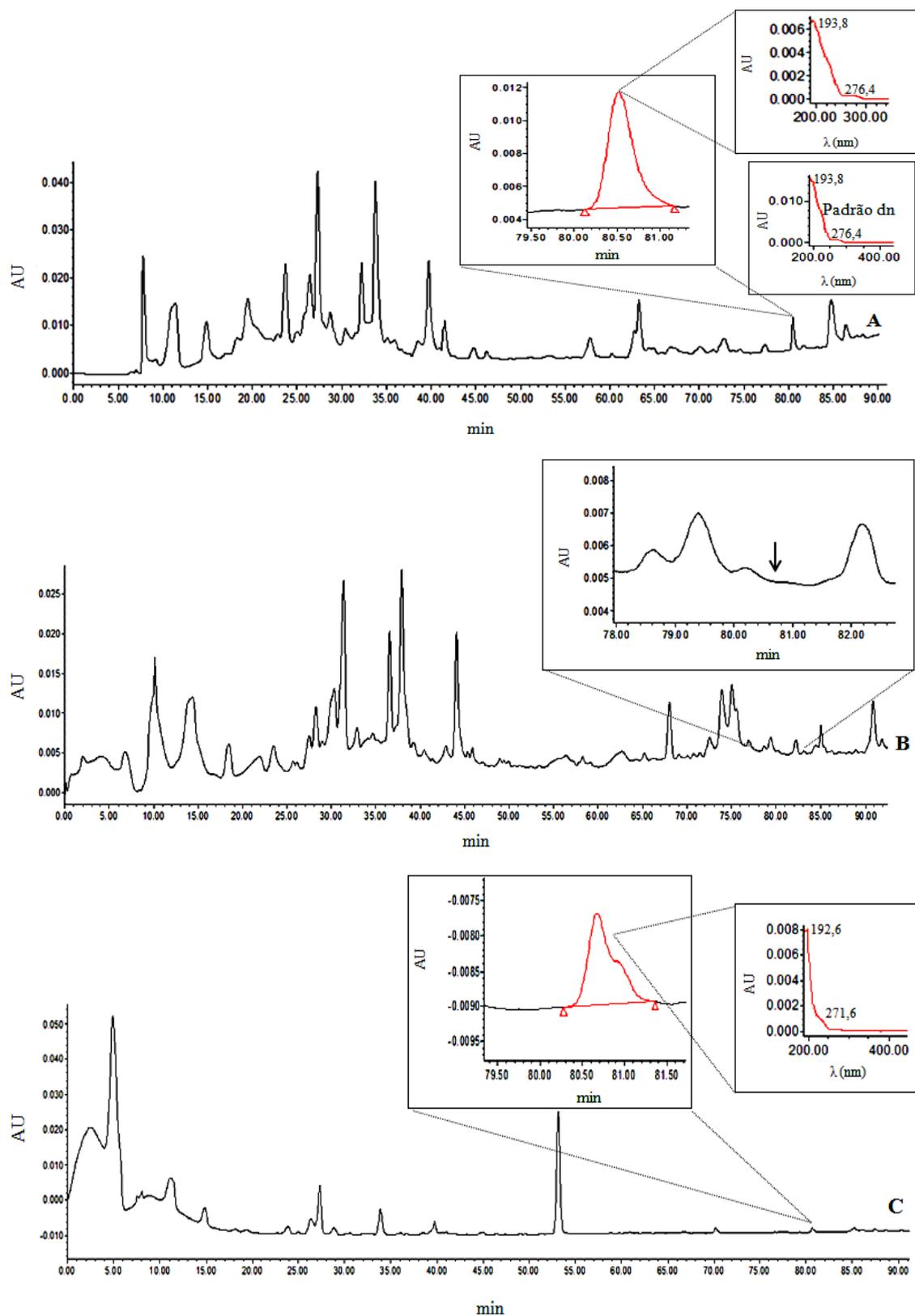


Figura 42. Perfil cromatográfico dos extratos obtidos com a metodologia dn-tr-MISPE (A), LLE – cartucho C₁₈ (B) e metodologia QuEChERS (C). Nos cromatogramas A e C são apresentadas as ampliações do pico correspondente à dn e os respectivos espectros UV-Vis (220 nm), bem como o espectro UV-Vis referente ao padrão dn.

Em síntese, a metodologia dn-tr-MISPE, implementada neste estudo, revelou-se um método de preparação de amostra fiável e eficiente para a análise de resíduos de deltametrina em amostras de azeite dopado com concentrações deste pesticida iguais ao LMR ($1,0 \mu\text{g g}^{-1}$). Mais precisamente, a metodologia MISPE provou ser uma técnica de preparação de amostras rápida e seletiva, permitindo o isolamento e a pré-concentração do pesticida alvo, presente em quantidades vestigiais em amostras complexas, possibilitando assim a sua posterior deteção e quantificação com rigor e precisão. O sucesso desta metodologia deve-se essencialmente à elevada capacidade de reconhecimento molecular apresentada pelos MIPs usados como adsorventes das colunas de SPE, os quais permitiam reter as moléculas de deltametrina na sua matriz polimérica com uma elevada seletividade e especificidade, minimizando os efeitos de matriz. Para além das elevadas taxas de recuperação ($90 \pm 1,5 \%$) alcançadas mediante a utilização das colunas MISPE, esta metodologia exibiu uma boa relação custo-eficácia, devido à capacidade de reutilização das colunas, as quais poderiam também ser armazenadas durante longos períodos de tempo sem perder as suas propriedades adsorventes, nomeadamente a seletividade e a especificidade. Finalmente, a metodologia dn-tr-MISPE e, tal como era esperado, mostrou-se mais seletiva para a deltametrina do que o método convencional de SPE (C_{18}). Comparativamente ao método QuEChERS, a dn-tr-MISPE também se mostrou mais promissora como metodologia de preparação de amostra, o que se traduziu experimentalmente na obtenção de taxas de recuperação superiores.

5.III.7. Aplicação da Metodologia dn-tr-MISPE para a Deteção e Quantificação de Deltametrina em Diferentes Azeites Comerciais

A oliveira possui um pequeno grupo, quando comparado com outras culturas, de inimigos com importância económica, porém, quando estes atacam a cultura do olival podem originar perdas significativas na produção, a diminuição da qualidade do azeite e o aumento dos custos de produção. A deltametrina é um pesticida pertencente à classe dos piretróides, com ação inseticida que atua por contacto e ingestão, sendo frequentemente aplicado nos olivais portugueses para controlar a mosca da oliveira, a traça da oliveira e a traça verde (Mendes e Cavaco, 2009).

Atualmente, embora durante o estabelecimento dos LMRs sejam tomados em consideração os eventuais riscos para o meio ambiente e para a saúde humana, os valores legalmente estipulados permitem fundamentalmente garantir que as aplicações dos pesticidas são efetuadas de acordo com os regulamentos e as boas práticas agrícolas. Assim, é consensual, que o agricultor não terá problemas de contaminações dos seus produtos agrícolas se cumprir meticulosamente as instruções de utilização presentes nos rótulos dos pesticidas, dado que são especificamente indicadas as doses, as concentrações, o número de aplicações, o intervalo entre aplicações, bem como o intervalo de segurança. Porém, caso não se obedeam aos critérios técnicos de aplicação dos pesticidas, no momento da colheita as azeitonas podem conter na sua composição resíduos destes produtos tóxicos, os quais serão posteriormente transferidos para o produto final azeite.

Neste contexto, a metodologia dn-tr-MISPE foi aplicada a um conjunto de amostras de azeite provenientes de diferentes regiões de Portugal (Alentejo, Trás-os-Montes e Beiras), de modo a determinar a eventual presença de resíduos de deltametrina.

Os resultados obtidos mediante a realização deste ensaio mostraram que nos azeites em estudo não foi detetada a presença de resíduos de deltametrina, independentemente da região e do produtor em estudo.

5.IV.Referências Bibliográficas

- Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, **86**, 412-431.
- Bakas I., Oujji N. B., Istamboulié G., Piletsky S., Piletska E., Ait-Addi E., Ait-Ichou I., Noguera T., Rouillon R. (2014). Molecularly imprinted polymer cartridges coupled to high performance liquid chromatography (HPLC-UV) for simple and rapid analysis of fenthion in olive oil. *Talanta*, **125**, 313-318.
- Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istamboulié G., Piletskyc S., Piletska E., Ait-Ichoub I., Ait-Addib E., Noguera T., Rouillona R. (2012). Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, **734**, 99-105.
- Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istamboulié G., Piletsky S., Piletska E., Ait-Addi E., Ait-Ichou I., Noguera T., Rouillona R. (2013). Computational and experimental investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil. *Journal of Chromatography A*, **1274**, 13-18.
- Bektaşoğlu E., Özkütük E. B., Ersöz A., Say R. (2013). Development of New Molecular Imprinted Solid Phase Extraction Material for Dimethoate. *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, **47**, 168-176.
- Boskou D. (2009). Olive Oil. Minor Constituents and Health. CRC Press Taylor e Francis Group, Boca Raton, 629.
- Cai W., Gupta R.B. (2004). Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding. *Separation and Purification Technology*, **35**, 215-221.
- Caro E., Marcé R. M., Borrul F., Cornack P. A. G., Sherrington D. C. (2006). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, **25**, 143-153.
- Chamkasem N., Harmon T. (2014). Analysis of Pesticides in Olive Oil Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. U. S. Food and Drug Administration. Laboratory Information Bulletin. FDA/ORA/ORS. 4572, 1-30.
- Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren B., Hennion M. C. (2004). Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers-application to the extraction of triazines from complex matrices. *Journal of Chromatography B*, **804**, 93-101.
- Chen J., Bai L- Y., Liu K- F., Liu R- Q., Zhang Y- P. (2014). Atrazine molecular imprinted polymers: comparative analysis by far-infrared and ultraviolet induced polymerization. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 574-587.
- Chen Y., Kele M., Sajonz P., Sellergren B., Guiochon G. (1999). Influence of thermal annealing on the thermodynamic and mass-transfer kinetic properties of D- and L-phenylalanine anilide on imprinted polymeric stationary phases. *Analytical Chemistry*, **71**, 928-938.

Commission Regulation (EC) n.º 1097/2009 of 16 November 2009, amending Annex II to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for dimethoate, ethephon, fenamiphos, fenarimol, methamidophos, methomyl, omethoate, oxydemeton-methyl, procymidone, thiodicarb and vinclozolin in or on certain products.

Commission Regulation (EC) n.º 149/2008 of 29 January 2008, amending Regulation (EC) n.º 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto.

Commission Regulation (EC) n.º 839/2008 of 31 July 2008, amending Regulation (EC) n.º 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products.

Corton E., García-Calzón J. A., Díaz-García M. E. (2007). Kinetics and binding properties of chloramphenicol imprinted polymers. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **353**, 974-980.

Cunha S. C., Lehotay S. J., Mastovska K., Fernandes J. O., Beatriz M., Oliveira P. P. (2007). Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science*, **30**, 620-632.

European Commission - Health & Consumer Protection Directorate-General. Safety of the food chain Chemicals, contaminants, pesticides (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pe residues analysis in food and feed. Sanco/12571/2013.

Ferrer I., Lanza F., Tolokan A., Horvath V., Sellergren B., Horvai G., Barceló D. (2000). Selective Trace Enrichment of Chlorotriazine Pesticides from Natural Waters and Sediment Samples Using Terbutylazine Molecularly Imprinted Polymers. *Analytical Chemistry*, **72**, 3934-3941.

García-Calzón J. A., Díaz-García M. E. (2007). Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B*, **123**, 1180-1194.

Garcia R., Cabrita M. J., Freitas A. M. C. (2011). Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Pesticide Residues in Food-A Highly Selective and Innovative Approach. *American Journal of Analytical Chemistry*, **2**, 16-25.

García-Reyes J. F., Ferrer C., Gómez-Ramos M. J. (2007). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 239-351.

Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*, **79**, 109-128.

Goseti F., Mazzucco E., Zampieri D., Gennaro M. C. (2010). Signal upression/ enhancement in high- performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 3929-3937.

Guzzella L., Pozzoni F., Baggiani C. (2008). Synthesis and characterization of a propazine imprinted polymer for the extraction of triazines herbicides. *Water Science & Technology*, **571**, 139-144.

- Kim H., Guiochon G. (2005). Thermodynamic studies on solvent effects in chromatography on molecularly imprinted polymers. 1. Nature of the organic modifier. *Analytical Chemistry*, **77**, 1708-1717.
- Lee W- C., Cheng C- H., Pan H- H., Chung T- H., Hwang C- C. (2008). Chromatographic characterization of molecularly imprinted polymers. *Anal Bioanal Chem*, **390**, 1101-1109.
- Lok C. M., Son R. (2009). Application of Molecularly Imprinted Polymers in Food Sample Analysis - A Perspective, *International Food Research Journal*, **16**, 127-140.
- Lv Y., Lin Z., Feng W., Zhou X., Tan T. (2007). Selective recognition and large enrichment of dimethoate from tea leaves by molecularly imprinted polymers. *Biochemical Engineering Journal*, **36**, 221-229.
- Lv Y., Lin Z., Tan T., Feng W., Qin P., Li C. (2008). Application of molecularly dynamics modeling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinted polymer. *Sensors and Actuators B*, **133**, 15-23.
- Maier N. M., Buttinger G., Welhartizki S., Gavioli E., Lindner W. (2004). Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. *Journal of Chromatography B*, **804**, 103-111.
- Maštovská K., Lehotay S. J. (2004). Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, **1040**, 259-272.
- Mendes F., Cavaco M. (2009). Manual de proteção fitossanitária para proteção integrada e agricultura biológica do olival. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, Lisboa, 65.
- Mhaka B., Cukrowska E., Bu B. T. S., Ramström O., Haupt K., Tutu H., Chimuka L. (2009) Selective extraction of triazine herbicides from food samples based on a combination of a liquid membrane and molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 6796-6801.
- Michailof C., Manesiotis P., Panayiotou C. (2008). Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for the selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters. *Journal of Chromatography A*, **1182**, 25-33.
- Pap T., Horvai G. (2004). Binding assays with molecularly imprinted polymers-why do they work? *Journal of Chromatography B*, **804**, 167-172.
- Picó Y., Fernández M., Ruiz M. J., Font G. (2007). Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**, 117-131.
- Qiao F. X., Sun H. W., Yan H. Y., Row K. H. (2006). Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. *Chromatographia*, **64**, 625-634.
- Rampey A., Umpleby II R., Rushton G., Iseman J., Shah R., Shimizu K. (2004). Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity,

Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis. *Analytical Chemistry*, **76**, 1123-1133.

Sellergren B., Andersson L. I. (2000). Application of imprinted synthetic polymers in binding assay development. *Methods*, **22**, 92-106.

Shi X., Liu J., Sun A., Li D., Chen J. (2012). Group-selective enrichment and determination of pyrethroid insecticides in aquaculture seawater via molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography «-electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, **1227**, 60-66.

Silva M. L. (2007). Infestantes no Olival. Direcção Regional da Agricultura da Agricultura da Beira Litoral, Divisão de Protecção das Culturas. Acedido através do site: http://www.ecossistemasol.com/infestantes_olival.pdf, último acesso a 25 de Junho de 2015.

Spivak D. A. (2005). Optimization, evaluation and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 1779-1794.

Tamayo F. G., Titirici M. M., Martin-Esteban A., Sellergren B. (2005). Synthesis and evaluation of new propazine-imprinted polymer formats for use as stationary phases in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **542**, 38-46.

Tang K., Chen S., Gu X., Wang H., Dai J., Tang J. (2008). Preparation of molecularly imprinted solid phase extraction using bensulfuron-methyl imprinted polymer and clean-up for the sulfonyleurea-herbicides in soybean. *Analytica Chimica Acta*, **614**, 112-118.

Umpleby II R. J., Baxter S. C., Bode M., Berch Jr J. K., Shah R. N., Shimizu K. D. (2001a). Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, **435**, 35-42.

Umpleby II R., Baxter S., Chen Y., Shah R., Shimizu K. D. (2001b). Characteriation of olecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm. *Analytical Chemistry*, **73**, 4584-4591.

Umpleby II R. J., Baxter S. C., Rampey A. M., Rushton G. T., Chen Y., Shimizu K. D. (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, **804**, 141-149.

Valero-Navarro Á., Gómez-Romero M., Fernández-Sánchez J. F., Cormack P. A. G., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2011). Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymers microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 7289-7296.

Vasapollo G., Del Dole R., Mergola L., Lazzoi M. R., Scaerdino A., Scorrano S., Mele G. (2011). Review. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 5908-5945.

WHO (1998). Terbutylazine (TBA) in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization, Geneva. Acedido através do site: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/terbutylazine.pdf., último acesso a 20 de Fevereiro de 2015.

Xu S., Li J., Chen L. (2011). Molecularly imprinted polymers by reversible addition-Fragmentation chain transfer precipitation polymerization for preconcentration of atrazine in food matrices. *Talanta* **2011**, 85, 282–289.

Xu Z. F., Wen G., Kuang D. Z., Zhang F. X. Tang S. P. (2013) Selective separation of deltamethrin by molecularly imprinted polymers using β -cyclodextrin derivative as the functional monomer. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **48**, 336-343.

Yan M., Ramström O. (2005). *Molecularly Imprinted Materials*. Science and Technology. Marcel Dekker CRC Press, USA.

6. Conclusões e Perspetivas

O presente estudo permitiu implementar uma metodologia inovadora, baseada na aplicação de polímeros molecularmente impressos como materiais adsorventes na extração em fase sólida, para a deteção e quantificação de pesticidas presentes em quantidades vestigiais (próximo dos LMRs) em amostras de azeite. Dada a sua relevância para a temática deste trabalho foram selecionados como pesticidas alvo o dimetoato, a terbutilazina e a deltametrina.

Para a concretização deste objetivo foi fundamental a conceção e o desenvolvimento de sistemas de impressão que apresentem capacidade para reter de forma seletiva e específica os pesticidas alvo. Assim, a avaliação da capacidade de reconhecimento molecular aliada ao estudo da seletividade destes materiais poliméricos face a compostos análogos estruturalmente é primordial permitindo a escolha criteriosa dos sistemas de impressão molecular mais apropriados para a sua posterior aplicação como adsorventes de extração em fase sólida. A realização dos ensaios de reconhecimentos molecular elaborados para os diferentes MIPs em estudo, permitiram concluir que o MIP (dmt-inif-MIP) sintetizado pela técnica de polimerização via *iniferter* apresentava uma maior capacidade de reconhecimento molecular para o dimetoato comparativamente aos MIPs (dmt-tr-MIP-1 e dmt-tr-MIP-2) sintetizados pela técnica de polimerização via *bulk*. Por sua vez, relativamente aos MIPs seletivos para a deltametrina (dn-tr-MIP-1 e dn-tr-MIP-2) foi possível concluir que a utilização de acrilamida como monómero funcional durante a síntese do dn-tr-MIP-2 originou um material polimérico que possuía uma capacidade de reconhecimento molecular superior à do MIP (dn-tr-MIP-1) produzido mediante a aplicação de MAA como monómero funcional. Em relação ao MIP seletivo para a terbutilazina, os estudos indicaram que o tbz-tr-MIP apresentava uma elevada capacidade de retenção para este pesticida. Em contrapartida, como seria de esperar, os correspondentes NIPs apresentaram uma reduzida capacidade para reter os pesticidas em estudo, sendo a explicação mais provável para este facto as interações que se estabeleciam entre os analitos alvo e a matriz polimérica serem mediadas por ligações de natureza não específica. Adicionalmente, os estudos de seletividade dos sistemas de impressão dmt-inif-MIP, tbz-tr-MIP e dn-tr-MIP-2 revelaram que estes materiais poliméricos apresentam uma

elevada capacidade para reter os pesticidas alvo, mesmo em presença de compostos de estrutura química muito semelhante. Estes resultados põem em evidência a importância do processo de síntese destes materiais poliméricos para a obtenção de MIPs que possam ser utilizados em extração de fase sólida, como era o objetivo deste trabalho.

Assim, dado que os sistemas de impressão molecular- dmt-inif-MIP, tbz-tr-MIP e dn-tr-MIP-2 revelaram uma enorme capacidade de reconhecimento molecular permitindo a retenção dos pesticidas alvo com elevada seletividade e especificidade, estes materiais poliméricos foram selecionados para posterior aplicação como adsorventes de extração em fase sólida e subsequente implementação das respetivas metodologias MISPE.

Posteriormente, a utilização dos novos materiais poliméricos como adsorventes na extração em fase sólida permitiu implementar uma metodologia MISPE seletiva para cada um dos pesticidas em estudo (dmt-inif-MISPE, tbz-tr-MISPE e dn-tr-MISPE). Porém, para o sucesso na implementação destas metodologias foi fundamental a realização de uma meticulosa e extensiva otimização de todos os fatores que interferem globalmente no processo de extração, tais como a natureza e o volume dos solventes e soluções usadas em cada etapa do procedimento de extração (acondicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição), bem como do fluxo de passagem dos respetivos solventes através do material adsorvente das colunas MISPE, de modo a favorecer a retenção seletiva do analito alvo em detrimento de alguns compostos interferentes que possam estar presentes na matriz. Estes estudos permitiram concluir que a afinidade e a capacidade de ligação dos MIPs para o pesticida alvo é favorecida quando são reproduzidas as mesmas condições utilizadas durante a síntese do MIP, em particular, quando o analito se encontra na presença de um solvente de natureza idêntica à do solvente porogénico. A utilização de solventes de natureza apolar (heptano, diclorometano e diferentes misturas destes dois solventes) revelaram-se eficazes nas etapas de acondicionamento, aplicação da amostra e lavagem, enquanto que o uso de solventes polares (metanol) no passo de eluição permitiu uma eficiente remoção dos analitos alvo que se encontravam seletivamente retidos na matriz polimérica dos MIPs.

Após a otimização das diversas etapas que constituem o procedimento MISPE, procedeu-se à validação das metodologias dmt-inif-MISPE, tbz-tr-MISPE e dn-tr-MISPE para a extração dos pesticidas alvo utilizando amostras de azeite biológico às

quais foram previamente adicionadas quantidades conhecidas dos pesticidas em estudo. Os resultados obtidos evidenciaram que a utilização destas metodologias permitiu a obtenção de extratos relativamente limpos conduzindo a taxas de recuperação elevadas (dmt-inif-MISPE (90 %), tbz-tr-MISPE (92 %) e dn-tr-MISPE (90 %)), mesmo quando estes analitos se encontravam presentes em quantidades vestigiais (inferiores ao LMR).

Em suma, as metodologias dmt-inif-MISPE, tbz-tr-MISPE e dn-tr-MISPE relevaram-se bastante eficientes e reprodutíveis para a extração dos pesticidas alvo, permitindo com elevada eficiência e seletividade o isolamento/ pré-concentração destes analitos, mesmo quando estes se encontram presentes em quantidades vestigiais, a partir de amostras muito complexas como é o caso do azeite.

As metodologias dmt-inif-MISPE, tbz-tr-MISPE e dn-tr-MISPE foram ainda utilizadas para determinar a eventual presença de resíduos de dimetoato, terbutilazina e deltametrina, respetivamente, num conjunto de amostras de azeites comerciais produzidos em diferentes regiões de Portugal (Alentejo, Trás-os-Montes e Beiras). A realização deste ensaio permitiu verificar que nas amostras de azeite analisadas, não foi detetada a presença de dimetoato e deltametrina, independentemente do produtor e da região em estudo. Relativamente à terbutilazina, de todas as amostras de azeite em análise, apenas foi detetada a sua presença nas amostras referentes a um dos produtores pertencentes à região Alentejo, sendo que este pesticida se encontrava presente no azeite em teores inferiores ao LMR ($0,034 \mu\text{g g}^{-1}$).

Adicionalmente, foram ainda efetuados estudos para avaliar a possibilidade de reutilização das colunas MISPEs, tendo os resultados obtidos evidenciado que estas podem ser reutilizadas pelo menos em 20 ciclos de extração sem que ocorra perda significativa da capacidade de reconhecimento molecular para o analito alvo. Esta característica peculiar torna esta metodologia economicamente rentável quando comparada com as restantes técnicas de preparação de amostra testadas neste trabalho (cartuchos comerciais C_{18} e SupelMIPTM SPE – Triazine 10).

Face ao exposto anteriormente pode afirmar-se que a aplicação da tecnologia de impressão molecular no “design” de novos materiais poliméricos usados como adsorventes de extração em fase sólida permitiu a obtenção de materiais com características muito peculiares em termos de seletividade e especificidade, permitindo

ultrapassar algumas das desvantagens associadas aos métodos convencionais de preparação de amostra. Assim, a introdução destes novos materiais poliméricos pode contribuir, de forma muito significativa, para o desenvolvimento de metodologias de preparação de amostra mais seletivas e que permitam o isolamento/ pré-concentração de analitos presentes em quantidades vestigiais em amostras muito complexas, minimizando o efeito de matriz.

Assim, e de acordo, com os resultados alcançados no presente trabalho, é possível prever que a utilização de polímeros molecularmente impressos como materiais adsorventes na extração em fase sólida poderá futuramente ser aplicada com sucesso para a determinação de outros pesticidas, pertencentes a diferentes classes, em amostras de azeite. Pode ainda perspetivar-se a sua aplicação a uma variada gama de compostos e a diferentes matrizes alimentares, pelo que poderá ser uma técnica de preparação de amostra bastante promissora, capaz de pré-concentrar/ isolar diferentes substâncias presentes em matrizes que possuem uma elevada complexidade.

Em trabalhos futuros, seria interessante sintetizar polímeros molecularmente impressos mediante a utilização de técnicas de polimerização mais recentes (polimerização radicalar controlada), de modo a ultrapassar algumas das limitações que vulgarmente são atribuídas às técnicas de polimerização via *bulk*. De facto, a utilização de técnicas que possibilitem um maior controlo da etapa de polimerização, permitirá a obtenção de polímeros de impressão molecular, cuja estrutura tridimensional seja constituída por micropartículas de tamanhos e formas regulares, com locais de ligação homogéneos, originando uma maior capacidade de reconhecimento molecular por parte destes materiais adsorventes.

Vulgarmente, a síntese dos polímeros molecularmente impressos é efetuada através de uma aproximação de “tentativa e erro”, isto é, os materiais poliméricos são sintetizados sendo posteriormente realizada a sua caracterização química e morfológica assim como a capacidade de reconhecimento molecular e, caso se conclua que estes materiais não apresentam as propriedades adequadas, a síntese é repetida com novas condições reacionais. Nalguns casos, a obtenção de MIPs promissores para uma dada aplicação poderá tornar-se um processo relativamente moroso e dispendioso. Recentemente, a utilização de estudos computacionais poderá constituir uma ferramenta

muito útil para seleccionar as melhores condições/ entidades químicas envolvidas no processo de síntese deste tipo de materiais poliméricos.

Anexos

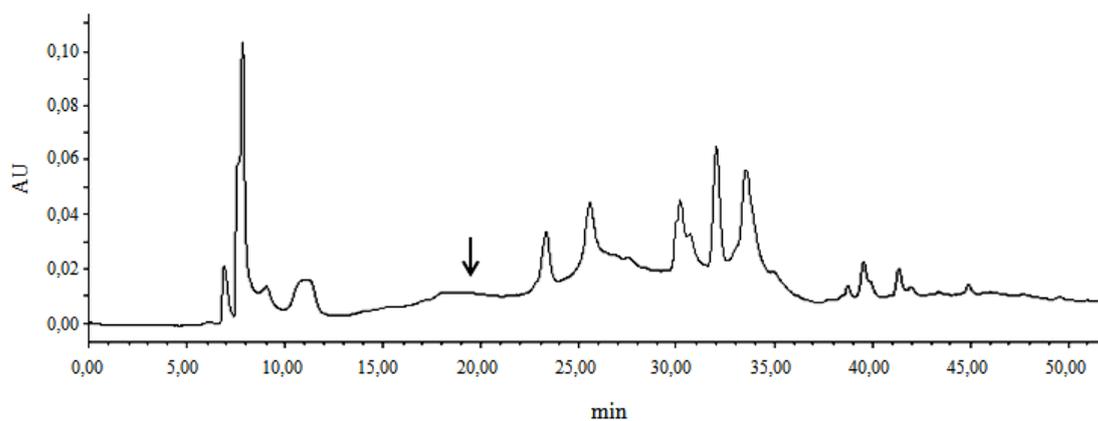


Figura A1. Perfil cromatográfico de HPLC-DAD do extrato obtido com a metodologia dmt-inif-MISPE mediante a aplicação de 1 g do azeite biológico (sem adição de dmt) diluído com 10 mL de heptano.

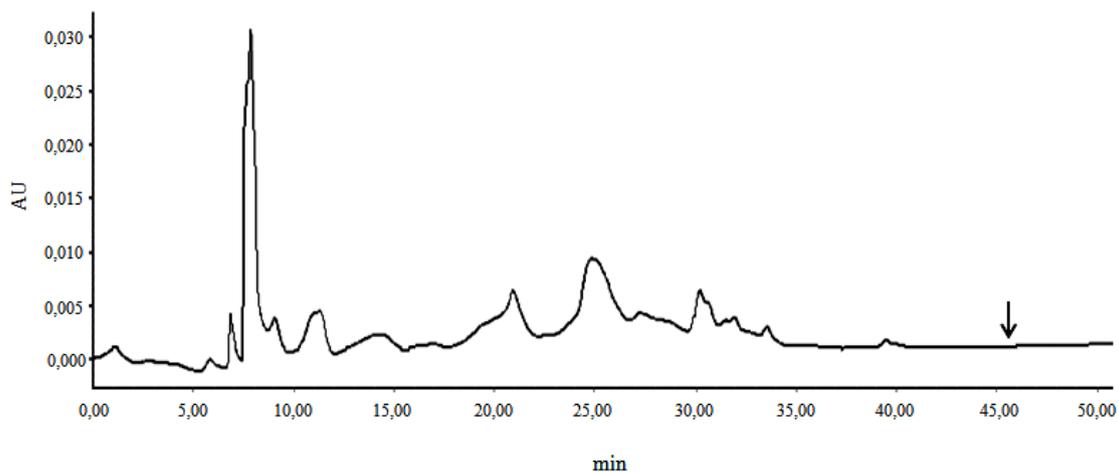


Figura A2. Perfil cromatográfico de HPLC-DAD do extrato obtido com a metodologia tbz-tr-MISPE mediante a aplicação de 1 g do azeite biológico (sem adição de tbz) diluído com 10 mL de diclorometano.

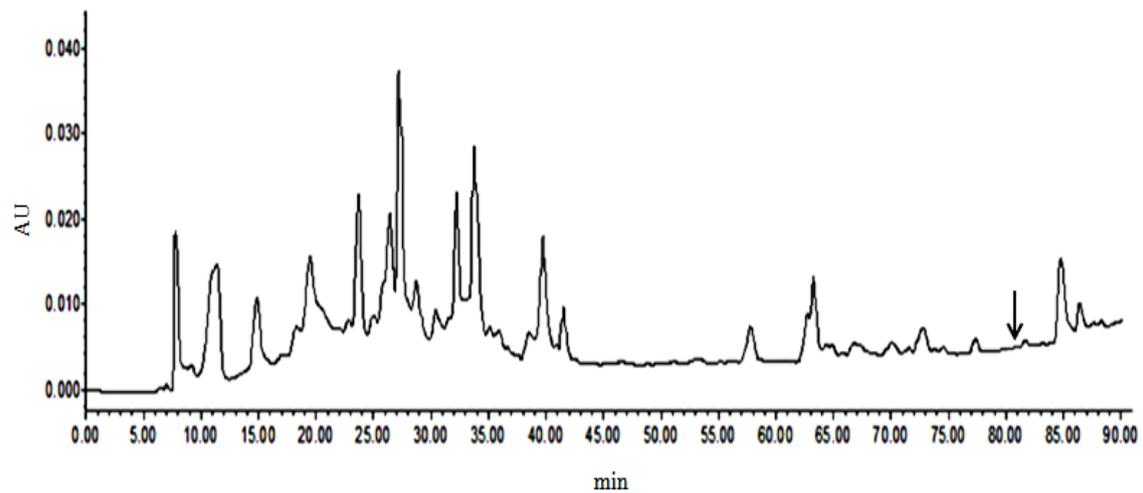


Figura A3. Perfil cromatográfico de HPLC-DAD do extrato obtido com a metodologia dn-tr-MISPE mediante a aplicação de 1 g do azeite biológico (sem adição de dn) diluído com 5 mL de heptano.

Tailor-made molecularly imprinted polymers for dimethoate and deltamethrin recognition: synthesis, characterization and chromatographic evaluation

Marco Simões · Nuno Martins · Maria João Cabrita · Anthony J. Burke · Raquel Garcia

Received: 23 August 2013 / Accepted: 22 January 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract This work concerns the development of molecularly imprinted polymers (MIPs) for the selective extraction of dimethoate (dmt) and deltamethrin (dm) from food matrices. To achieve this goal, the non-covalent methodology has been applied for the preparation of MIPs using metacrylic acid (MAA) as a functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) as cross-linkers in order to evaluate the influence of the nature of the cross-linker on the efficiency and selectivity of those MIPs for the target pesticides. Non-imprinted polymers (NIPs), which do not contain template, have been also prepared in parallel with the MIP synthesis using the same synthetic protocol to assess the specificity of the interactions. Chemical and physical characterization was carried out using conventional techniques, such as Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and thermogravimetric analysis (TGA). Morphological characterization of MIPs and NIPs has been also performed using scanning electron microscopy (SEM) in order to assess the polymer's surface topography. The performance of each polymer was evaluated by conducting binding property measurements, namely imprinting factor determinations and adsorption studies using high performance liquid chromatography (HPLC).

The results obtained in this study seem to show that there is a correlation between the polymer structure (including its physical characteristics) and their binding properties.

Keywords Molecularly imprinted polymer (MIP) · Dimethoate · Deltamethrin · Scanning electron microscopy (SEM) · Rebinding studies

Introduction

Nowadays, molecular imprinting has emerged as a very relevant methodology to produce highly polymeric porous material which can be considered tailor-made synthetic materials possessing selective adsorption properties for specific target molecules, or a class of structurally related compounds [1–3]. Thus, the molecular imprinting technique has received considerable attention in the fields of polymer science and chemical analysis due to its predetermined selectivity for target molecules, high affinity achievement and robustness of recognition [3]. These polymeric materials are prepared by copolymerization of functional monomers and cross-linkers in the presence of an imprinting molecule that is used as a template leading to the formation of an artificially generated three-dimensional polymer network which has recognition sites complementary in size, shape and spatial orientation of the peripheral functionality of the template molecule [4]. These recognition sites mimic the binding sites of biological receptors such as antibody-antigen conjugates allowing one to circumvent some of the disadvantages like the stability, related to natural receptors. Additionally, these polymeric materials exhibit unique characteristics which could be considered beneficial in analytical applications, such as the ability to detect and quantify low analyte concentrations. To perform molecular imprinting, the non-covalent approach (or self-assembly approach) is one of the most frequently used polymerization

M. Simões · A. J. Burke
Departamento de Química e Centro de Química de Évora,
Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, 59 7000 Évora,
Portugal

N. Martins · M. J. Cabrita · R. Garcia (✉)
ICAAM—Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais
Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94,
7002-554 Évora, Portugal
e-mail: raquelg@uevora.pt

R. Garcia
e-mail: rmartagarcia@yahoo.com

techniques, allowing the preparation of molecularly imprinted polymers (MIPs) due to the simplicity of the procedure and the wide variety of monomers that can interact with almost any kind of commercially available template. However, this approach suffers from some drawbacks mainly related to equilibrium processes involved in template-monomer interactions, which must be displaced towards the formation of the template monomer complex by means of the use of a large amount of monomer leading to the formation of a heterogeneous binding site distribution [4, 5]. The resulting polymer must be grounded and sieved in order to achieve particles with an appropriate diameter for this application, followed by a subsequent washing procedure which must be able to clean the MIP cavities and minimizing the template bleeding. MIPs have been developed for a variety of applications including chromatography [6, 7], catalysis [8, 9], solid-phase extraction [5, 10–13], sensor technology [14–16] and drug delivery and discovery processes [17, 18].

The increasing production and application of pesticides for agricultural purposes involves serious risk to the environment and human health due to either exposure or through residues in food and drinking water [19]. In order to ensure food safety, the development of selective, simple, rapid, cost-effective and reliable analytical methodologies able to detect with higher accuracy the presence of pesticides in trace levels, is crucial.

Recently, the use of the “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe” (QuEChERS) sample preparation method [20] has been applied for large-scale pesticide residue analysis in several food matrices [21]. More recently, much attention has been devoted to the use of molecular imprinting for the development of new adsorbents for solid phase extraction (SPE) [5, 10, 11, 13] since the coupling of MIPs with SPE combines the advantages of both enhancement of template molecule recognition and traditional separation methods. Therefore, molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) combines the high specificity, selectivity and sensitivity related to molecular recognition mechanisms with the high resolving capacity of separation methods. Imprinting technology connected with SPE has been used across a wide range of application areas, namely food matrices [5], biological samples [22] and environmental analysis [23].

The present work concerns the development of molecularly imprinted polymers using dimethoate (dmt) and deltamethrin (dm) as template molecules (Fig. 1) in order to evaluate their usefulness for the detection and quantification of these pesticides in food matrices. In the present study, pesticides belonging to the organophosphorus and pyrethroid classes have been studied. Pyrethroid pesticides are commonly used as replacements for the traditional organophosphorus pesticides used in agricultural practices.

To achieve this objective, the present paper reports the synthesis of several dimethoate and deltamethrin MIPs and their corresponding NIPs, which have been prepared using

metacrylic acid (MAA) as the functional monomer and EGDMA and TEGDMA as cross-linkers, aiming to assess the specificity of the interactions. These porous materials were characterized using spectroscopic techniques (FTIR, NMR), thermogravimetric analysis (TGA) and morphological microscopic techniques (SEM). Further chromatographic evaluation of the recognition performance of the imprinting systems has been also performed by means of imprinting factor measurements and affinity binding properties. The results obtained in this study can be seen as the basis for further studies concerning the optimization of the synthetic procedure of dmt- and dm-MIP in order to achieve selective SPE adsorbents for the extraction of pesticides from several food matrices.

Materials and methods

Chemicals

Methacrylic acid (MAA) (functional monomer), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and tetraethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) (cross-linkers), 1,1'-azobisisobutyronitrile (AIBN), including the analytical standards deltamethrin (dm) and dimethoate (dmt) (templates) were purchased from Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA, USA) and were used without further purification. Dichloromethane for synthesis and acetic acid (glacial, 100 % anhydrous) and methanol for washing steps were purchased from VWR International S.A.S. (Fontenay-Sons-Bois, France) and all the chemicals were used without purification, except dichloromethane which was dried by distillation before use. HPLC grade acetonitrile and methanol and acetone were purchased from VWR International S.A.S. (Fontenay-Sons-Bois, France) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively. The water used in all experiments was distilled and purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Instrumentation

An Hamamatsu L9588-06 Spot Light Source UV-lamp was used for the photo-polymerisations.

Elemental analysis was measured with a Carlo Erba 1108 Elementar Analyzer. For the morphological studies, a scanning electron microscopy (SEM) on a Hitachi S-3700 N instrument was used, with an accelerating voltage set to 15 kV. Samples were mounted on aluminium stubs using carbon tape and were gold coated. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis measurements were performed on a PerkinElmer Spectrum Two infrared spectrophotometer. In the case of the physico-chemical studies, the thermogravimetric analysis (TGA) was determined on a PerkinElmer STA 6000 at a heating rate of 20 °C min⁻¹ up to 600 °C under a

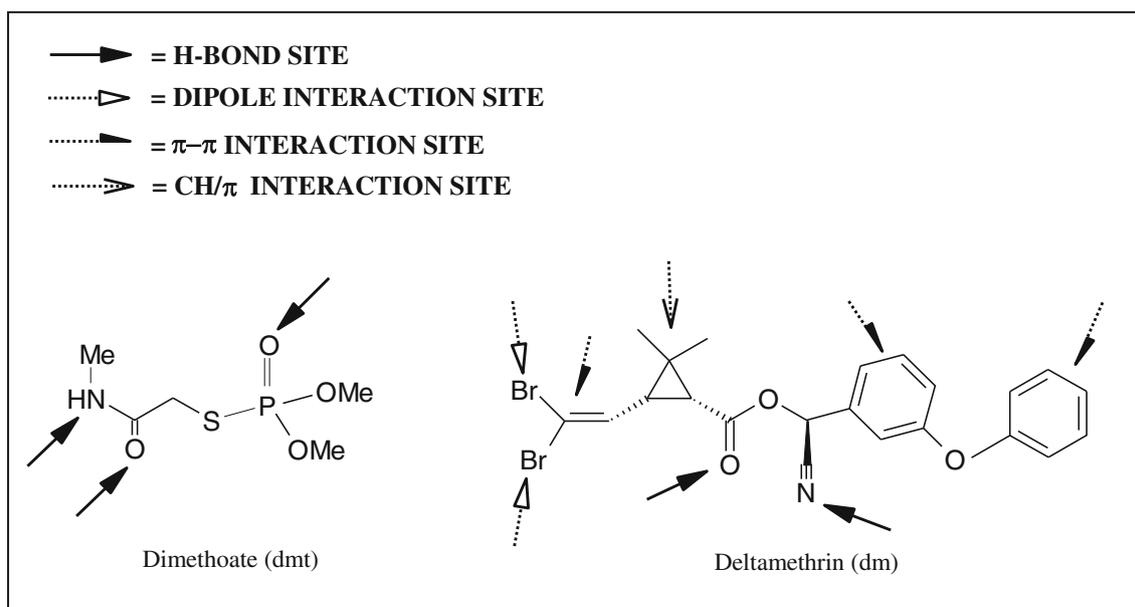


Fig. 1 Chemical structures containing assignments of possible interaction sites of the template molecules studied in this work

helium atmosphere. NMR solid state spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer operating at 500 MHz for phosphorus. The GC experiments were performed on an Agilent/HP 6890 instrument under the following conditions: chromatographic column, fused silica capillary column HP5, 5 % phenyl methyl siloxane, 30 m, 0.25 mm I.D. and 0.25 μm film thickness (Agilent GC column); chromatographic method, GC grade helium as carrier gas at a flow rate (constant flow) of 1.0 mL min^{-1} , column temperature program, 50 $^{\circ}\text{C}$ (held 5 min) heated at 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 100 $^{\circ}\text{C}$ (held for 10 min) and then heated at 40 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 200 $^{\circ}\text{C}$ (held for 7.5 min); injector temperature was set at 250 $^{\circ}\text{C}$, H_2 flow and air flow at 40 mL min^{-1} and 400 mL min^{-1} , respectively. Detection was carried out by flame ionization.

Chromatographic evaluation of MIPs and NIPs, namely, imprinting factor determinations, was performed using an LC system LC30 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) with a GP50-2 Gradient Pump and a LC30 column oven. Chromatographic experiments were carried out using a stainless-steel column (50 mm \times 4.6 mm) (Grace, Brandstraat, Belgium) packed with the synthesized MIPs and NIPs. Detection was carried out using a UV-vis detector (UVD 170 U) at 220 nm. Output signals were monitored and integrated using Chromeleon 6.30 software.

Batch rebinding studies were performed using an HPLC UltiMate 3000 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) system with LPG-3400SD gradient pump, TCC-3000SD column compartment and WPS-3000SL autosampler injector. Chromatographic experiments were carried out with a C18 Nucleosil reverse phase column (250 \times 4.6 mm ID, 5 μm) (Grace, Brandstraat, Belgium). Detection was carried out using a photodiode array detector (DAD-3000RS) set in the

range of 200–600 nm. Chromeleon 7.0 software was used for management, acquisition and treatment of data. On adsorption studies a VMS-C10 magnetic hotplate stirrer (VWR, Germany) and an Universal 32 centrifuge (Hettich Zentrifugen, Germany) were also used.

Synthesis of molecularly imprinted polymers

Molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized using a molar ratio of template, functional monomer and cross-linker of 1:4:20 (Fig. 2). The functional monomer methacrylic acid (MAA, 1 mmol), the cross-linker, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, 5 mmol) or tetraethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA, 5 mmol) and either the dimethoate (dmt, 0.25 mmol) or deltamethrin template (dm, 0.25 mmol) along with 1,1'-azobisisobutyronitrile (AIBN, 0.06 mmol) were dissolved in dry dichloromethane (4 mL) in a 10-mL thick-walled glass tube. The mixture was degassed by flowing nitrogen through the flask for 10 min in an ice bath, and then stirred under irradiation from the UV lamp (at 240–400 nm). After 24 h, the polymer monolith obtained was ground and sieved in order to give particles ranging from 150 μm to 300 μm . The particles were collected and washed extensively in a Soxhlet extractor with methanol/acetic acid solution (9:1(v/v)) for 48 h.

The non-imprinted polymers (NIPs) were synthesized using the same procedure, but in the absence of template.

Physical and morphological characterization

The morphological evaluation of the dimethoate- and deltamethrin-imprinted polymers was performed by scanning

electron microscopy (SEM). The physico-chemical characterization was achieved using spectroscopic (FTIR, NMR) techniques, thermogravimetric analysis and microanalysis.

Chromatographic evaluation

Imprinting capacity

MIP1-MIP4 and NIP1-NIP2 were crushed and sieved to obtain particles of uniform size ($<45\ \mu\text{m}$), then the polymer powder (nearly 250 to 350 mg) was suspended in acetonitrile and the slurry obtained was packed manually into a stainless steel HPLC column (50 mm \times 4.6 mm I.D.). The column was connected to the HPLC system equipped with a UV detector, and the template residue molecules were removed from the column by continuously washing with methanol–acetic acid (8:2 (v/v)) until a stable baseline was reached. One hour prior to the first injection, the column was equilibrated with the eluent and for 10 min between injections. The elution profile study for the various analytes using MIP1-MIP4 and NIP1-NIP2 as stationary phases in HPLC was performed using solvents of different polarities with different flow rates (as discussed in Section 3.2.1) in order to gain insight into the optimal elution conditions.

Imprinting factor assays of MIP1-MIP4 and NIP1-NIP2 were carried out at ambient temperature by injection of a volume of 10 μL of different template solutions (dmt and dm) in acetonitrile (2 mM) and 20 μl of acetone as the non-retained component (termed the void volume marker) for the determination of the void fraction of the column. The retention times of each substance were recorded at 220 nm with an isocratic flow rate using different mobile phases. Retention factor (κ) was calculated for each analyte as $\kappa = (t-t_0)/t_0$, where t is the retention time of the analyte and t_0 the retention time of acetone. Following this, imprinting factors (IF) for each analyte were calculated from the capacity factors of each analyte obtained on the MIP1-MIP4 and NIP1-NIP4 columns subjected to the same chromatographic conditions, using the equation $\text{IF} = \kappa_{\text{MIP}}/\kappa_{\text{NIP}}$ where κ_{MIP} and κ_{NIP} are the retention factors of the analyte on the MIPs and NIPs, respectively. The imprinting factor experiments were done in triplicate.

Batch rebinding studies

Binding properties of MIP1-MIP4 and NIP1-NIP2 were evaluated by batch rebinding studies for each polymer. Those assays were performed following the above procedure: 20 mg of the imprinted (MIP1-MIP4) or non-imprinted (NIP1-NIP2) polymers were weighed into 10-mL glass vials followed by the addition of 2 ml of acetonitrile, and then aliquots of different solutions of the template under study were added (final template concentrations range 0.0024–0.36 mg mL⁻¹). Next, the vials were stirred at room temperature with a magnetic hotplate stirrer at 450 rpm. After 24 h,

the vials were centrifuged and the supernatant was removed carefully and analyzed by HPLC in order to measure the amount of free template (unbound to the polymers). The binary mobile phase consisted of solvents A (water) and B (acetonitrile) as follows: 25–100 % B from 0 to 7 min, then 100 % B from 7 to 14 min, followed by 100–25 % B from 19 to 24 min. The flow rate was fixed at 0.5 mL min⁻¹ during the entire chromatographic process. The injection volume was 25 μL , DAD detection was done at 220 nm and the detection was set between 200 and 600 nm to monitor the UV–vis absorption. The quantification of the template was performed by measuring the peak area and by means of the correspondent calibration curve. For the determination of the calibration curve a number of HPLC standard solutions were prepared and analyzed by HPLC. These were obtained by dilution of a stock solution of the corresponding template in the range 1.961 $\times 10^{-3}$ –0.4125 mg mL⁻¹ (dmt) and 1 $\times 10^{-4}$ –0.38 mg mL⁻¹ (dm) and the LOD and LOQ values obtained allowed the accurate quantification of the pesticides in the study. All the experiments were conducted in duplicate, and the average value was taken. The amount of template bound to the MIP (S_b) was calculated by subtracting the amounts of free template (S_f) at equilibrium from the initial solution (S_i).

Results and discussion

Synthesis of imprinted polymers

A series of molecularly imprinted polymers (MIP1-MIP4) were synthesized using the functional monomer methacrylic acid (MAA), the cross-linker, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) or tetraethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and either the pesticide dimethoate or deltamethrin as templates, as illustrated schematically in Fig. 2. AIBN was used as the initiator and the photo-polymerization was achieved using a UV lamp during 24 h. Since it was observed that reaction times lower than 24 h did not lead to complete polymerization, 24 h was selected as the optimized reaction time. For the synthesis of all the MIPs in this study, the standard ratio of template:monomer:cross-linker used was 1:4:20, according to the standard conditions described by Chapuis and co-workers [24]. Recent studies by Tom and co-workers [25] have shown that the presence of a slight excess of MAA in solution during the polymerization step may optimize the number of interactions between the template molecule and the MAA functional groups, which ultimately result in the formation of the binding sites within the imprinted material. The same study has shown that a typical template:cross-linker ratio of 1:40 was used for the preparation of non-covalent MIPs since this provides rigidity in the polymer network ensuring a cavity that is complementary in shape as well as functionality to the template [25].

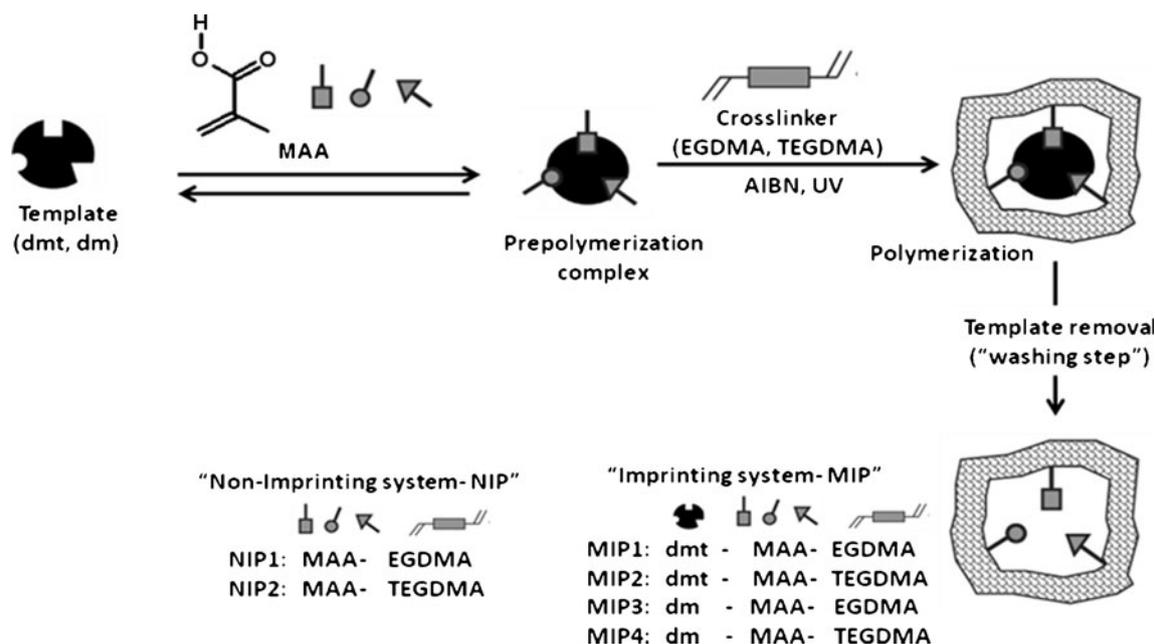


Fig. 2 Schematic representation of the MIP synthesis

The chemical structures of the templates under study (dmt and dm) have influenced our synthetic strategy since dmt are flat molecules, whilst dm is a chiral molecule with three stereogenic centres (Fig. 1). In the case of dmt, which is a very small molecule with three key points for hydrogen bonding or dipolar interactions with monomers and the crosslinker, then the choice of monomer was limited to small molecules with high potential for hydrogen bond formation, thus MMA was selected as the monomer. The functional monomer plays a relevant role on the MIP molecular recognition performance since stronger interaction between template-monomer is crucial for the production of a highly stable complex and consequently higher recognition specificity of the MIPs [26]. According to several studies [26–28] MAA has been considered the optimal monomer when compared with other common functional monomers like 4-vinylpyridine (4-VP) and acrylamide (AAm), since it leads to the formation of molecularly imprinted polymers with the highest binding capacities.

In the case of the cross-linker, both EGDMA and TEGDMA are adequate for the imprinting process providing the formation of cavities with suitable size to accommodate dmt and dm templates. For the imprinting process, dichloromethane was used as the porogen as it can bind to the dmt and dm templates via hydrogen bonding and dipole-dipole interactions and at the same time, since it is a small molecule, and it will not greatly disturb the resulting imprinting process, nor lead to excessively large cavities. The influence of the porogen on the strength of the non-covalent interactions and on the polymer morphology is well known, as it is responsible for creating the pores in the MIPs thus assuring reasonable “flow through” properties within the macroporous structure

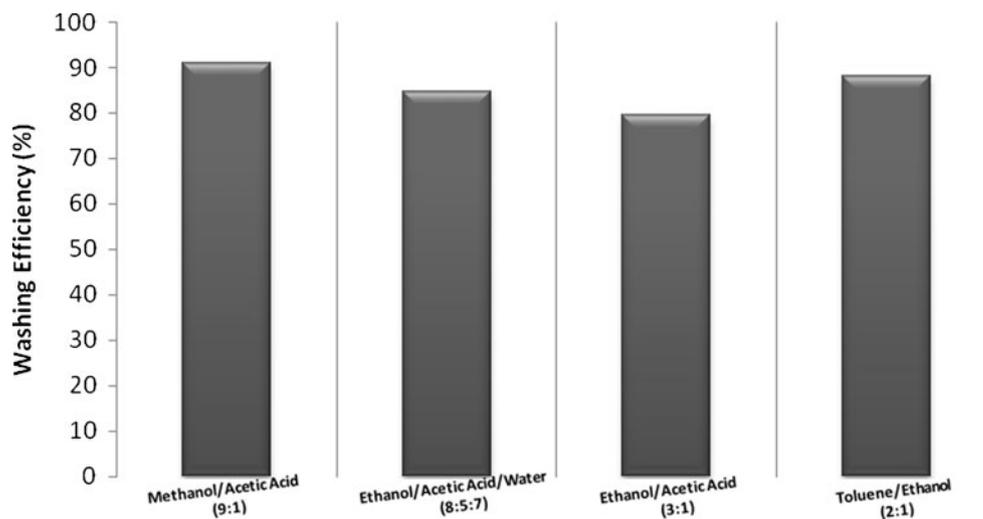
[2, 29]. Obviously, the choice of porogen is limited to the solubility of all the entities (M, template, initiator and CrL) involved in the imprinting system.

Afterwards, the polymeric products were collected and washed by Soxhlet extraction using a methanol/acetic acid solution (9:1(v/v)) for 48 h. This extraction procedure is also appropriate to remove the remaining AIBN residues or unreacted monomer starting materials. This is considered the common method for washing the MIPs. Some of the non-washed MIPs were retained for comparative analytical studies (see below). The polymers were all obtained as pale white solids.

Optimization of the MIP washing step and analysis of residual pesticide

Since bleeding phenomena constitute some of the main drawbacks associated with the imprinting systems [2], our first objective was to determine the efficiency of the template extraction process using microanalysis, the results of which were corroborated by other analytical techniques (FTIR, NMR). Microanalysis gave an indication of the carbon, hydrogen and nitrogen composition of the washed imprinted systems (MIP1-MIP4). Although, to study the efficiency of the template extraction process, this analysis was able to quantify more accurately the percentage of the template remaining in the imprinted cavities of the MIPs after the washing procedure. Unfortunately, it was impossible to remove all the template from the MIP, and depending on the MIP, the extraction system and the template used, the residual quantity ranged from 5 % to 15 %. Such problems of removing the last traces of templates have also been reported by other authors

Fig. 3 Comparison of the washing efficiency using a variety of solvent mixtures



[30, 31]. The presence of only residual amounts of template in the imprinted cavities demonstrated the importance of performing an efficient washing of the MIP, thus rendering the MIP cavities available for further analyte rebinding studies.

In order to optimize the MIP washing process, an extensive screening study of the Soxhlet Extraction process using several solvent mixtures was investigated (Fig. 3).

As depicted in Fig. 3, the most efficient washing solvent system was methanol/acetic acid (9:1(v/v)) which had an efficiency of 91 % for the extraction of the template from the imprinted polymer. This mixture performed very well due to its polar nature suiting the polar functional groups of the templates. Thus, methanol/acetic acid (9:1(v/v)) was selected as the extraction solvent of choice.

Study of monomeric conversion during the polymerization step

The covalent bonds created between the functional monomer (M) and the cross-linker (CrL) are extremely important in order to maintain a stable polymer matrix for the imprinting process, but at the same time bestowing mechanical stability to the matrix [32]. The capacity and molecular recognition of the imprint binding sites owes much to the molar ratio M:CrL which is responsible, together with the imprinting molecule, for the formation of a three dimensional cross-linked polymer

matrix with complementary binding features with regard to the guest molecule's shape, structure and functionality. In this study, NIPs and MIPs were synthesized having a molar ratio M:CrL of 1:5. In order to study the efficiency of the photopolymerization process the conversion of MAA during the imprinting process using gas chromatography (GC) was assessed, this study was carried out for the synthesis of NIP1. This study showed that during the photochemical synthesis, 97 % of the MAA was converted to cross-linked polymer (NIP1). Thus, the synthetic method for the synthesis of all NIPs and MIPs was performed using a molar ratio (M:CrL) of 1:5.

Morphological studies

The performance of the MIPs is not exclusively dictated by the interaction of the template with the functional monomer pre- and post-polymerization at a molecular level, but also by their overall morphological features, which include the particle shape, size and the porous texture of the imprinting systems, which can affect the subsequent molecular recognition properties. Therefore the use of optical microscopy for the morphological characterization of the MIPs and NIPs [33] was crucial and for this purpose SEM, TEM and AFM analysis were used. The SEM technique is used quite frequently for this purpose as it is relatively simple to perform and constitutes a rapid form of analysis, and thus we wished to

Fig. 4 SEM micrographs of NIP1 (left-hand side) and NIP2 (right-hand side) at 10,000 \times resolution

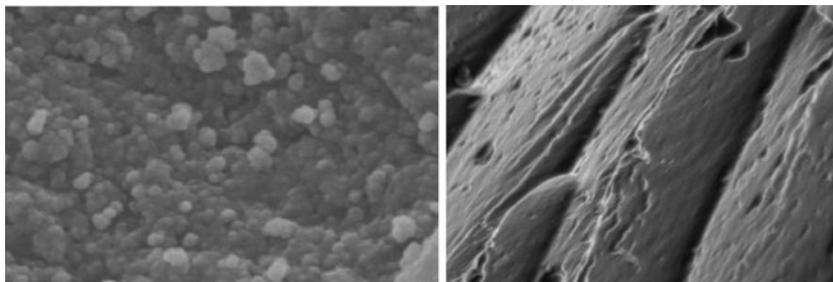
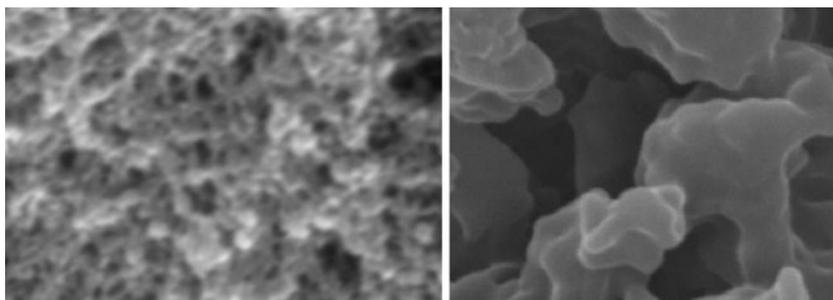


Fig. 5 SEM micrographs of MIP1 (left-hand side) and MIP2 (right-hand side) at 30,000 \times resolution



explore this technique for both morphological characterization of the MIPs and the NIPs and to try and gain an insight into the structure of the MIP cavities. Figures 4, 5 and 6 show the SEM micrographs obtained for several MIPs and NIPs synthesized in this work. Our studies using both TEM and AFM were without success.

Figure 4 presents the SEM images of NIP1 and NIP2. The two types of NIPs showed different morphological features reflecting the use of different cross-linkers on the synthesis of these porous materials. NIP1 seemed to have a more grainy surface texture than the NIP2 counterpart, which was much smoother. While NIP1 presents interconnected spherical and small globules that form a porous structure, NIP2 has a more compact arrangement. Overall, the results of the SEM analyses for the NIP systems confirm the importance of using a suitable cross-linking monomer, for controlling the polymeric matrix morphology [29].

SEM images of MIP1 and MIP2 (Fig. 5) show for the former the presence of cavities with sizes in the range 55–110 nm, whilst for MIP2, cavity sizes between 190 and 420 nm were visible. Morphologically both MIPs have similar structures, but appreciable differences in their morphologies could be detected if compared with NIP structures showing the influence of the template on the overall polymer morphology.

SEM images of MIP3 and MIP4 (Fig. 6) showed that in the case of MIP3 there seem to be cavities in the range 120–200 nm, whilst for MIP4, the cavities seem to be better defined, but bigger, ranging in size from 85–620 nm.

The results of the SEM analysis seems to indicate that MIPs containing TEGDMA as cross-linker have a more rigid and compact structure and the size of the cavities are greater

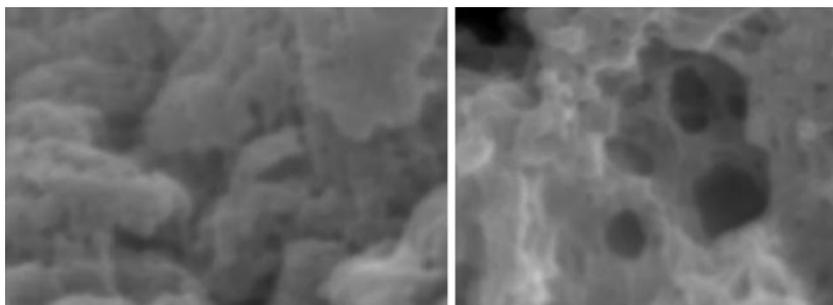
than those obtained with EGDMA. SEM images also show that dimethoate imprinted polymers have a more uniform dispersion and quantity of imprinting cavities compared to deltamethrin imprinted polymers. Some of the morphological data obtained for MIPs and NIPs, in particular, the porous size measurement, has reflected a bigger average porous size for the MIP particles than for the NIP systems, suggesting some influence of the template on the particle growth during the polymerization.

Chemical characterization

In order to gain some insight into the interactions between the template and the MIP cavity inner wall, some FTIR studies for NIP1-NIP2 and MIP1-MIP4 were carried out. The infrared spectra of MIP1 (Fig. 7) and MIP2 (Fig. 8) before and after depletion of the template molecule, as well as that of the corresponding NIPs are depicted below.

The FTIR spectra showed very little difference between the NIP and undepleted MIP material: in either the case of the MIP1/NIP1 and MIP2/NIP2 systems (Figs. 7 and 8, respectively). The intense bands at about 1,700 cm^{-1} are undoubtedly attributed to C=O stretching of the ester and acrylic acid whilst that at *ca.* 3,000 cm^{-1} can be attributed to methyl C-H stretching. The fact that the bands due to the template could hardly be visualized is probably a consequence of the highly diluted nature of the template within the polymer structure. The adsorption peak around 1,500 cm^{-1} assigned to the stretching vibration of residual vinylic C=C bonds, was present in both polymers (MIPs and NIPs). The main difference between the spectra was the presence of an absorption peak at 660 cm^{-1} (*) which belongs to the pesticide dimethoate

Fig. 6 SEM micrographs of MIP3 (left-hand side) and MIP4 (right-hand side) at 30,000 \times resolution



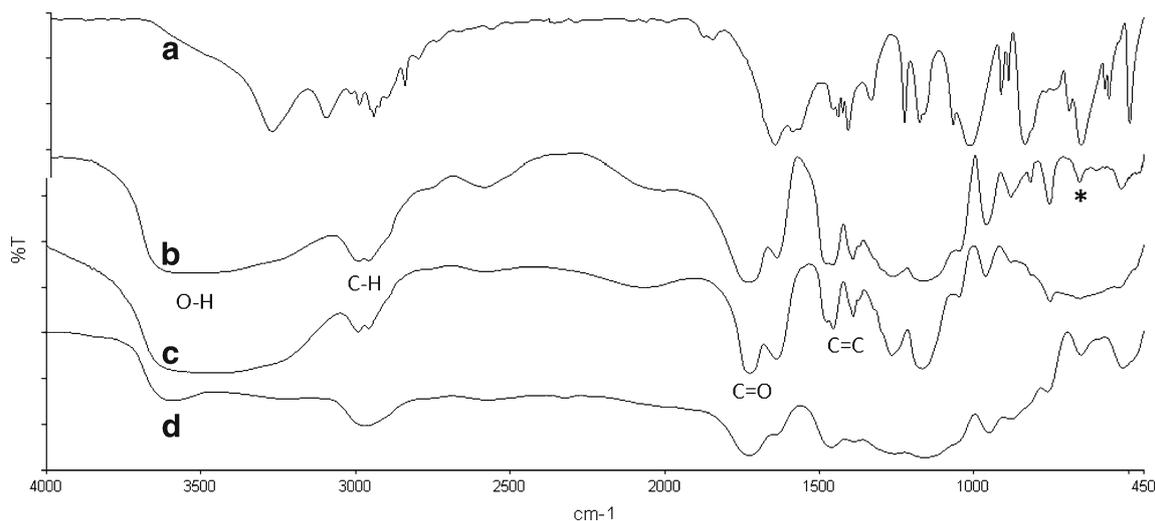


Fig. 7 FTIR spectra of (a) dmt template, (b) MIP1 before depletion of dmt, (c) MIP1 after depletion of dmt, and (d) NIP1

(Figs. 7 and 8a and b). The absence of that peak which is assigned to dmt in the depleted MIP spectra (Figs. 7c and 8c) seems to indicate the efficiency of the template removal from the imprinting systems in this study.

In an attempt to characterize fully the imprinted systems in this study we have performed a ³¹P NMR study for the dimethoate imprinted MIPs (Fig. 9), aiming to obtain key structural information regarding the interaction of the template with the MIP cavity inner wall.

Preliminary studies indicate that the template was present in the cavities of the unwashed MIP, and that there was no alteration in the chemical shift for the ³¹P nucleus remaining at 98 ppm. This fact was indicative of weak interactions between the phosphorous atom and the carboxylic acid side arms of the MIP cavities, and perhaps seemed to give some indications about the relative orientation of the template within the cavity, with perhaps the phosphorous containing part of the template

being positioned distal to the cavity wall. The NMR data obtained shows clearly that most of the dmt had been removed from the MIP after washing. However, as this technique is less sensitive than microanalysis, the usefulness of this technique to determine the efficiency of removal of the pesticide during the washing step is, therefore, moderate. In order to evaluate the thermostability of the MIPs and understand some of its textural properties and mechanical properties, thermogravimetric analysis (TGA) studies were performed for all the MIPs and NIPs studied.

For the NIP systems, the decomposition of NIP1 started at 320 °C with total decomposition at 440 °C whilst for NIP2 it starts at a temperature of 235 °C and loses total weight at 415 °C. Thus, the decomposition of NIP1 occurs at a higher temperature than NIP2 (TEGDMA-co-MAA), showing some evidence of its more stable and robust composition and structure. In the case of

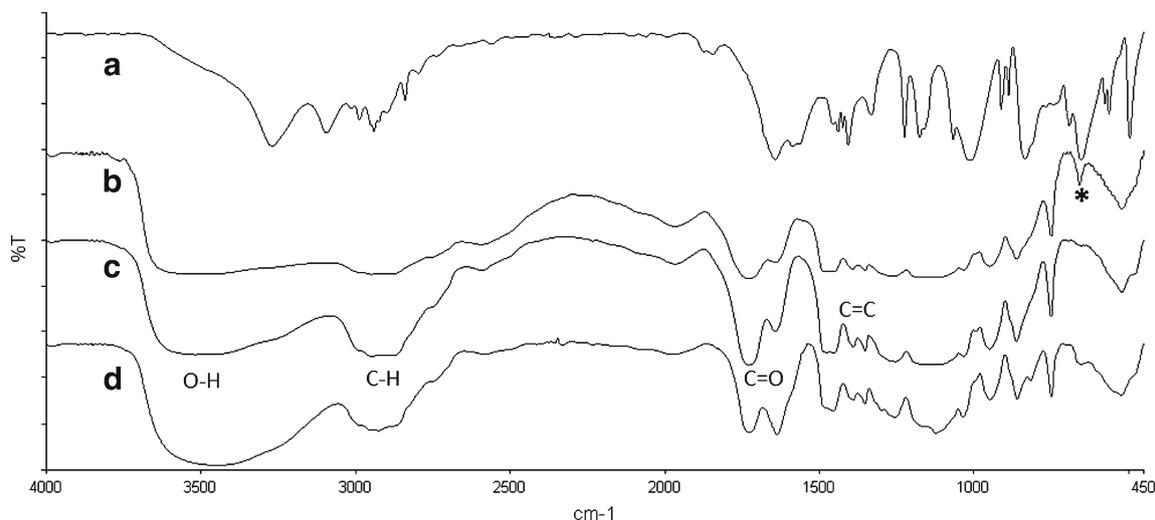


Fig. 8 FTIR spectra of (a) dmt template, (b) MIP2 before depletion of dmt, (c) MIP2 after depletion of dmt, and (d) NIP2

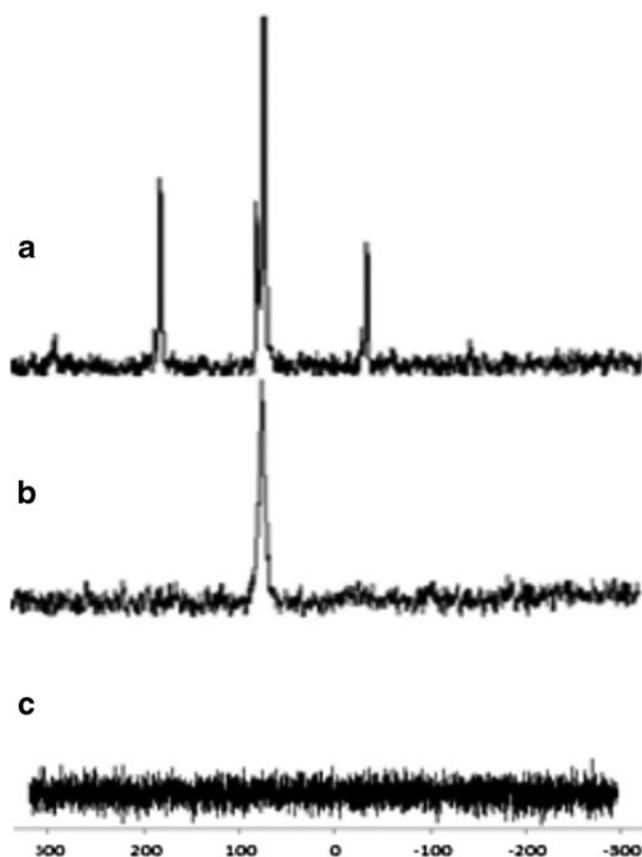


Fig. 9 ^{31}P NMR solid state spectra (500 MHz) of (a) dmt; (b) MIP1 before depletion of template; (c) MIP1 after depletion of template

MIP1 and MIP3 similar observations as regards the initial and final decomposition temperatures have been observed for NIP1. Equally, MIP2 and MIP4 have shown the same range of values of decomposition temperature than the respective NIP2. These results seem to indicate that, after depletion of the template from the polymeric material, the MIP shows the same thermogravimetric behavior as the NIP, hence the presence of dmt and dm in the templating process seems not to affect the structural or mechanical properties of the final MIPs.

Chromatographic evaluation

Imprinting capacity

Imprinting factors are a valuable tool for the evaluation of the usefulness of molecularly imprinted polymers as adsorbents for solid phase extraction (SPE). Because of the heterogeneous nature of MIP binding sites that have been prepared by the self-assembly approach, it is mandatory to apply reliable methodologies that could study the binding behavior of those imprinted materials. In particular, this evaluation comprises an experimental procedure in which MIPs are used in the high performance liquid chromatography (HPLC) stationary phase. The non-imprinted materials were also studied to

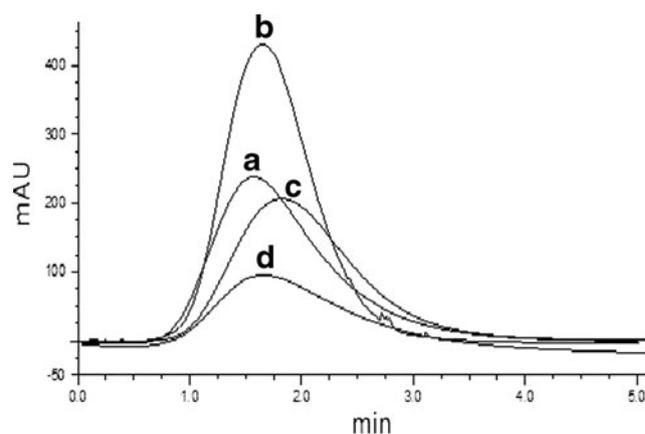


Fig. 10 Elution profile of dmt on MIP1 column using different mobile phases: (a) pure acetonitrile, (b) acetonitrile-water (8:2 (v/v)), (c) pure methanol and (d) methanol-water (8:2 (v/v)), flow rate was 0.5 mL min^{-1} , λ : 220 nm

assess the specificity of the interactions. Thus, in this study, MIP1-MIP4 and NIP1-NIP2 were packed into a HPLC column in order to evaluate their specific absorption capability and recognition mechanism. The quantity of MIP used in the packaging step, the flow rate, the composition of the mobile phase as well as the injected pesticide volume have been optimized to provide an adequate elution profile, as shown in Fig. 10 for MIP1. Some differences in peak shapes, retention times and tailing (Fig. 10a–d) could be observed while the optimal elution was achieved using acetonitrile-water (8:2 (v/v)) as mobile phase (Fig. 10b), which increases the signal to noise ratio and the column efficiency.

As depicted in Fig. 10, peak tailing and broadening of the peak were observed when pure methanol and a mixture of methanol-water were used as mobile phase (Fig. 10c and d). However, the profile of the imprinted column peak is broader than that obtained with the conventional C18 column, an effect that has been also observed by other authors [34].

Table 1 Imprinting factors for MIP1-MIP4 stationary phases^a

MIP	Chromatographic conditions (eluent; flow rate)	κ_{NIP}	κ_{MIP}	IF
MIP1	MeOH; 1 mL min^{-1}	0.04	0.13	3.25
	MeOH/H ₂ O (90:10 (v/v)); 0.5 mL min^{-1}	0.10	0.18	1.80
	CH ₃ CN; 0.3 mL min^{-1}	0.22	0.17	0.7
MIP3	MeOH; 0.7 mL min^{-1}	1.15	0.80	0.70
	MeOH/H ₂ O (90:10 (v/v)); 1.0 mL min^{-1}	0.40	1.93	4.83
	CH ₃ CN; 0.7 mL min^{-1}	0.03	0.05	1.67
MIP4	CH ₃ CN/H ₂ O (90:10 (v/v)); 0.5 mL min^{-1}	0.14	0.09	0.64
	CH ₃ CN; 0.5 mL min^{-1}	0.09	0.36	4.0
	CH ₃ CN; 0.7 mL min^{-1}	0.11	0.06	0.55
	CH ₃ CN/H ₂ O (90:10 (v/v)); 0.5 mL min^{-1}	0.21	0.09	0.43

^a HPLC conditions: HPLC was an LC30 Dionex; MIP column was $50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ I.D.; injection volume was $10 \mu\text{L}$; λ : 220 nm

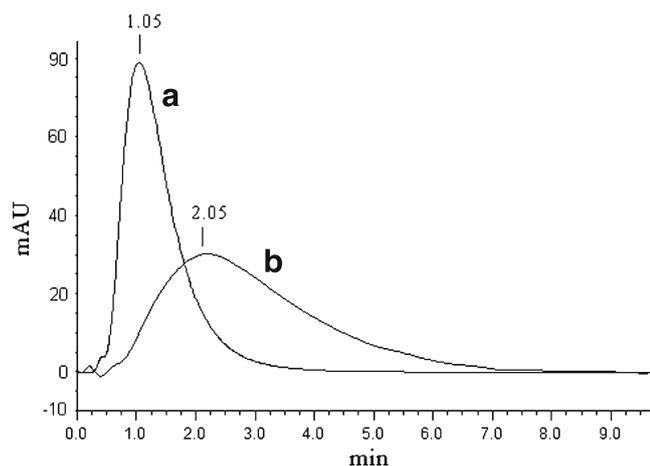


Fig. 11 Chromatographic profile of dm at (a) non-imprinted polymer (NIP1) and (b) imprinted polymer (MIP3); mobile phase was MeOH/H₂O (90:10 (v/v)) with flow rate at 1.0 mL min⁻¹; λ : 220 nm

In order to measure the retention factors (κ) and imprinting factors (IF) for MIP1–MIP4, a screening study comprising the use of several mobile phases and different flow rates was performed for each MIP under study. The capacity factors were calculated from the adjusted retention times in order to avoid differences in retention time due to differences in packing efficiencies. Thus, the IF value reflects the imprinting effectiveness for the MIP column compared to its corresponding NIP. The results obtained in this study are summarized in Table 1.

Table 1 shows that the retention factors of the templates (dmt and dm) were longer with the MIP than the NIP column, which is the expected result since the NIP shows no recognition capacity for the template. For all the tested MIPs, MIP3 is the polymeric material that shows the best IF (4.83) for the following chromatographic conditions: eluent MeOH/H₂O (90:10(v/v)), flow rate 1.0 mL min⁻¹. Recently, Xu and co-workers [35] have introduced novel imprinting systems for the selective separation of deltamethrin using a β -cyclodextrin derivative as a functional monomer and toluene 2,4-

diisocyanate as the cross-linker and the resulting studies were able to determine the molecular recognition of those systems, namely the imprint factors, which were in the range 1.99–2.44. Despite the use of different functional monomers and cross-linkers, the IF data obtained for MIP3 with deltamethrin as template is higher than the IF values of those imprinting systems. However, regarding imprinting systems for dimethoate recognition, the values obtained for MIP1 are relatively lower than the data described in other studies [36, 37]. Moreover, the porous intrinsic nature of the MIPs, together with several other factors, like shape recognition, hydrogen bond formation and hydrophobic interactions contribute strongly to the retention of the analyte, which is reflected in the varieties of IF values listed in Table 1. In the case of the NIPs, their adsorption capacity was relatively weak compared to the corresponding MIPs which results from the intrinsic nature of the molecularly imprinted polymer as well as its molecular intrinsic affinity for the corresponding template. Figure 11 represents the elution profile of dm on the non-imprinted polymer (NIP1) (Fig. 11a) and on the imprinted polymer (MIP3) (Fig. 11b) columns.

As depicted in Fig. 11, the dm peak profile on the NIP column (Fig. 11a) is similar to its profile on the classic HPLC column, which exhibits a narrow peak without tailing. However, on the MIP column (Fig. 11b) the elution profile of dm is more broadened and with peak tailing when compared to the NIP column. This chromatographic behavior is characteristic of MIP columns and reflects the non-specific template adsorption pattern of NIP columns, that demonstrates easy elution by the mobile phase. These findings are in agreement with the results of other authors [34].

Batch rebinding studies/adsorption studies

Binding assays represent a key method for characterizing and comparing MIPs and is often used to evaluate the recognition mechanism of the synthesized MIPs [38]. To perform this

Fig. 12 Binding isotherms of MIPs (MIP1, MIP2) and NIPs (NIP1, NIP2) for the dmt template. Experimental conditions: mass of polymer, 20 mg; adsorption time, 24 h

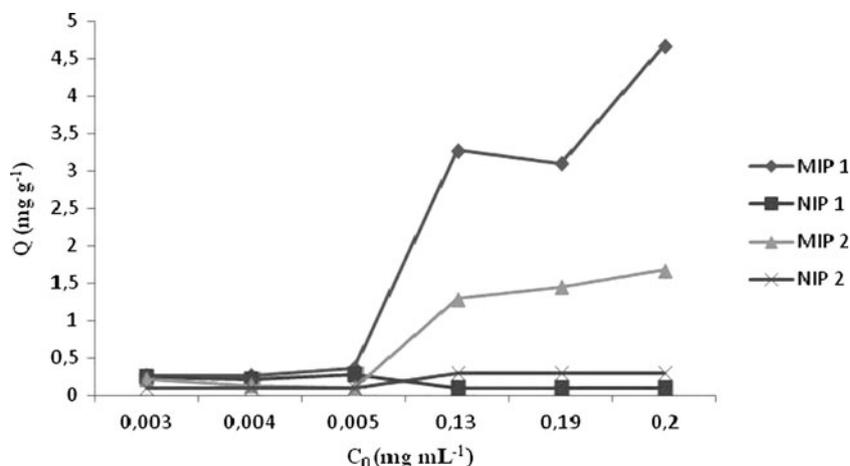
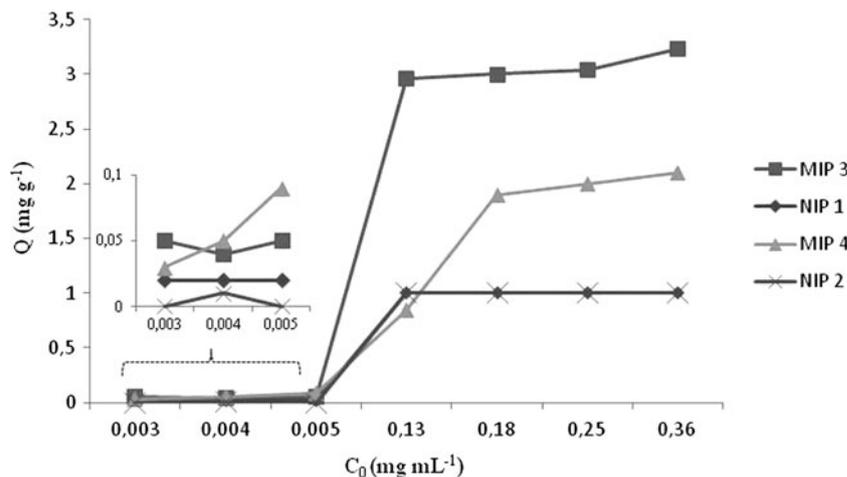


Fig. 13 Binding isotherms of MIPs (MIP3, MIP4) and NIPs (NIP1, NIP2) for dm template. Experimental conditions: mass of polymer, 20 mg; adsorption time, 24 h



evaluation, adsorption isotherm experiments were carried out, which comprised the analysis of a heterogeneous mixture of the MIP with the corresponding template (dmt and dm) at concentrations in the range of 3×10^{-3} – 0.36 mg mL^{-1} . In Figs. 12 and 13 the experimental results for the imprinted polymers MIP1-MIP2 and MIP3-MIP4, are depicted. The results of the rebinding studies for the corresponding NIPs (NIP1, NIP2) were also indicated for comparative purposes.

The adsorption isotherms represented in Figs. 12 and 13 measure the relationship between the equilibrium concentrations of bound and free template over a determined concentration range. As depicted in Figs. 12 and 13, the adsorbed template quantity is relatively lower when the template is present in minor concentrations because at those concentrations the template doesn't occupy all of the recognition sites of the imprinted material. The progressive increase in the concentrations of template solution leads to the occupancy of more and more recognition sites leading to a continuous increase of the polymer's binding capacity and at higher equilibrium concentrations than 0.13 mg mL^{-1} the binding capacity became stable for almost all the MIPs under study, with the exception of MIP1 that showed an increase in the binding capacity ($Q_{\text{max}}=4.5$). Several authors have claimed (as well as stated by us above) that the molecular recognition properties of the imprinted polymers are intimately related to their morphology, or specifically in terms of the particle shape and size as well as the porous texture of the material [33]. Thus, MIP1 shows the highest binding capacity for the dmt template, which is correlated with their morphological structure obtained by SEM characterization. In particular, the SEM micrograph of MIP1 shows the presence of a microporous structure allowing the template to approach the binding sites (or cavities) located in the inner part of the polymer particles making their occupancy of the imprinted cavity easier. The relatively higher specific surface exhibited by MIP1 is another feature that could also explain the easier approach of the adsorbed template molecule. For the other MIPs (MIP2,

MIP3 and MIP4), the polymer particles are aggregated into more irregular structures and most of the binding sites are located in the interior of the imprinted material, thus complicating the entrance of the templates into the binding sites leading to a decrease in the binding capacity for the target analytes. The values of the binding capacities obtained for the different MIPs are in agreement with literature values [26]. Additionally, as depicted in Figs. 12 and 13, MIP1 and MIP3 having EGDMA as the cross linker, show higher binding capacity than their counterparts MIP2 and MIP4 which were prepared using TEGDMA as cross-linker. As expected, for the NIPs studied in this work there are no selective recognition sites and consequently the binding capacities were the lowest.

In order to evaluate the nature of the binding sites and cognizant of the fact that under non-covalent imprinting conditions, the resulting MIPs contain a heterogeneous mixture of cavities of varying affinity for the guest molecules, we have estimated the sorption capacity and equilibrium isotherm for the MIPs in this study, using Freundlich's isotherm (Eq. 1) as it is an empirical power function for non-ideal sorption on heterogeneous surfaces [4, 39–41].

$$B = a C^m \tag{1}$$

Table 2 Fitting parameters for the Freundlich adsorption isotherms of imprinted (MIP1-MIP4) and non-imprinted polymers (NIP1 and NIP2)

MIP	<i>m</i>	R ²
MIP1	0.5275	0.9914
MIP2	0.6501	0.9809
MIP3	1.0033	0.9665
MIP4	0.8507	0.9819
NIP1	0.2051 ^a	0.9250 ^a
	0.9287 ^b	0.9692 ^b
NIP2	0.2774 ^a	0.9844 ^a
	1.1053 ^b	0.9464 ^b

^a-dmt; ^b-dm

where B is the amount of template bound to the polymer, C is the amount of free template in solution after equilibrium, a is a Freundlich adsorption coefficient related with the binding affinity and m is a Freundlich constant which represents the heterogeneity index and varies from 0 to 1 (values approaching 0 indicate increasingly heterogeneity and 1 is homogeneous). Freundlich's model is considered a generalization of the Langmuir model applied to a heterogeneous surface with an energy distribution corresponding to an exponential decrease [4]. The heterogenous nature of the polymer's binding sites diminishes the ability of the MIPs in almost every analytical application and, in particular, on chromatographic applications contributing to the broadening and asymmetry of the peaks.

Experimentally, the plot of $\log B$ vs. $\log C$ was applied to generate the intercept value of a and the slope of m by linear regression, assuming an exponential decaying sorption site energy distribution [39, 40]. In Table 2 are summarized the experimental binding data relative to FI obtained for the MIPs studied in this work.

As indicated in Table 2, all the isotherms were in excellent agreement with an FI ($R^2 > 0.95$) over the concentration range described above. The heterogeneity indices (m) for MIP3 and MIP4 were high, indicating that these imprinted polymers approached homogeneity in terms of binding site distribution. Moreover, this result was unexpected since all the polymers were prepared by a non-covalent approach leading typically to the production of heterogeneous binding sites on the cross-linker polymers due to the instability of the template-monomer complexes during the pre-polymerisation step. However, similar results have been recently described by Holland and co-workers [33]. In the case of MIP1 and MIP2 the m values are lower than for MIP3 and MIP4, which seems to indicate the presence of heterogeneous binding sites on the cross-linker polymers with dimethoate recognition.

Conclusions

Dimethoate- and deltamethrin-tailor-made imprinted polymers have been prepared by a non-covalent photochemical imprinting approach using MAA as the functional monomer, EGDMA and TEGDMA as cross-linkers, dichlorometane as porogen and AIBN as initiator. The success of the polymerization process was established by means of physico-morphological techniques comprising the use of spectroscopic (FTIR, ^{31}P NMR), thermogravimetric (TGA) and microscopic (SEM) techniques. The molecular recognition of MIPs has been evaluated by imprinting capacity measurements and rebinding experiments, which show that our MIPs displayed adsorption capacity for the corresponding template. In order to evaluate the heterogeneous nature of the binding behavior of MIPs, an empirical Freundlich function for non-ideal sorption

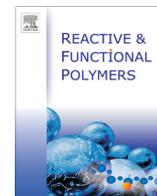
on heterogeneous surfaces has been applied and the heterogeneity indices for all the MIPs under study were determined. Despite the popularity of bulk polymerization for the preparation of molecularly imprinted polymers, the application of the resulting imprinted material for chromatographic evaluation is handicapped by the following principle aspect: the requirement for time consuming grinding and sieving of the material, in order to obtain particles within a homogeneous size distribution. Thus, we are currently exploring the possibility of preparing both dmt and dm molecularly imprinted polymers with alternative synthetic methods, which can predictably lead to the formation of well-defined polymers with low polydispersities, controlled composition and functionality, so that we can augment their impact and application in analytical chemistry.

Acknowledgments This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors-COMPETE and National Funds through FCT-Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/Agr/UI0115/2011 and PEst-OE/QUI/UI0619/2011 and Project PTDC/AGR-ALI/117544/2010. Prof. Peter Carrott and Ms. Louisa Marques are acknowledged for their assistance with the TGA study. Laboratory HERCULES at the University of Évora is acknowledged for the SEM analyses. Prof. João Rocha and the solid state NMR service at CICECO, University of Aveiro, Portugal are thanked for the solid state MAS- ^{31}P NMR study.

References

- Bui BTKS (2010) *Haupt Anal Bioanal Chem* 398:2481–2492
- Vasapollo G, Del Sole R, Mergola L, Lazzoi MR, Scardino A, Scorrano S, Mele G (2011) *Int J Mol Sci* 12:5908–5945
- García R, Cabrita MJ, Freitas AMC (2011) *Am J Anal Chem* 2:16–25
- García-Calzón JA, Díaz-García ME (2007) *Sens and Actuators B* 123:1180–1194
- Martín-Esteban A (2013) *Trends Anal Chem* 45:169–181
- Ansell RJ, Kriz D, Mosbach K (1996) *Curr Opin Biotechnol* 7:89–94
- Nunez O, Gallart-Ayala H, Martins CPB, Lucci P (2012) *J Chromatogr A* 1228:298–323
- Alexander C, Davidson L, Hayes W (2003) *Tetrahedron* 59:2025–2057
- Corma A (2004) *Sci Eng* 46:369–417
- Kloskowski A, Pilarczyk M, Przyjazny A, Namiesnik J (2009) *Anal Chem* 39:43–58
- Augusto F, Carasek E, Silva RGC, Rivellino SR, Batista AD, Martendal E (2010) *J Chrom A* 1217:2533–2542
- Beltran A, Borrell F, Marcé RM (2010) *TrAC Trends Anal Chem* 29:1363–1375
- Hu Y, Pan J, Zhang K, Lian H, Li G (2013) *TrAC Trends Anal Chem* 43:37–52
- Moreno-Bondi MC, Navarro-Villoslada F, Benito-Pena E, Urraca JL (2008) *Curr Anal Chem* 4:316–340
- Shimizu KD, Stephenson CJ (2010) *Curr Opin Chem Biol* 14:743–750
- Malitesta C, Mazzotta E, Picca R, Poma A, Chianella I, Piletsky S (2012) *Anal Bioanal Chem* 402:1827–1846
- Cunliffe D, Kirby A, Alexander C (2005) *Adv Drug Delivery Reviews* 57:1836–1853
- Rathbone DL (2005) *Adv Drug Delivery Reviews* 57:1854–1874

19. Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, and subsequent updates, http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/inex_en.htm. and Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues, Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (last update 2009) http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp
20. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) *J AOAC Int* 86:412–431
21. Wilkowska A, Biziuk M (2011) *Food Chem* 125:803–812
22. Okutucu B, Onal S (2011) *Talanta* 87:74–79
23. Pichon V, Chapuis-Hugon F (2008) *Anal Chim Acta* 622:48–61
24. Chapuis F, Pichon V, Lanza F, Sellergren B, Hennion MC (2004) *J Chromatogr B* 804:93–101
25. Tom LA, Schneck NA, Walter C (2012) *J Chromatogr B* 909:61–64
26. Xu S, Li J, Chen L (2011) *Talanta* 85:282–343
27. Matsui J, Kubo H, Takeuchi T (1998) *Anal Sci* 14:699–702
28. Siemann M, Andersson LI, Mosbach K (1998) *J Agric Food Chem* 44:141–145
29. Piletska EV, Guerreiro AR, Whitcombe MJ, Piletsky SA (2009) *Macromolecules* 42:4921–4928
30. Martin P, Jones GR, Stringer F, Wilson ID (2003) *Analyst* 128:345–181
31. Andersson LI, Paprica A, Arvidsson T (1997) *Chromatographia* 46: 57–66
32. López MMC, Pérez MCC, García MSD, Vilarino JML, Rodríguez MVG, Losada L-FB (2012) *Anal Chim Acta* 721:68–78
33. Holland N, Frisby J, Owens E, Hughes H, Duggan P, McLoughlin P (2010) *Polymer* 51:1578–1584
34. Tang K, Chen S, Gu X, Wang H, Dai J, Tang J (2008) *Anal Chim Acta* 614:112–118
35. Xu ZF, Wen G, Kuang DZ, Zhang FX, Tang SP (2013) *J Environ Sci Health Part B* 48:336–343
36. Bakas I, Oujji NB, Moczko E, Istamboulie G, Piletsky S, Piletska E, Ait-Ichou I, Ait-Addi E, Noguier Rouillon TR (2013) *J Chromatogr A* 1274:13–18
37. Lv Y, Lin Z, Feng W, Zhou X, Tan T (2007) *Biochem Eng J* 36:221–229
38. Pap T, Horvai G (2004) *J Chromatogr B* 804:167–172
39. Corton E, García-Calzón JA, Díaz-García ME (2007) *J Non-Cryst Solids* 353:974–980
40. Umpleby RJ II, Baxter SC, Bode M, Berch JK Jr, Shah RN, Shimizu KD (2001) *Anal Chim Acta* 435:35–42
41. Rampey AM, Umpleby RJ, Rushton GT, Iseman JC, Shah RN, Shimizu KD (2004) *Anal Chem* 76:1123–1133



An emerging approach for the targeting analysis of dimethoate in olive oil: The role of molecularly imprinted polymers based on photo-iniferter induced “living” radical polymerization



Nuno Martins^a, Elisabete P. Carreiro^b, Marco Simões^b, Maria João Cabrita^c, Anthony J. Burke^b, Raquel Garcia^{a,*}

^a ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

^b Departamento de Química e Centro de Química de Évora, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, 59 7000 Évora, Portugal

^c Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, ICAAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2014

Received in revised form 1 November 2014

Accepted 13 November 2014

Available online 21 November 2014

Keywords:

Molecularly imprinted polymer (MIP)

Dimethoate

Controlled living free radical polymerization

(CLFRP)

Iniferter-route

ABSTRACT

This study concerns the first attempt to prepare molecularly imprinted polymers for the selective recognition of dimethoate using an iniferter polymerization technique (Inif-MIP). The synthesized polymers were fully characterized. SEM micrographs show a large accessibility to the binding sites with a significant improvement in MIP morphology. Inif-MIPs displayed high adsorption capacity ($Q = 5.3 \text{ mg g}^{-1}$). The selectivity of this imprinting system was also assessed by means of cross-selectivity assays and the results obtained show that Inif-MIP displays a high selectivity for dimethoate, whereas some structural analogues (omethoate, malathion and methidathion) are poorly retained (6.3–28.7%) or not retained at all (fenthion). Inif-MISPE methodology was implemented by packing Inif-MIPs particles into a Solid Phase Extraction (SPE) cartridge and the loading, washing and eluting steps were optimized. The suitability of this sample preparation technique was demonstrated, as concentrations of dimethoate close to the tolerated maximum residue limits in the olive oil samples could be satisfactorily analyzed with good precision and accuracy. Some remarkable characteristics, like the sorbent reusability (at least 20 cycles without the loss of selectivity), low solvent consumption, reduced sample handling and, moreover higher recovery rates reaching 88% could be ascribed to the Inif-MISPE methodology.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Organophosphorus pesticides (Fig. 1) are used in large quantities in the orchards in many Mediterranean countries. The widespread uses of organophosphorus pesticides, that act as cholinesterase inhibitors, are harmful to human health due to their potential mutagenicity and carcinogenic properties [1]. Since residues can persist until the harvest stage, trace amounts of these pesticides can be found in olive oil samples, making their detection mandatory. Nevertheless, an accurate trace analysis requires highly selective and reliable techniques to be applied.

However, the detection and quantification of pesticide residues in olive oil is a very challenging task because the background matrix components are present at much higher concentrations than those of the target pesticides. Furthermore, the presence of high fat contents can interfere in the quantification process and

can also damage the chromatographic systems used, thus hampering the accurate detection and quantification of trace levels of these contaminants. Ultimately, this makes it more difficult to reach the lower detection limits imposed by legislation [2]. Therefore, improvements in the detection and quantification of pesticide residues in fat rich food matrices are warranted, encompassing enhancements in the extraction and detection/quantification procedures. Recent studies have shown the promising role of molecularly imprinted polymers (MIPs) as selective sorbents for Solid Phase Extraction (MISPE), in the case of the selective extraction of pesticide residues from complex food samples [3,4]. Our research group is currently exploring the use of these materials as sorbents for the implementation of MISPE methodologies for trace analysis of pesticide residues in olive oil [5].

Molecular Imprinting Technology is a versatile and engineering way to create molecularly imprinted polymers (MIPs) possessing a polymer network with a predefined macromolecular memory for a specific target template molecule [6,7]. The inherent characteristics of MIPs, namely their robustness and ease of preparation as well as

* Corresponding author. Tel.: +351 266 760 869; fax: +351 266 760 828.

E-mail addresses: raquelg@uevora.pt, rmartagarcia@yahoo.com (R. Garcia).

the exceptional physical and chemical stability have contributed greatly to the expansion of this kind of technology which has been successfully applied to a wide variety of fields, such as chromatography [8,9], catalysis [10–12], solid-phase extraction [13], sensor technology [14,15] and drug delivery [16]. Besides radical polymerization being one of the most versatile chemical reactions for the development of MIPs, the high reactivity of free-radicals leads frequently to a large number of undesirable side reactions that result in the loss of molecular weight and polymer tacticity control [17]. Other disadvantages are related with poor binding and transport characteristics. Thus, the traditional techniques previously explored for the preparation of MIPs generally show low capacity and poor site accessibility for the target molecule [18]. Furthermore, particles of irregular shape through a low yielding crushing sieving process are generally obtained via traditional techniques [5,19]. Therefore, the synthesis of MIPs using controlled “living” radical polymerization (CLRP) techniques are much more desirable, due to the better control of these parameters, and affording more homogeneous polymer networks [17,20,21]. These methods improve the morphology of the crosslinked polymer networks by controlling polymer chain growth, polydispersity and tacticity, avoiding the formation of microgels which is a common feature with polymers produced by free radical polymerization (FRP). Moreover, considerable improvements with template recognition and delayed template transport processes have been observed with these types of polymer [17]. CLRP encompasses several polymerization techniques such as reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization, metal-catalyzed atom transfer radical polymerization (ATRP), nitroxide-mediated polymerization (NMP) and iniferter (*ini*-tiator, *trans-fer*, *ter*-minator) [22,23]. All these techniques which are generally carried out under mild conditions show good control over the polymer architectures, as well as broad applicability to a wide range of monomer substrates [24]. The living polymerization is characterized by reversible transformation of dormant species into reactive free radicals that act as chain propagators. In living polymerization the rate of initiation is significantly greater than the polymerization rate [25]. Among the CLRP methods, the iniferter-route is the most recent becoming one of the most popular photocontrolled polymerization techniques [26]. Its unique feature relies on the fact that the polymerization proceeds in a controlled manner since “active” and “dormant” propagating chain ends are reversibly equilibrated under ultraviolet light (UV) irradiation, as depicted in Fig. 2 [27,28]. The growing radical chain is reversibly deactivated forming a dormant species that suppresses the rapid propagation reaction, hence the polymeric network is formed under more favorable thermodynamic conditions. As illustrated in Fig. 2, *N,N,N',N'*-tetraethyl thiuram disulphide (TED), which is a molecule that encompasses two passive sulphur-based dormant radicals, acts as a chain terminator playing a crucial role in the control of the polymerization reaction. Moreover, TED is actively involved in the equilibrium between macro-radicals and passive radicals, leading to controlled increases in the polymer chain lengths and molecular weights of these imprinted systems, delaying any gelation phenomenon and keeping the discrete nanoparticles in a *sol* state [26].

Recently, the iniferter approach has been applied for the one-pot synthesis of narrow or monodisperse, highly crosslinked and “living” polymer microspheres [24,29,30]. Another promising application of the iniferter route includes the production of functionally imprinted composite materials by grafting of MIPs from iniferter agents in borosilicate glass [28], polystyrene or silica-based supports [4,25,31]. This polymerization strategy constitutes a robust general platform for controlled grafting and can potentially be exploited on applications that require a surface derivatization, namely sensors technology.

The implementation of SPE methodologies using Iniferter-MIPs as sorbents has never been attempted. The remarkable features of these sorbents allow performing more efficient extractions, leading to cleaner and more easily handled extracts being able to introduce high degree of selectivity in the sample preparation step, making it to perform trace analysis in very complex matrices.

These findings prompted us to investigate the usefulness of the new improved Inif-MIPs as sorbents in SPE applications for the trace analysis of pesticide residues in olive oil, in order to comply with the stringent current European Legislation [32].

With the aim of using “living” free radical polymerization (CLRP) for the development of well-defined molecularly imprinted polymers (MIPs) with predictable molecular composition and functionality, size and low polydispersity, we looked at the *initiator*-transfer agent-terminator (Inif-MIP) technique, for the selective extraction of dimethoate from olive oil matrices. The resultant porous materials were characterized both structurally (FTIR) and morphologically (SEM). Since the molecular recognition ability of these imprinted polymers for the target pesticide is crucial to achieve the main goal of this work, some molecular adsorption studies were performed in order to evaluate their selectivity for dimethoate. The occurrence of “cross-selectivity”, i.e., the capacity of these MIPs for “trapping” compounds structurally-closely related to the template molecule was also investigated. Furthermore, a Solid Phase Extraction (MISPE)-based procedure using Inif-MIP as sorbent has been developed, enabling a straightforward screening of dimethoate in spiked olive oil matrices.

To the best of our knowledge, this is the first report on the application of the photoiniferter-route for the synthesis of molecularly imprinted polymers selective for dimethoate.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Methacrylic acid (MAA) (the functional monomer), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) (the cross-linker), 1,1'-azobisisobutyronitrile (AIBN) (the initiator), *N,N,N',N'*-tetraethyl thiuram disulphide (the chain terminator agent) were purchased from Sigma-Aldrich and used as received without further purification. Acetonitrile for synthesis, acetic acid and methanol for MIP washing were obtained from VWR International. All the chemicals were used as received except acetonitrile that was dried by distillation. The analytical standards (organophosphorus pesticides) dimethoate, methidathion, omethoate, fenthion and malathion were purchased from Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA, USA) and were used without further purification. HPLC grade acetonitrile and methanol, dichloromethane, *n*-heptane and *n*-hexane were supplied by VWR International S.A.S. (Fontenay-Sons-Bois, France). The water used in all experiments was distilled and purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The 3 mL reservoir glass columns with their frits were purchased from Chromabond-Macherey-Nagel (Germany). For comparative pesticide recovery studies, Sep-Pak C18 Cartridges Vac 6 CC (1 g) (Waters, Ireland) was used. All samples were filtered through 13 mm syringe filters (w/ 0.45 µm PTFE membrane) (VWR, USA) prior to HPLC injection. Commercially available organic extra virgin olive oil was purchased from a local supermarket.

2.2. Instrumentation

A Hamamatsu L9588-06 Spot Light Source UV-lamp was used for the photo-polymerizations. The morphology of the synthesized copolymers was characterized using scanning electron microscopy

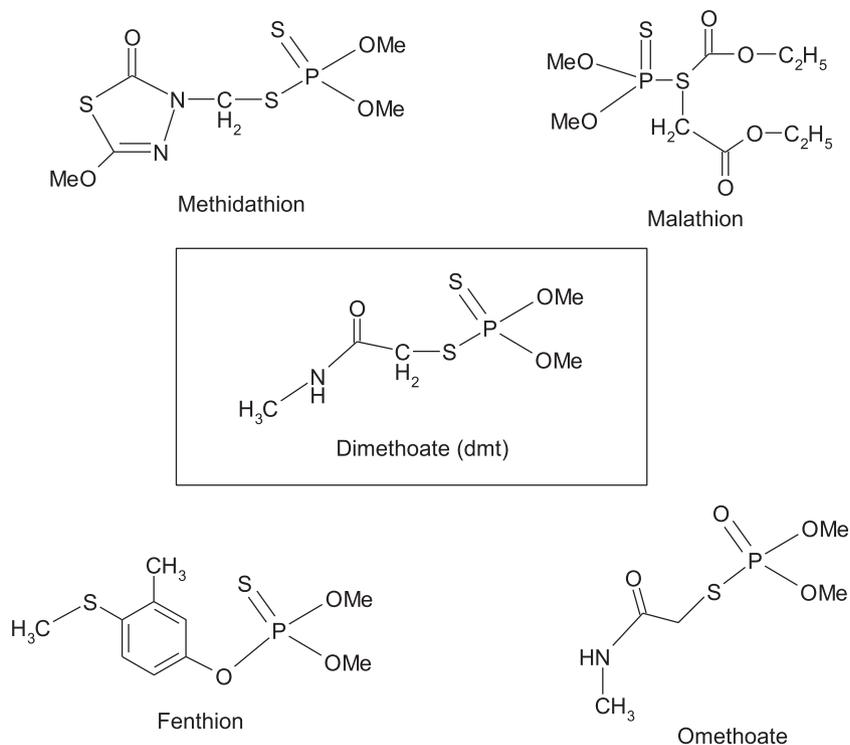


Fig. 1. Some pesticides belonging to the organophosphorus class.

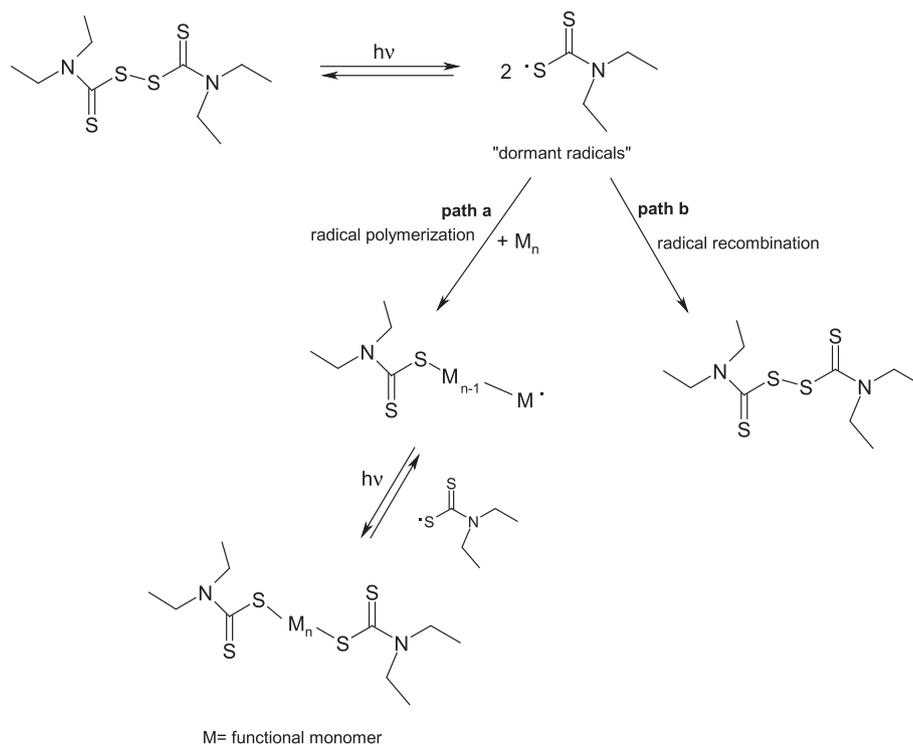


Fig. 2. Photoinduced radical generating reaction of chain terminator *N,N,N',N'*-tetraethyl thiuram disulphide (TED) and subsequent photocontrolled radical polymerization of functional monomer from the produced radical (path a) and recombination reaction between two radicals in the absence of monomer (path b).

(SEM) on a Hitachi S-3700N instrument, with an accelerating voltage set to 10 kV. For scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM/EDS) analysis an accelerating of 20 kV has been used. Samples were mounted on aluminium stubs using carbon tape and were gold coated. Fourier Transform

Infra-red Spectroscopy (FTIR) analysis measurements were performed on a PerkinElmer Spectrum Two infrared spectrophotometer. All the chromatographic measurements were performed using a HPLC Waters Alliance System 2695-series Separation Module equipped with Alliance Series Column Heater and the detection

was carried out using a photodiode array detector (2998 PDA Detector) (Waters, USA). Chromatographic experiments were carried out with a LiChroCART C18 Purospher STAR reverse phase column (250 × 4.6 mm ID, 5 μm) (Merck Millipore, Germany) and the detection has been performed in the range of 190–600 nm. Empower 3 FR2 software was used for management, acquisition and treatment of data.

2.3. Synthesis of molecularly imprinted polymers

Molecularly imprinted polymers (Inif-MIPs) were synthesized using a molar ratio of template, radical initiator, iniferter agent, functional monomer and cross-linker of 1:0.5:1:1:3, respectively. The methacrylic acid (42.5 μL, 0.5 mmol), ethylene glycol dimethacrylate (297 μL, 1.5 mmol), dimethoate (114 mg, 0.5 mmol) and acetonitrile (5 mL) were added successively to a 50 mL round-bottom flask with a magnetic stir bar at 0 °C. The chain terminator agent *N,N,N',N'*-tetraethyl thiuram disulphide (148.3 mg, 0.5 mmol) and 1,1'-azobisisobutyronitrile (41.05 mg, 0.25 mmol) (according to some literature reports AIBN has been used as an additional radical initiator [33,34]) were added afterwards to the reaction mixture. The mixture was stirred under a nitrogen atmosphere for 10 min on an ice bath, and then stirred under irradiation from the UV-lamp (at 240–400 nm). After 16 h, the solid-gel obtained, was precipitated with methanol. The particles were collected and washed extensively in a Soxhlet extractor with methanol/acetic acid solution (1:1 (v/v)) for 48 h, then with methanol for 24 h and dried at 60 °C. The above mentioned washing procedure has been optimized based on the HPLC–DAD analysis of the washing solution and ensures the removal of the residual template remaining in the polymer after their synthesis. The washing step with methanol is performed to remove the remaining acetic acid.

The non-imprinted polymers (NIP) were synthesized using the exact same procedure but in the absence of template.

2.4. Physical and morphological characterization

The morphological evaluation of the dimethoate-Inif-MIP (Inif-MIP) and the corresponding non-imprinted polymer was performed by scanning electron microscopy (SEM). The SEM analysis with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM/EDS) was used. EDS is a component of the system applied in conjunction with SEM analysis and used for determining the types of elements in or on the surface of the sample, giving both qualitative and semi-quantitative information. Physico-chemical characterization of the imprinted and non-imprinted systems (Inif-MIP and Inif-NIP) was achieved using spectroscopic analysis (FTIR).

2.5. Chromatographic evaluation

2.5.1. Molecular recognition studies

The molecular binding of Inif-MIP and Inif-NIP were evaluated by Solid Phase Extraction (MISPE) according to the following procedure: 30 mg of the imprinted or non-imprinted polymers were packed into 3 mL glass SPE cartridges between polyethylene frits to form a regular sorbent bed. Firstly, the cartridge was consecutively conditioned with 3 mL of methanol to remove impurities before use, followed by the addition of 5 mL of heptane. In the loading step, 1 mL of pesticide solutions in heptane containing known concentrations of the template were added to the MISPE cartridge (concentration range 8–500 mg L⁻¹), followed by the addition of 2 mL of heptane (washing step). Furthermore, the elution of dmt was performed with 2 mL of methanol and the fraction was collected and evaporated to dryness. The residue obtained was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analyzed with HPLC in order to measure the concentration of template absorbed on each

polymer. The amount of dmt adsorbed onto the polymers (Q) was determined using the following formula: $Q = Ca * V/m$, where Ca (mg mL⁻¹) is the concentration of template adsorbed, V (mL) is the sample volume and m (g) is the weight of the polymer used. The HPLC conditions employed for these rebinding measurements were as follows: the binary mobile phase consisted of solvents A (water) and B (acetonitrile) with the following gradient: 25–100% B from 0 to 7 min, then 100% B from 7 to 14 min, followed by 100–25% B from 19 to 24 min; The flow rate was fixed at 0.5 mL min⁻¹ during the entire chromatographic process. The injection volume was 25 μL; the temperature of 25 °C; DAD detection was done at 220 nm and the detection was set between 190 and 600 nm to monitor the UV–Vis spectra.

The experiments were conducted in triplicate and the average value taken.

2.5.2. Evaluation of the molecular selectivity of Inif-MIPs: “cross-selectivity” screening studies

In order to gain insights into the binding specificity of the imprinted system under study, “cross-selectivity” assays were undertaken using the MISPE methodology with some dimethoate analogues, namely omethoate, malathion, methidathion and fenitrothion. To perform these studies different solutions of 1 mL of heptane containing 50 mg L⁻¹ of each pesticide were loaded into SPE cartridges which were previously packed with 30 mg of the Inif-MIP or the corresponding Inif-NIP, washed with 2 mL of *n*-heptane and, next, eluted with 2 mL of MeOH. The elution fraction was evaporated to dryness, the residue obtained dissolved in 1 mL of acetonitrile and further analyzed by HPLC. Afterwards, the recovery rates for the different template analogues were determined.

The experiments were conducted in triplicate and the average value taken.

The chromatographic conditions used for these cross-selectivity screening studies were similar to the above mentioned conditions used for the molecular recognition evaluation.

2.6. Optimization of the Inif-MISPE procedure

The MISPE procedure was carried out using empty 3 mL SPE glass cartridges packed with 50 mg of either Inif-MIP or Inif-NIP particles. The amount of Inif-MIP and Inif-NIP used on the Inif-MISPE procedure has been enhanced when compared with the amount of those polymeric materials used on the chromatographic evaluation (Sections 2.5.1 and 2.5.2) due to the inherent complexity of the food matrix (olive oil). In order to optimize the extraction efficiency of the target pesticide, the effect of some parameters, namely the flow rate as well as the solvents used on the loading, washing and elution steps has been carefully evaluated. In these procedures, Inif-MIP and Inif-NIP SPE cartridges were previously conditioned with the solvent used in the loading step.

Firstly, in order to optimize the Inif-MISPE loading step, the effect of different solvents (heptane, dichloromethane and acetonitrile) and the loading volumes (1, 2, 3, 5 mL) on the performance of this imprinted system has been evaluated. To carry out these assays, a solution with known concentration of dimethoate in different solvents was loaded into the Inif-MIP/Inif-NIP SPE cartridges and the amount of un-retained pesticide determined by HPLC–DAD. Since, the occurrence of non-specific interactions could also take place during the loading process owing to the native adsorption ability of these imprinting systems is crucial that MISPE procedure encompasses a washing step. To perform its optimization, several solvents (heptane, dichloromethane and acetonitrile) and mixtures of these solvents were investigated. In the elution step methanol was chosen as the elution solvent. In order to evaluate the suitable elution volume, successive portions of 0.5 mL eluted solvent were collected from the cartridge and analyzed by

HPLC–DAD. Since the results showed that approximately 70% of dimethoate was contained within the first elution fraction, 1 mL of methanol was selected as the eluent volume in order to ensure the elution of the target analyte. The elution was performed at a flow rate of approximately 1 drop per second.

The chromatographic conditions used to perform these studies were the following:

A binary mobile phase consisted of solvents *A* (water) and *B* (acetonitrile) as follows: 25–100% *B* from 0 to 60 min, then 100% *B* from 60 to 65 min, followed by 100–25% *B* from 70 to 75 min; The flow rate was fixed at 0.4 mL min⁻¹ during the entire chromatographic process. The injection volume was 25 µL; a temperature of 25 °C; DAD detection was done at 220 nm.

2.7. Extraction of dimethoate from spiked olive oil samples by the Inif-MISPE procedure

SPE cartridges containing either Inif-NIP or Inif-MIP were previously conditioned with 4 mL of heptane. Immediately, aliquots of 1 g of organic extra virgin olive oil spiked with different known concentration of dimethoate in *n*-heptane ranging from 2 to 29 µg g⁻¹ were diluted in 10 mL of heptane and loaded onto the respective column. After, the SPE cartridge was washed with 2 mL of heptane containing 20% of dichloromethane and, further, the template was eluted with 3 mL of methanol. The elution was performed at a flow rate of approximately 1 drop per second. Then, the eluate was collected, evaporated to dryness and the residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analyzed by HPLC–DAD. The chromatographic conditions used are similar to those described above for the optimization of the MISPE procedure. The Inif-MIP and Inif-NIP cartridges were reconditioned with methanol (5 mL) followed by heptane (5 mL) and repeatedly reused at least 20 cycles.

The experiments were conducted in triplicate and the average value taken.

This study enabled us to evaluate the precision and accuracy of the MISPE column for the extraction of dimethoate from the spiked olive oil samples.

2.8. Comparative studies of MISPE with C18 commercial SPE cartridge

In order to compare the efficiency of the extraction as well as the recovery rates, a C18 commercial SPE cartridge was also used for the clean-up of olive oil samples spiked with dimethoate, following an experimental procedure described by Bakas and coworkers [36]. In this study, 1 g of commercial olive oil spiked with dimethoate (final concentration of 5.8 µg g⁻¹) was used. The chromatographic conditions used in this study were the same as those used for the MISPE extraction procedure.

2.9. Experimental validation (Calibration curves/repeatability)

The identification of each pesticide was achieved by comparison of its retention time and UV–Vis spectra with those of the corresponding standards. The quantification was determined by calculating the areas of the relevant chromatographic peaks obtained by UV detection at 220 nm using standard solutions of the pesticides with known concentrations. The analytical parameters for the calibration curves of these standard solutions are presented in the [Electronic Supplementary Material \(Table S1\)](#).

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of molecularly imprinted polymers

Dimethoate molecularly imprinted polymer (Inif-MIP) and non-molecularly imprinted polymers (Inif-NIP) were synthesized by

using the iniferter route. The synthesis was carried out with the functional monomer methacrylic acid (MAA), the cross-linker ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), and with the pesticide dimethoate (the template) in the case of the MIP, and in its absence in the case of the NIP (Fig. 3).

The photo-iniferter agent used for this photo-INIFERTER method was *N,N,N',N'*-tetraethyl thiuram disulphide (TED), which basically functions as a chain terminator agent [24,31,32]. Like what is described in Fig. 4, TED upon UV-irradiation decomposes into two dormant radical species, which are much more unreactive [33], but selective for endcapping than the nitrile radical generated from AIBN cleavage.

Following literature methods [34,35], we used 0.5 equivalents of AIBN as the radical initiator and TED as the chain terminator agent. In this process, that involves homolytic cleavage of the TED reagent (Fig. 4), the end-capping results most probably from the reaction of the sulphur based TED derived radicals, and not via reaction with the AIBN derived nitrile radicals. However, the presence of the TED chain terminator is essential in controlling the polymer chain length, and in the control of the homogeneity of the network structure leading to an increase in the number of template recognition sites [35]. The polymeric products were collected and washed by placing them in a Soxhlet extractor with methanol/acetic acid solution (1:1 (v/v)) for 48 h, and sequentially with methanol for 24 h. This was also necessary to remove the remaining AIBN residues or unreacted monomer starting materials. This is the common method for washing the MIPs, however the washing was continued until no residual template was observed in the elute solution by HPLC–DAD analysis. The polymers were all obtained as pale white solids.

In our synthetic method we used a (1:1) molar ratio of MAA:TED, the objective was to keep the concentration of the passive capping radicals equal to the monomer concentration and lower the possibility of recombination of the active monomers thus controlling the chain length, and forming a polymer with many recognition sites. Irradiation of the TED reagent increases the concentration of passive capping radicals [28]. The concentration of TED used in this work, was based on optimization studies carried out in another study on MIP synthesis using the same photo-INIFERTER strategy but with a different pesticide template [E.P. Carreiro, A.J. Burke, R. Garcia, unpublished results]. It was found in this study that the capacity of these synthesized MIPs for pesticide recognition decreased when lower TED concentrations were used. [E.P. Carreiro, A.J. Burke, R. Garcia, unpublished results].

3.2. Physical and morphological characterization

3.2.1. SEM and SEM/EDS studies

The morphology of the imprinting materials was analyzed by using scanning electron microscopy (SEM). The SEM images of Inif-MIP (Fig. 5) showed that the presence of template molecule results in the formation of regular smaller polymer microspheres with irregular aggregates, whilst, irregular and bigger aggregates without any distinct organization were observed in the case of the non-imprinted polymer (Inif-NIP), (Fig. 5). Accordingly, the scanning electron microscopy (SEM) micrograph of Inif-MIP, depicted in Fig. 5, shows what seems to be with the naked-eye a porous structure, with a lot of uniform cavities, having a size range between 374 and 455 nm. In the case of the Inif-NIP (Fig. 5), the image shows a more compact polymer with smaller cavities, between 289 and 386 nm.

Previously we have studied the formation of dimethoate-MAA-EGDMA MIP using a classical photopolymerization non-living polymerization synthetic technique [5], and on comparing the morphologies of both polymers on the basis of analysis of the SEM micrographs with the naked-eye, it seems that both have a porous

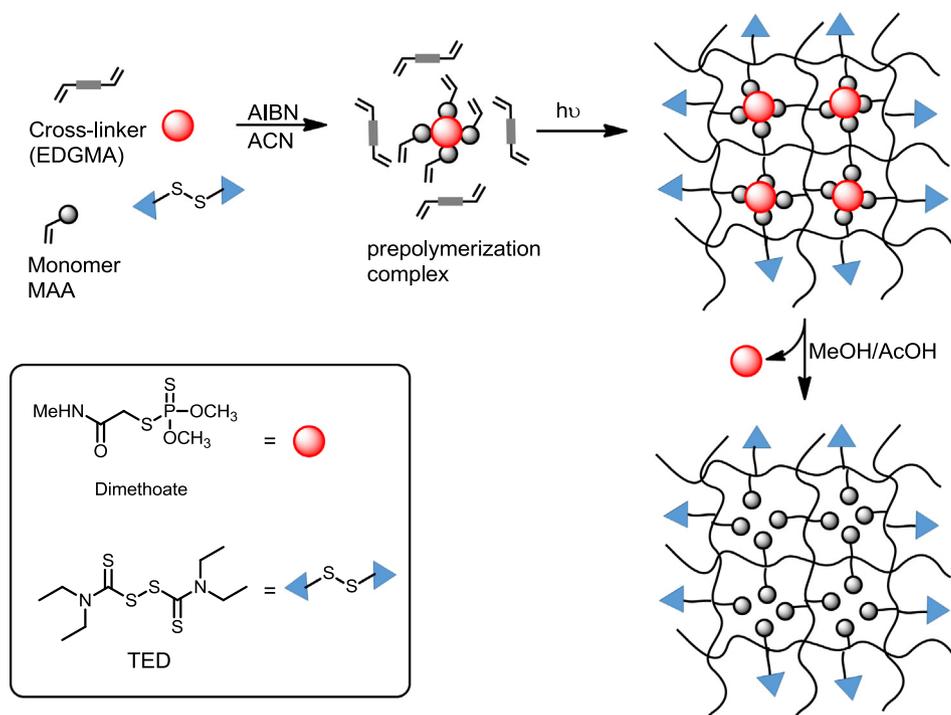


Fig. 3. Schematic representation of the dimethoate MIP synthesis via the iniferter route.

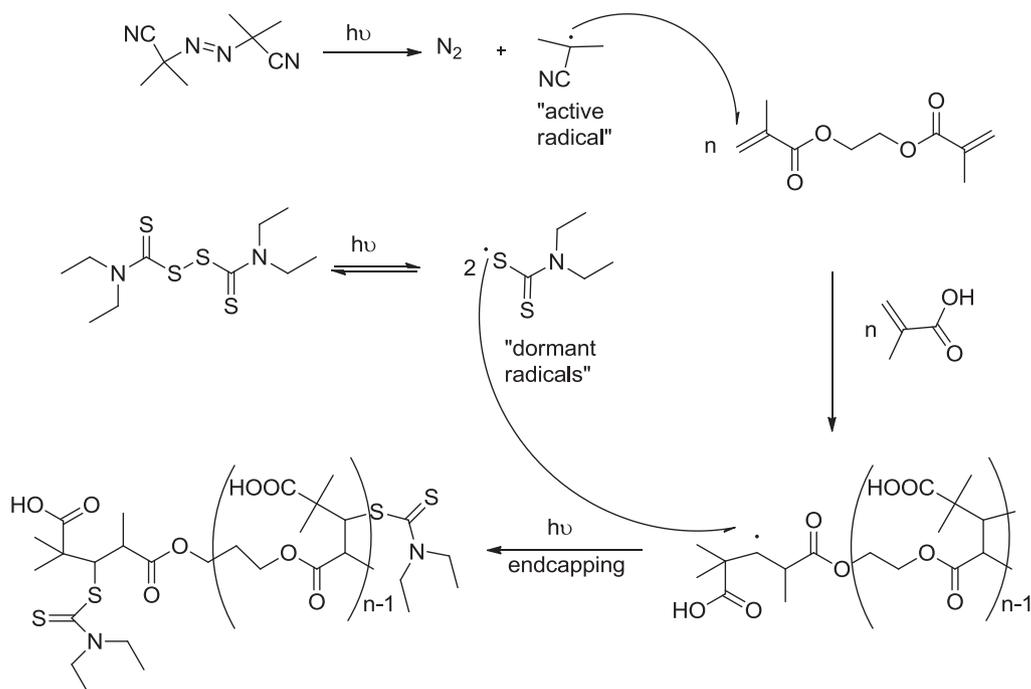


Fig. 4. Reaction of photo-INIFERTER radical polymerization of functional monomers from the produced nitrile radical of AIBN and photoinduced radical generating reaction of chain terminator *N,N,N',N'*-tetraethyl thiuram disulphide (TED) and subsequent endcapping termination step.

structure, although the previous MIPs appeared to show smaller sized cavities (55–110 nm). We also observed that the aggregates obtained via the modified photo-INIFERTER route are more aggregated than those obtained via the former technique. On this basis, one predicts that the latter seem to be more promising for analytical applications.

The SEM/EDS technique was used to determine the chemical composition and structure of these polymeric materials (Fig. 6).

We looked at the overall distribution of both nitrogen and sulphur, as they are constituents of the TED thiocarbamate the chain terminator. In the case of the Inif-MIP (Fig. 6), we observed that there are regions having higher concentrations of S and others higher concentrations of N. This seems to indicate distinct orientations of the TED end-cap units within the MIP polymer. In the case of the Inif-NIP (Fig. 6) we see that both elements are evenly distributed. In the case of the Inif-MIP it seems that the template has some role

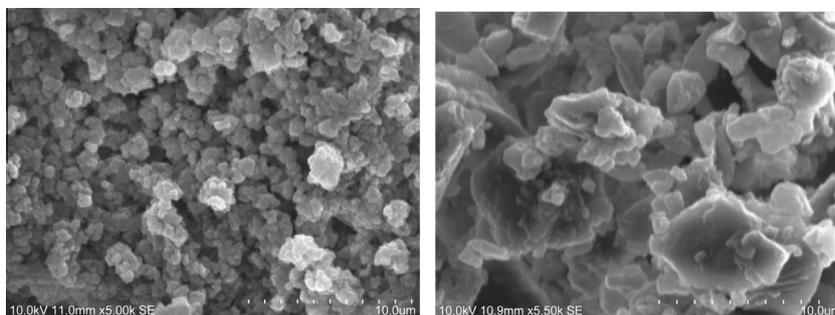


Fig. 5. SEM micrographs of Inif-MIP (left) and Inif-NIP (right) at 10 kV.

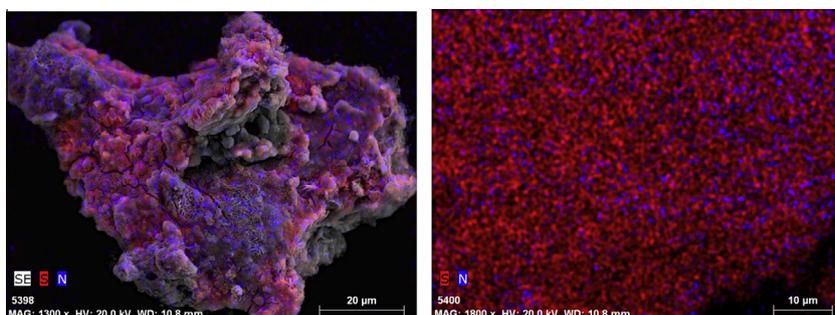


Fig. 6. Scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM/EDS) micrographs of Inif-MIP (left) and Inif-NIP (right).

in the arrangement of the TED end-caps, and thus there may be a correlation between the centres of high N and S concentrations and the cavity sites.

3.2.2. FTIR studies

The FTIR spectra of both the Inif-MIP and Inif-NIP polymers were very similar, and are clearly different from the template spectrum. The FTIR spectra are presented in [Electronic Supplementary Material \(Fig. S1\)](#). The intense bands at about 1725 cm^{-1} are undoubtedly attributed to C=O stretching and the very broad band at 3500 cm^{-1} corresponding to the O–H bond of the acrylic acid whilst that at *ca.* 3000 cm^{-1} can be attributed to the methyl C–H stretching frequency. The intense and strong band at *ca.* 1158 cm^{-1} is attributed to C=S bond (stretching mode) of the thio-carbamate iniferter agent.

3.2.3. Molecular recognition studies

We first used binding isotherms to evaluate the capacity of our MIP systems to recognize the template molecule. An adsorption isotherm experiment was carried out using dimethoate at concentrations in the range $8\text{--}500\text{ mg L}^{-1}$, aiming to assess the molecular recognition mechanisms of the imprinted (Inif-MIP) and non-imprinted (Inif-NIP) systems. The results obtained are schematically represented in [Fig. 7](#).

As depicted in [Fig. 7](#), the binding capacity of Inif-MIP increased quickly and continuously as the concentration increased. At 190 mg L^{-1} , the binding capacity became stable. This behavior is consistent with an adsorption–desorption equilibrium between Inif-MIP and the template, observing lower amounts of adsorbed template with lower concentrations of the pesticide. Increasing the concentration of dimethoate leads to greater occupancy of the recognition/binding sites until complete saturation is achieved. While the amount of dimethoate nonspecifically adsorbed on the Inif-NIP increased slowly with the concentration of dimethoate from 8 mg L^{-1} to 140 mg L^{-1} reaching a saturation concentration of dimethoate above 140 mg L^{-1} . Thus, as expected, the Inif-NIP

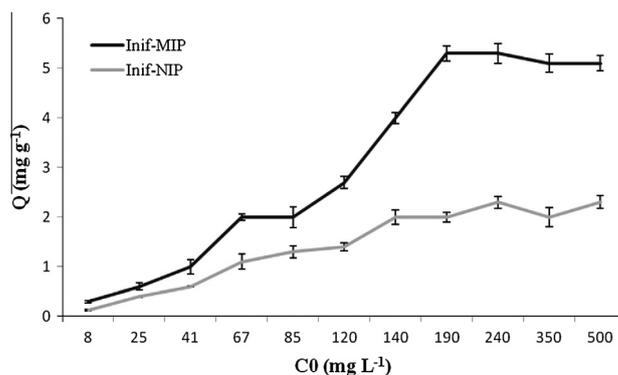


Fig. 7. Binding isotherms of Inif-MIP and Inif-NIP. Error bars represent the standard error ($n = 3$).

showed lower binding capacity values, since no selective recognition sites are present.

These molecular recognition studies allowed us to estimate the maximum amount of dimethoate that can be retained on the Inif-MIP. Thus, the adsorption capacity of Inif-MIP was determined to be 5.3 mg g^{-1} , which is a relatively high value comparing to those obtained for the MIP prepared by traditional polymerization technique ($Q_{\text{max}} = 4.0\text{ mg g}^{-1}$) in our previous work [5], indicating that the photoiniferter polymerization technique is an effective way to create a tridimensional polymeric structure with improved adsorption capacity. This result is consistent with the SEM micrograph of Inif-MIP that reveals the presence of significant amounts of micropores allowing better accessibility of the pesticide to template binding sites.

3.2.4. Evaluation of molecular selectivity of Inif-MIP: “cross-selectivity” screening studies

The most promising feature of MIPs is the improvement in the extraction selectivity as they are able to retain specifically only the

target pesticides from a complex matrix. However, the MIP can also extract compounds structurally-analogous to the template, a phenomenon designated “cross-selectivity”. Its occurrence leads to relatively dirty extracts hindering an accurate determination of pesticide residues at trace levels. Since “cross-selectivity” is an issue of particular concern on molecularly imprinted polymers, the implementation of selectivity assays with some dimethoate analogues is crucial. Thus, the selectivity of Inif-MIP was investigated using some pesticides belonging to the organophosphorus class, including omethoate, malathion, methidathion and fenthion. In Table 1 are summarized the data obtained in the selectivity studies comprising the recovery rates (%) of the selected organophosphorus pesticides after MISPE washing and elution steps, the adsorption capacity including the imprinting factors of these imprinted systems.

The results indicated that omethoate, malathion and methidathion are more poorly retained in Inif-MIP even using concentrations of 0.05 mg mL⁻¹ with values ranging from 28.7% to 6.29%, while fenthion was not retained at all.

For all the analogues, omethoate displayed the highest binding on Inif-MIP since this compound shares a more similar structure frame with dimethoate.

In the case of fenthion, the inability of Inif-MIP to retain this compound could be attributed to a shape/size structural effect and probably to steric hindrance due to the benzene ring in the pesticide's structure.

Some “cross-selectivity” studies have also shown that the complementary match of “cavity” (site) with template molecule in size and shape contributes to the recognition ability of MIPs. The formation of hydrogen-bonds between the template and the relevant MIP site, cannot be overlooked as well [37].

The imprinting factor which was defined as the ratio of the amount of template molecule adsorbed on Inif-MIP to that on Inif-NIP was 3.6 for dimethoate, indicating high specific recognition of the synthesized MIP for this analyte. It should be noted that this synthetic procedure has induced a “dimethoate-memory” into Inif-MIP since it is able to perform the selective recognition of this template even in presence of some structurally related compounds, like omethoate.

3.3. Extraction of dimethoate from olive oil by Inif-MISPE procedure

To demonstrate the potential of Inif-MIP in selective preconcentration and extraction of dimethoate from olive oil samples, improvements on Inif-MISPE procedure were performed and applied to the isolation of the target analyte of olive oil samples spiked with dimethoate. To perform these assays, an optimized Inif-MISPE procedure (described in the experimental section) was implemented encompassing the optimization of loading, washing and elution steps.

Table 1

Recovery rates (%) of different dimethoate structural analogues in Inif-MISPE- and Inif-NISPE columns obtained after loading with 1 mL of 50 mg L⁻¹ of the corresponding pesticide solution in *n*-heptane, washing with 2 mL of *n*-heptane and elution with 2 mL of MeOH and the corresponding adsorption capacity and imprinting factors.

Analytes	Recovery rates (%)		Q (mg g ⁻¹)		α^a
	MIP	NIP	MIP	NIP	
Dimethoate	70.00	21.70	1.1	0.3	3.6
Omethoate	28.70	20.00	0.5	0.3	1.7
Malathion	9.60	n.d. ^a	0.2	–	–
Methidathion	6.29	4.30	0.1	0.07	1.4
Fenthion	n.d.	n.d.	–	–	–

n.d. – Not detectable.

^a Imprinting factor, $\alpha = Q_{\text{MIP}}/Q_{\text{NIP}}$, Q_{MIP} and Q_{NIP} are the adsorption capacity of the template or the analogues on MIP an NIP, respectively.

Firstly, the solvent polarity on the retention of the template in the Inif-MISPE column was evaluated in order to determine the most suitable loading solvent for the MISPE procedure. Different loading solvents—heptane, dichloromethane and acetonitrile, were tested, and the quantity of retained template measured using HPLC–DAD. This study revealed that the use of polar solvents, like acetonitrile give the lowest retention of dimethoate (15%) within the MIP structure, most probably due to the high solubility of dimethoate in polar solvents. In the case of dichloromethane, a poor retention of 25% was obtained. Conversely, the use of the apolar solvent heptane allowed all the template to be retained in the Inif-MIP, suggesting that the strongest interactions between the imprinting system and the template are achieved in apolar solvents (this of course makes sense, as the hydrogen-bonding interactions between the binding site walls, with COOH groups, and the template becomes more effective). Thus, heptane was chosen as loading solvent. In the case of apolar loading solvents, the performance of the Inif-MISPE column was not influenced by the solvent volume.

One of the most demanding tasks on the MISPE procedure was the selection of a suitable washing solvent which would allow the selective removal of non-specifically bonded interfering compounds contained in the complex olive oil matrix. However, one had to ensure that the dimethoate specifically bonded to the MIP was not eluted in this step, and that a reasonable separation between the template molecule and the interfering compounds was achieved. A screening study with several solvents like heptane, acetonitrile, dichloromethane and mixtures of these solvents, followed by HPLC–DAD analysis of the washing fractions was conducted. The use of acetonitrile as washing solvent leads to a full recovery of dimethoate suggesting that this polar solvent allows the elimination of both specific and non-specific interactions between dimethoate and the imprinting material. A heptane/dichloromethane (80:20 (v/v)) mixture gave the best results, and was thus chosen as the washing solvent. In the elution step, methanol was selected as eluent since it provides efficient recoveries of the template molecule. A typical HPLC chromatogram of eluting fraction from Inif-MISPE for dimethoate spiked olive oil sample at concentration of 29 $\mu\text{g g}^{-1}$ is depicted in Fig. 8. The presence of a peak at 19.3 min on the HPLC chromatogram is assigned to dimethoate based on the comparison of the UV–Vis spectra with those of the standard compound. In order to ensure a reasonable separation of the dimethoate from other interfering compounds present in eluting fraction from Inif-MISPE, an optimization of the HPLC chromatographic method has been performed, as described in Section 2.6. Despite the presence of some interfering compounds, the developed methodology based on Inif-MISPE enables an efficient preconcentration and separation of the target analyte from the complex olive oil matrix, without the need for previous sample preparation enabling the quantification of dimethoate even at trace levels.

For comparative purposes, the extraction of the analyte from spiked olive oil samples using Inif-NIP was also evaluated (Fig. 8). It was found that there was no detectable dimethoate in the non-imprinted SPE.

Afterwards, the Inif-MISPE procedure was applied to the isolation of the target analyte of olive oil samples spiked with dimethoate (Table 2). As the maximum residue limit (MRL) for dimethoate in olive products is 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ [32], this amount was chosen as the lowest concentration under study. However, in this study we have also investigated the recovery rates obtained for concentrations of dimethoate until 29 $\mu\text{g g}^{-1}$ in order to gain insights about the performance of the imprinting system for concentrations much higher than the MRL. The recovery rates obtained after Inif-MISPE purification and chromatographic analysis of dimethoate extracted from spiked olive oil samples are shown in Table 2. Very reasonable recovery rates ranging from 70% to 88% were observed. The

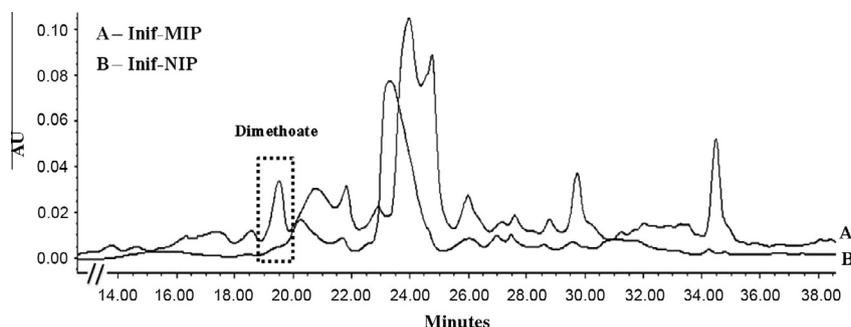


Fig. 8. HPLC/DAD chromatograms (MIP (A) and NIP (B)) of dimethoate after MISPE pretreatment of olive oil sample spiked with $29 \mu\text{g g}^{-1}$ of dimethoate. Retention time of dimethoate: 19.3 min.

Table 2

Precision and accuracy of the MISPE column for the extraction of dimethoate from spiked olive oil samples.

Spiked concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentration of bound pesticide \pm SD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Recovery rates (%)
29	18.5 ± 0.7	3.8	63.8
14.4	10.7 ± 0.9	8.4	73.8
5.8	5.1 ± 0.4	7.8	87.9
4.3	3.10 ± 0.07	2.3	72.1
2.9	2.5 ± 0.21	8.4	86.2
2.0	1.4 ± 0.14	10	70

Three replicates for each concentration were made ($n = 3$).

^a Average \pm standard deviation (SD).

^b Variant coefficient (RSD).

accuracy and precision of dimethoate extraction by Inif-MISPE column are summarized in Table 2.

3.4. Stability and reusability of the Inif-MISPE column

It is well recognized that these imprinted materials show remarkable stability to harsh chemical and physical conditions and thus having excellent reusability [38]. In fact, on the implementation of Inif-MISPE as an analytical sample preparation methodology the regenerative capacity of MISPE column plays a key role and is crucial for their reusability. This particular feature has been assessed by carrying out repetitive assays (at least 20) to measure the rebinding capacity of Inif-MISPE column as well as the recovery rate. A complete removal of the template from the imprinting material between the several assays has been carefully assured (by HPLC analysis) as it affects the performance of MIP in subsequent cycles. The data displayed a high reproductibility highlighting the reusability of the Inif-MISPE column over several cycles (at least 20 cycles) without loss of adsorption capacity and selectivity. Particularly, for the concentration of dimethoate corresponding to the MRL a recovery rate of $70.9 \pm 0.6\%$ ($n = 20$) was obtained.

3.5. Comparative studies of MISPE with C18 commercial SPE cartridges

In order to compare the performance of Inif-MISPE with common C18 SPE columns in the extraction of dimethoate spiked olive oil samples (spiked concentration of $5.8 \mu\text{g g}^{-1}$), an analytical methodology comprising a liquid–liquid extraction (LLE) followed by purification using a C18 SPE column was performed. The eluting fraction was analyzed by HPLC–DAD to quantify the dimethoate that was present. However, the use of conventional reverse phase

SPE gave a recovery rate that was less (30%) than that obtained with Inif-MIPs (88%). Moreover, the chromatographic analysis using SPE gave a more dirty extract owing to the co-extraction of many interfering compounds. This is in agreement with other studies [36,39]. Classic SPE sorbents lack selectivity, thus the retention of analytes is essentially governed by non-selective hydrophobic interactions leading to the co-extraction of many interfering substances. To minimize this phenomenon, generally the SPE step is preceded by a previous step of sample extraction, like LLE, which was used in this study. Therefore, on comparing the two extraction methods the superior suitability of the Inif-MISPE polymers as selective SPE sorbents for the determination of dimethoate is obvious: as it gives better recovery rates and cleaner extracts. Furthermore, the use of Inif-MISPE as the sample preparation methodology is less-time consuming and requires less sample-handling. Altogether, all these features justify the widespread use of MIPs on the development of more selective extraction methodologies.

4. Conclusions

In summary, the improvements on adsorption properties with Inif-MIPs highlights the potential of combining molecularly imprinted technology with the modern iniferter polymerization technique for the design of “tailor made” recognition matrices for the isolation of pesticide residues from highly complex food matrices. The Inif-MISPE proves to be a reliable and efficient sample preparation methodology enabling the pre-concentration of dimethoate from olive oil spiked samples allowing detection and quantification of this pesticide at the lowest MRL levels. The methodology described in this report can be applied to a host of other templates making it an exceedingly versatile procedure.

Acknowledgements

This work has been supported by FEDER and National funds, through the Programa Operacional Regional do Alentejo (InAlentejo) Operation ALENT-07-0262-FEDER-001871/Laboratório de Biotecnologia Aplicada e Tecnologias Agro-Ambientais and FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors – COMPETE and National Funds through FCT – Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEST-C/AGR/UI0115/2011 and PEST-OE/QUI/UI0619/2011 and Project PTDC/AGR-ALI/117544/2010. Elisabete P. Carreiro thanks the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for a post-doctoral research fellowship (SFRH/BPD/72182/2010). Laboratory HERCULES at the University of Évora is acknowledged for the SEM analyses.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.11.003>.

References

- [1] T.C. Marrs, *Pharm. Therap.* 58 (1993) 51–66.
- [2] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, *Talanta* 79 (2009) 109–128.
- [3] A. Beltran, F. Borrull, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1363–1375.
- [4] A. Martín-Esteban, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 169–181.
- [5] M. Simões, N. Martins, M.J. Cabrita, A.J. Burke, R. Garcia, *J. Polym. Res.* 21 (2014) 368–380.
- [6] G. Wulff, *Angew. Chem. Intern. Ed.* 34 (1995) 1812–1832.
- [7] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1742–1778.
- [8] R.J. Ansell, D. Kriz, K. Mosbach, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996) 89–94.
- [9] O. Nunez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298–323.
- [10] G. Wulff, *Chem. Rev.* 1092 (2002) 1–27.
- [11] C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, *Tetrahedron* 59 (2003) 2025–2057.
- [12] A. Corma, *Mat. Sci. Eng.* 46 (2001) 369–417.
- [13] E. Turiel, A. Martín-Esteban, *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 87–99.
- [14] K.D. Shimizu, C.J. Stephenson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 743–792.
- [15] C. Malitesta, E. Mazzotta, R. Picca, A. Poma, I. Chianella, S. Piletsky, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1827–1846.
- [16] F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, O.I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, *Expert Opin. Drug Deliv.* 8 (2011) 1379–1393.
- [17] V.D. Salián, M.E. Byrne, *Macromol. Mat. Eng.* 298 (2013) 379–390.
- [18] Y. Chen, M. Kele, P. Sajonz, B. Sellergren, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 71 (1999) 928–938.
- [19] R. Garcia, M.J. Cabrita, A.M.C. Freitas, *Am. J. Anal. Chem.* 2 (2004) 16–25.
- [20] V.D. Salián, C.J. White, M.E. Byrne, *React. Funct. Polym.* 78 (2014) 38–46.
- [21] V.D. Salián, M.E. Byrne, *J. Appl. Polym. Sci.* 130 (2013) 3588–3599.
- [22] K. Haupt, A.V. Linares, M. Bompert, B.T.S. Bui, *Top. Curr. Chem.* 325 (2012) 1–28.
- [23] H. Zhang, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 579–600.
- [24] M. Zhao, H. Zhang, F. Ma, Y. Zhang, X. Guo, H. Zhang, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 51 (2013) 1983–1998.
- [25] B. Ruckert, A.J. Hall, B. Sellergren, *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 2275–2280.
- [26] T. Otsu, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 38 (2000) 2121–2136.
- [27] Y. Nemoto, Y. Nakayama, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 46 (2008) 4505–4512.
- [28] A. Bossi, M.J. Whitcombe, Y. Uludag, S. Fowler, I. Chianella, S. Subrahmanyam, I. Sanchez, A.S. Piletsky, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2149–2155.
- [29] J.Y. Li, B.Y. Zu, Y. Zhang, X.Z. Guo, H.Q. Zhang, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 48 (2010) 3217–3228.
- [30] S. Subrahmanyam, A. Guerreiro, A. Poma, E. Moczko, E. Piletska, S. Piletsky, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 100–105.
- [31] F. Barahona, E. Turiel, P.A.G. Cormack, A. Martín-Esteban, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 48 (2010) 1058–1066.
- [32] European Food Safety Authority, *EFSA J.* 9 (2011) 2146.
- [33] A.R. Kannurpatti, S. Lu, G.M. Bunker, C.N. Bowman, *Macromolecules* 29 (1996) 7310–7315.
- [34] N.A. Peppas, J.H. Ward, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1587–1597.
- [35] A.D. Vaughan, S.P. Sizemore, M.E. Byrne, *Polymer* 48 (2007) 74–81; V.D. Salián, Understanding the impact of reaction parameters on macromolecular structure, and the binding and transport properties of imprinted crosslinked polymers (Ph.D. thesis), Auburn University, Alabama, 2012.
- [36] I. Bakas, N.B. Oujji, E. Moczko, G. Istamboulie, S. Piletsky, S. Piletska, E. Ait-Addi, I. Ait-Ichou, T. Noguier, Rouillon, *J. Chromatogr. A* 1274 (2013) 13–18.
- [37] S. Xu, J. Li, L. Chen, *Talanta* 85 (2011) 282–289.
- [38] O. Ramstrom, K. Skudar, J. Haines, P. Patel, O. Bruggemann, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2105–2114.
- [39] I. Bakas, N.B. Oujji, E. Moczko, G. Istamboulie, S. Piletsky, E. Piletska, I. Ait-Ichou, E. Ait-Addi, T. Noguier, R. Rouillon, *Anal. Chim. Acta* 734 (2012) 99–105.

Electronic Supplementary Material

An emerging approach for the targeting analysis of Dimethoate in Olive Oil: the role of Molecularly Imprinted Polymers based on Photo-Iniferter Induced “Living” Radical Polymerization

Nuno Martins^a, Elisabete P. Carreiro^b, Marco Simões^b, Maria João Cabrita^c, Anthony J. Burke^b, Raquel Garcia^{a,*}

^aICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

^bDepartamento de Química e Centro de Química de Évora, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, 59 7000 Évora, Portugal.

^cDepartamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, ICCAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

*Corresponding author. Tel.: +351-266-760-869; fax: +351-266-760-828. E-mail addresses: raquelg@uevora.pt, rmartagarcia@yahoo.com

(1) Supplementary Figures (SF)

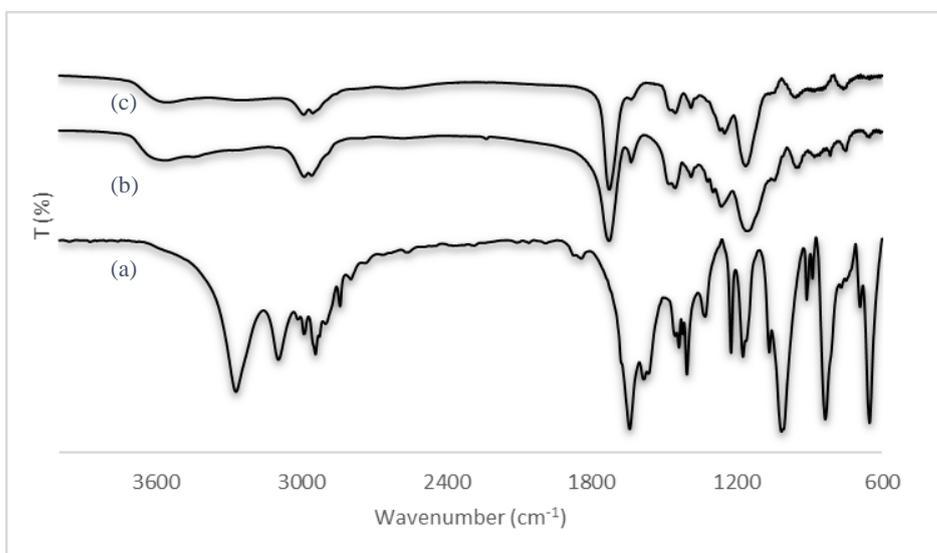


Figure S1. FTIR spectra of (a) dimethoate template, (b) Inif-NIP and (c) Inif-MIP.

(2) *Supplementary Tables (ST)*

Table S1. Statistical data for the calibration curves for all the pesticides studied.

Standard	Wavelength (nm)	Intercept	Slope	Correlation coefficient (r²)	Linear range (mgL⁻¹)	LOD^a (mgL⁻¹)	LOQ^b (mgL⁻¹)
Dimethoate	220	-5615.9	3×10 ⁷	0.9998	1-100	1.6	5.2
Dimethoate	220	-125493	3×10 ⁷	0.9994	100-600	13	45
Omethoate	220	3530.1	1×10 ⁷	0.999	8-60	23	7
Malathion	220	7023.1	2×10 ⁷	1	4-60	0.053	1.6
Methidathion	220	31184	7×10 ⁷	1	1.4-60	0.36	1.1
Fenthion	220	14560	7×10 ⁷	0.9996	0.5-64	2	5.9

All experiments were conducted in triplicate, and the average value taken; ^amultiplying the standard deviation by a factor of 3; ^bmultiplying the standard deviation by a factor of 10.

Raquel Garcia¹
Nuno Martins¹
Elisabete P. Carreiro²
Marco Simões^{2,3}
Maria M. L. Ribeiro Carrott^{2,3}
Peter J. M. Carrott^{2,3}
Anthony J. Burke^{2,3}
Maria João Cabrita⁴

Research Article

Development of a selective sorbent for the solid-phase extraction of terbuthylazine in olive oil samples: A molecular imprinting strategy

¹ICAAM Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Évora, Portugal

²Centro de Química de Évora, IIFA, Universidade de Évora, Colégio L. A. Verney, Évora, Portugal

³Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Colégio L. A. Verney, Évora, Portugal

⁴Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, ICAAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Évora, Portugal

Received November 13, 2014
Revised January 7, 2015
Accepted January 12, 2015

Aiming to implement an analytical methodology that is highly selective for the extraction and quantification of terbuthylazine from olive oil, we successfully achieved: (i) the development of a molecularly imprinted polymer by bulk polymerization using terbuthylazine as template molecule, methacrylic acid as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as cross-linker, and dichloromethane as porogen; (ii) characterization of the imprinting material using Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, nitrogen adsorption at 77 K, and scanning electron microscopy; (iii) their molecular recognition for the template molecule using high-performance liquid chromatography, and (iv) optimization of a solid-phase extraction procedure using as sorbent the synthesized molecularly imprinted polymer for the selective extraction and clean-up of terbuthylazine from spiked organic olive oil and further quantification of the pesticide levels by high-performance liquid chromatography. The suitability of the implemented analytical methodology was demonstrated, as concentrations of terbuthylazine below the tolerated maximum residue limits in the spiked organic olive oil samples could be satisfactorily analyzed with good precision/accuracy with high recovery rates (96%). Overall, the implemented methodology has proven to be reliable and robust and is highly promising in the field of sample preparation, particularly for the isolation/preconcentration of terbuthylazine in complex food samples.

Keywords: Molecularly imprinted polymers / Olive oil / Solid-phase extraction / Terbuthylazine
DOI 10.1002/jssc.201401263



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

1 Introduction

The analysis of pesticide residues in food samples still persists as an emerging issue in the field of Food Safety due to the possible long-term effects on the human health at even low levels of pesticides [1]. Thus, it is of great relevance the development of accurate, robust, and reliable analytical methodologies that enable the quantification of those contaminants at trace levels. Particularly, in highly complex food matrices this task could be very challenging and most often requires prior extraction of the target analyte from the matrix affording,

simultaneously, the preconcentration and clean-up in a single procedure. Among extraction procedures, SPE is the most common sample preparation methodology mainly due to its broad applicability despite the lack of selectivity [2, 3]. Ideally, an SPE sorbent should be capable of enriching the target molecule (e.g. pesticide residues) with high concentration factors, while leaving other interfering substances, which are usually present at levels much higher than those of the targeted pesticide in the sample matrix. The design of selective sorbents that possess a predefined affinity and molecular recognition for the target pesticide seems to play a key role and, undoubtedly, their application as SPE sorbents enables to achieve significant improvements during the extraction and preconcentration of the pesticide residues from food samples [4]. Therefore, the application of molecularly imprinted polymers (MIPs) as sorbents in SPE has attracted considerable attention since those materials are specially designed to offer highly selective recognition for specific templates, in addition to other properties, such as reusability and high stability in harsh chemical media [5–10]. Molecular imprinting technology is an artificial methodology for the

Correspondence: Dr. Raquel Garcia, Pólo da Mitra-Apartado 94, Évora 7002-554, Portugal
E-mail: raquelg@uevora.pt, rmartagarcia@yahoo.com
Fax: +351-266-760-828

Abbreviations: BET, Brunauer–Emmett–Teller; EGDMA, ethylene glycol dimethacrylate; MAA, methacrylic acid; MIP, molecularly imprinted polymer; MISPE, molecularly imprinted solid-phase extraction; MRL, maximum residue limit; NIP, nonimprinted polymer; TGA, thermogravimetric analysis

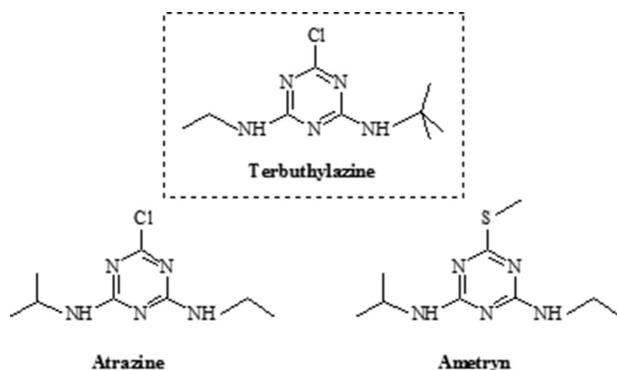


Figure 1. Chemical structures of terbuthylazine, atrazine, and ametryn.

production of polymers with special selectivity, which mimics the molecular recognition function of natural antibodies. MIPs as SPE sorbents have been used across a wide range of application areas, namely, in food matrices [11–14], biological samples [6], and environmental pollutants [15], highlighting the promising and versatile nature of these imprinting materials.

The use of selective sorbents on SPE applications is particularly relevant in highly complex food matrices since selectivity is significantly improved as the interfering background can be reduced and much lower detection limits are achievable. Our research group is currently exploring the use of these imprinting materials as selective sorbents for the implementation of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) methodologies for trace analysis of pesticide residues in highly complex food matrices [16].

The application of pesticides for crop protection can determine the presence of residues in olives that may persist up to the harvest stage, causing the possible presence of trace amounts of pesticide residues in olive oil [1]. The triazines (Fig. 1) constitute one of the most widely employed herbicides in the world. It is reported that some triazine herbicides are possible carcinogenic [17].

The development of molecularly imprinted polymers selective for triazines for the trace analysis of those contaminants in food matrices has been mainly focused on atrazine [18–22]. Otherwise, few studies have been devoted to the trace analysis of terbuthylazine in food matrices based on the use of selective sorbents produced by molecular imprinting technology [23].

The main goal of this work was to implement a highly selective analytical methodology that enables the extraction and quantification of trace levels of terbuthylazine in spiked organic olive oil samples. Therefore, this research work encompasses: (i) the development of an analytical methodology comprising SPE using MIPs as selective sorbents (MISPE); (ii) evaluation of the potential of MISPE methodology for the trace enrichment of terbuthylazine from spiked organic olive oil samples to assess the matrix effect; and (iii) further comparison of the implemented MISPE methodology with SPE with conventional sorbents, such as C_{18} -SPE.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Methacrylic acid (MAA) (the functional monomer), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; cross-linker), 1,1'-azobisisobutyronitrile (initiator), were purchased from Sigma–Aldrich, dichloromethane for synthesis and acetic acid and methanol for MIP washing were obtained from Merck. All the chemicals were used as received except dichloromethane that was dried by distillation. HPLC-grade acetonitrile and methanol, *n*-heptane and dichloromethane were supplied by VWR International (Fontenay-Sons-Bois, France). The water used in all experiments was distilled and purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The analytical standards terbuthylazine, atrazine, and ametryn were purchased from Sigma–Aldrich (Bellefonte, PA, USA) and were used without further purification. For comparative pesticide recovery studies, Sep-Pak C_{18} Cartridges Vac 6 CC (1 g; Waters, Ireland) were used. Before HPLC injection all samples were filtered through 13 mm syringe filters (w/ 0.45 μ m PTFE membrane; VWR, USA). The organic extra virgin olive oil was purchased from a local supermarket.

2.2 Instrumentation

A Hamamatsu L9588–06 Spot Light Source UV-lamp was used for the photo-polymerizations. The morphology of the synthesized copolymers was characterized using SEM on a Hitachi S-3700N instrument, with an accelerating voltage set to 10 kV. Samples were mounted on aluminium stubs using carbon tape and were gold coated. FTIR spectroscopy analysis measurements were performed on a PerkinElmer Spectrum Two IR spectrophotometer. Nitrogen adsorption measurements were performed at 77 K, on an Autosorb iQ from Quantachrome Instruments. Thermogravimetric analysis (TGA) measurements were carried out on a Perkin Elmer STA6000 under a He flow of 20 $\text{cm}^3/\text{min}^{-1}$ and heating rate of 20°C min^{-1} . All the chromatographic measurements were performed using a HPLC Waters Alliance System 2695-series Separation Module equipped with Alliance Series Column Heater and the detection was carried out using a photodiode array detector (2998 PDA Detector; Waters, USA). Chromatographic experiments were carried out with a LiChroCART C_{18} Purospher STAR reverse phase column (250 \times 4.6 mm id, 5 μ m; Merck Millipore, Germany) and the detection/quantification has been performed at 220 nm. Empower 3 FR2 software was used for management, acquisition, and treatment of data.

2.3 Synthesis of molecularly imprinted polymers

The synthesis was carried out using a modified method [23–26], with the functional monomer MAA, the cross-linker

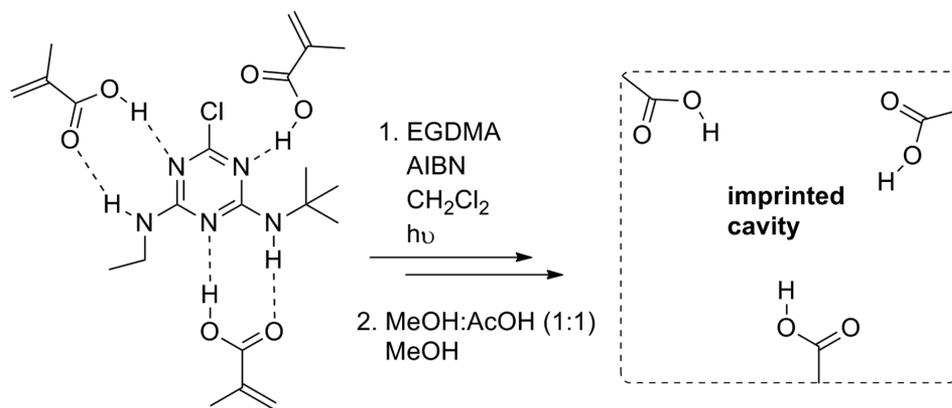


Figure 2. Representative scheme for the hydrogen bonding interaction between the MAA and terbuthylazine (template) in forming the imprinted cavity of the MIP.

EGDMA, dichloromethane as the porogen and with the terbuthylazine (template), and in its absence in the case of the nonimprinted polymer (NIP) (Fig. 2). Briefly, terbuthylazine-MIP was synthesized using a molar ratio of template, radical initiator, functional monomer, and cross-linker of 0.25:0.06:1:5. The methacrylic acid (85 μ L, 1 mmol), EGDMA (0.95 mL, 5 mmol), terbuthylazine (57.5 mg, 0.25 mmol), and dichloromethane (5 mL) were added successively to a 50 mL round-bottomed flask containing a magnetic stir bar at 0°C. The 1,1'-azobisisobutyronitrile (9.75 mg, 0.06 mmol) was added afterwards to the reaction mixture. The mixture was stirred under a nitrogen atmosphere for 10 min in an ice bath, and then stirred under irradiation from the UV lamp (at 240–400 nm). After 24 h, the polymer monolith was crushed, ground, and wet sieved with methanol to obtain particles with a size range from 63 to 125 μ m. The particles were washed extensively in a Soxhlet extractor with methanol/acetic acid solution (1:1 v/v) until no more template was detected by HPLC–DAD analysis of the washing solvent. Subsequently, terbuthylazine-MIP was washed in a Soxhlet extractor with methanol for 24 h to remove the residual acetic acid and, then, dried under vacuum at 60°C. The NIP was synthesized using the same procedure but in the absence of template.

2.4 Physicochemical and morphological characterization

The morphological evaluation of the MIP and the NIP was performed by SEM. Physicochemical characterization of MIP and NIP was achieved using spectroscopic analysis (FTIR). To evaluate the thermostability of MIP and NIP, TGA studies were performed. To evaluate the specific surface areas and investigate the porosity of MIP and NIP, nitrogen adsorption measurements were performed at 77 K, using helium (for dead space calibration) and nitrogen of 99.999% purity supplied, respectively, by Linde and Air Liquide. Before adsorption measurements, the samples were outgassed by heating under vacuum at 313 K and then at 393 K, with a heating rate of 1 K/min.

2.5 Chromatographic evaluation

2.5.1 Evaluation of the molecular adsorption of the imprinting systems

The molecular binding of the imprinted and nonimprinted systems were evaluated by SPE (MISPE) according to the following procedure: a slurry of 50 mg of MIP or NIP in methanol was packed into an empty glass SPE column (3 mL) with polyethylene frits placed on both the top and bottom to form a regular sorbent bed, and then were placed in a vacuum manifold, connected to a vacuum pump. Before and between uses, the columns were washed with 5 mL of methanol to remove eventual impurities. Before the loading step the sorbents were conditioned with 5 mL of dichloromethane. Then, 1 mL of pesticide solutions in dichloromethane containing known concentrations of the template were loaded onto the MISPE cartridge (concentration range 50–1000 mg/L), followed by the washing step, which consisted of the addition of 1 mL of dichloromethane. Finally, the elution of terbuthylazine was performed with 1.5 mL of methanol and the fraction was collected and evaporated to dryness. The residue obtained was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analyzed by HPLC–DAD to measure the concentration of template adsorbed on each polymer. The experiments were conducted in triplicate and the average value was taken. The amount of terbuthylazine adsorbed onto the polymers (Q) was determined using the following formula: $Q = C_a \cdot V/m$, where C_a (mg/mL) is the concentration of template adsorbed, V (mL) is the sample volume and m (g) is the weight of the polymer used. The HPLC conditions employed for these rebinding measurements were as follows: the binary mobile phase consisted of solvents A (water) and B (acetonitrile) with the following gradient: 25–100% B from 0 to 7 min, then 100% B from 7 to 14 min, followed by 100–25% B from 19 to 24 min; The flow rate was fixed at 0.5 mL/min during the entire chromatographic process. The injection volume was 25 μ L; the temperature of 25°C and DAD detection was done at 220 nm.

2.5.2 Cross-selectivity screening studies

To evaluate the cross-selectivity of the MIP under study, some selectivity assays were performed by using two structurally related compounds (atrazine and ametryn; Fig. 1) by means of the MISPE methodology. To carry out these studies, 1 mL of dichloromethane containing 50 mg/L of each pesticide were loaded into SPE columns that were previously packed with 50 mg of the MIP or the corresponding NIP and conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of dichloromethane, after the loading step, the columns were washed with 1 mL of dichloromethane and eluted with 1.5 mL of MeOH. The elution fraction was collected and evaporated to dryness, the residue obtained was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analyzed by HPLC–DAD, to determine the recovery rates for the different template analogs. In the cross-selectivity assays, the chromatographic conditions used were described in Section 2.5.1. The experiments were conducted in triplicate and the average value taken.

2.6 Optimization of the MISPE procedure

To optimize the MISPE loading step, the effect of different solvents (heptane, dichloromethane, acetonitrile, and methanol) on the performance of this imprinting system has been evaluated. In these procedures, the MISPE and NISPE columns were previously conditioned with methanol and consecutively with the same solvent used in the respective loading step. So, for carrying out these assays, a solution with known concentration of terbuthylazine (0.05 mg/L) in different solvents was loaded into the MISPE/NISPE columns and the amount of the unretained pesticide was determined by HPLC–DAD. Owing to the complexity of the olive oil sample, namely the high amount of lipids that coextract with the analyte, it is crucial that MISPE procedure encompasses an efficient clean-up step. To perform its optimization, several solvents (heptane, dichloromethane, and acetonitrile) were investigated. In the elution step methanol was chosen as the elution solvent and the elution volume was also optimized during these assays. During all the stages of the MISPE procedure a regular eluent flow rate (approximately 1 drop per second) through the mixed-bed was attained. The experiments were conducted in triplicate and the average value taken. The chromatographic conditions used to perform these studies were the following: A binary mobile phase consisted of solvents A (water) and B (acetonitrile) as follows: 25–100% B from 0 to 80 min, then 100% B from 80 to 85 min, followed by 100–25% B from 90 to 95 min; The flow rate was fixed at 0.4 mL/min during the entire chromatographic process. The injection volume was 25 μ L; a temperature of 25°C; DAD detection was done at 220 nm. Due to the inherent complexity of olive oil samples, a modified version of the chromatographic method described in Section 2.5.1 has been used, to ensure an efficient discrimination of the peak corresponding to the target analyte

(terbuthylazine) from some eventual contaminants extracted during the MISPE procedure, avoiding the occurrence of possible coelution phenomenon that could result in an erroneous quantification.

2.7 Olive oil sample preparation and extraction of terbuthylazine by MISPE procedure

To evaluate the efficiency of the implemented methodology for the trace analysis of terbuthylazine has been assessed the reproducibility, sensitivity, and recovery rates, using aliquots of the same organic olive oil (obtained from olives that have not been submitted to pesticide treatments) spiked with known concentrations of terbuthylazine (0.05 and 0.025 μ g/g) in dichloromethane. The SPE columns containing either MIP or the corresponding NIP were consecutively conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of dichloromethane. After conditioning, the column was loaded with aliquots of 1 g of the same organic olive oil spiked with two concentrations of terbuthylazine in dichloromethane (0.05 and 0.025 μ g/g) and diluted with 10 mL of dichloromethane. Then, the interfering components present in the sample were removed with 2 mL of heptane followed by 1 mL of dichloromethane (clean-up step) and, then the template was eluted with 1 mL of methanol. The eluted fractions were collected, concentrated up to dryness and the residue obtained was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analyzed by HPLC–DAD. The experiments were conducted in triplicate and the average value taken. The MISPE columns were reconditioned with 5 mL of methanol followed by 5 mL of dichloromethane and repeatedly reused for at least 50 cycles, without loss of reproducibility and with an average of recovery rates of $96.7 \pm 0.6\%$ ($n = 50$), for concentrations of terbuthylazine below the MLR (0.025 μ g/g) [27].

In parallel, to compare the recovery rates and efficiency of the extraction of the developed MISPE method, a C₁₈ commercial SPE cartridge was used for the clean-up of olive oil samples spiked with terbuthylazine (1 g of olive oil contained 0.05 μ g of terbuthylazine), following an experimental procedure described by Bakas et al. [28].

The chromatographic conditions used in these assays are similar to those described above for the optimization of the MISPE procedure (Section 2.6).

The identification of each pesticide was achieved by comparison of its retention time and UV-Vis spectra with those of the corresponding standards. The quantification was determined by calculating the areas of the relevant chromatographic peaks obtained by UV detection at 220 nm using standard solutions of the pesticides with known concentrations [29]. All experiments were conducted in triplicate, and the average value taken. The analytical parameters for the calibration curves of these standard solutions are presented in Supporting Information Table S1.

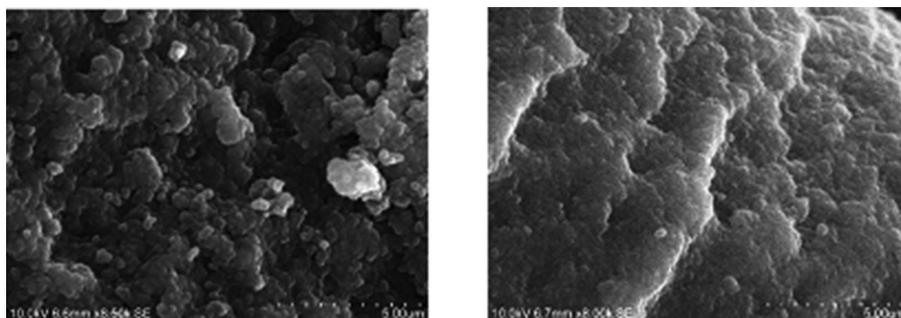


Figure 3. SEM micrographs of MIP (left) and NIP (right).

Table 1. Recovery rates (%) of 1,3,5-triazine derivatives in MISPE- and NISPE-columns obtained after loading with 50 mg/L of the corresponding pesticide solution in dichloro methane, washing with 1 mL of dichloromethane and elution with 1.5 mL of MeOH

Analytes	Recovery rates (%)		Q (mg/g)		
	MIP	NIP	MIP	NIP	α^a
Terbutylazine	73 ± 1.6	15.8 ± 1.9	0.73	0.16	4.6
Atrazine	64.8 ± 1.0	18.8 ± 0.7	0.65	0.19	3.4
Ametryn	61.9 ± 0.1	22.6 ± 0.3	0.62	0.23	2.7

All experiments were conducted in triplicate, and the average value taken; a) Imprinting factor, $\alpha = Q_{\text{MIP}}/Q_{\text{NIP}}$, Q_{MIP} , and Q_{NIP} are the adsorption capacity of the template or the analogs on MIP an NIP, respectively.

3 Results and discussion

3.1 Synthesis of molecularly imprinted polymers

Terbutylazine-MIP and the corresponding NIP were synthesized using traditional bulk radical polymerization, with a photo-initiator (as depicted in Fig. 2), which is the most common method for the preparation of MIPs. For the creation of the molecular imprinting cavities in MIP, the use of MAA as the monomer in dichloromethane (aprotic solvent) is advantageous due to the presence of hydrogen bonding (Fig. 2), leading to a strong association. In this study, the removal of the template from the MIP was accomplished through a Soxhlet extraction with a solution of methanol/acetic acid (1:1 v/v) leaving available recognition sites (imprinted cavities) that enable the selective rebinding of the template molecules.

3.2 Physicochemical and morphological characterization

3.2.1 FTIR studies

The FTIR spectra are presented in the Supporting Information Fig. S1. FTIR spectroscopy can give an estimate of the proportion of the unreacted double bonds. A well-resolved

band at 1632 cm^{-1} is attributed to =C–H bending and the broad band at 3300–3700 cm^{-1} is attributed to the O–H group from the MAA copolymer. The presence of the double bonds indicates unreacted precursors. An intense band at about 1700 cm^{-1} is also observable in the spectra of MIP and NIP and absent in the spectrum of the template and thus, is undoubtedly attributed to the C=O stretching of methacrylic acid. Although the spectra for both the terbutylazine and MIP are different, the spectra of the MIP and NIP are similar, indicating that these polymers have the same unreacted double bonds.

3.2.2 Morphological analyses (SEM)

Scanning electron micrographs reveal different morphologies for the MIP and NIP (Fig. 3). The NIP shows a smooth (homogeneous) featured image. In the case of the MIP the image (more heterogeneous) shows fractures and a rougher surface.

3.2.3 Thermogravimetric analysis

The results of the TGA studies are given in Electronic Supplementary Material. The TGA curves for the NIP and MIP (Supporting Information Fig. S2) are very similar. However, the differential curves (included as an inset in Supporting Information Fig. S2) indicate that there are some differences. Both samples show a small weight loss below 400 K, due to loss of residual solvent, and decompose completely over the range 500–750 K. The differential TGA curves indicate that the principal weight loss is centered at 700 (MIP) or at 720 K with a small shoulder at about 680 K (NIP). Both samples also show a small peak, superimposed on the main peak, at about 550 (NIP) or 530 K (MIP).

3.2.4 Surface area and pore analysis

Nitrogen adsorption measurements were carried out to obtain Brunauer–Emmett–Teller (BET) areas and to investigate porosity not visible by SEM. Nitrogen adsorption–desorption isotherms determined on MIP and NIP at 77 K are shown in Fig. 4. Specific surface areas of 145 and 155 m^2/g , respectively, for NIP and MIP were obtained by the BET method [30, 31]. Both NIP and MIP have reasonable BET areas for this type

of materials, with that of the MIP being slightly larger. The isotherms exhibit hysteresis above a relative pressure of 0.4, revealing that both materials are mesoporous. However, the hysteresis loops do not have a well-defined type of IUPAC classification [30], indicating complex mesopore structures. It can be seen that the shape of the adsorption branches is not very different, while differences are particularly notorious for the desorption branches at high relative pressures, with that of NIP occurring at lower p/p^0 than for MIP. This reflects that emptying of the mesopores of NIP occurs from pore openings narrower than those of MIP but which are still within the mesopore range (2–50 nm of the IUPAC classification [31]). The desorption branches also exhibit a second step and the hysteresis can be obtained with materials having platy particles or slit-shaped pores [32]. Additionally, it is evident that the isotherms present hysteresis down to low relative pressures. The low-pressure hysteresis, also reported for other molecularly imprinted and nonimprinted polymers [32], is most likely caused by swelling [33] during nitrogen adsorption, pore filling or when the pores are full, thereby allowing nitrogen to diffuse into inner regions of the materials only at high relative pressures. Thus, it can be seen that both MIP and NIP present some similar features but the main difference is that MIP has in addition wider mesopore openings. Nevertheless, it should be noted that the sizes of the pore openings of both MIP and NIP are in the mesopore range and thus are wide enough to allow, in the studies of the following section, easy accessibility of the pesticide terbuthylazine to the mesopores of MIP and of the respective NIP.

3.3 Chromatographic evaluation

3.3.1 Evaluation of the molecular adsorption of the imprinting systems

To investigate the binding performance as well as the recognition mechanism of the imprinted and nonimprinted polymers some assays were carried out, using standard solutions of terbuthylazine in dichloromethane in a concentration range of 50–1000 mg/L. Figure 5 shows the experimental results for the MIP and the respective NIP.

As depicted in Fig. 5, higher differences of binding amount have been achieved for the imprinted and nonimprinted systems over the terbuthylazine concentration range of 50–1000 mg/L. In fact and as expected, the adsorption of terbuthylazine on the MIP was significantly higher than that of the respective NIP. This result corroborates the occurrence of the imprinting effect and the specific affinity of MIP for the pesticide target. It is also noticed that for initial concentrations of terbuthylazine lower amounts of adsorbed template was observed, however increasing the concentration of terbuthylazine leads to greater occupancy of the recognition/binding sites until the complete saturation is achieved.

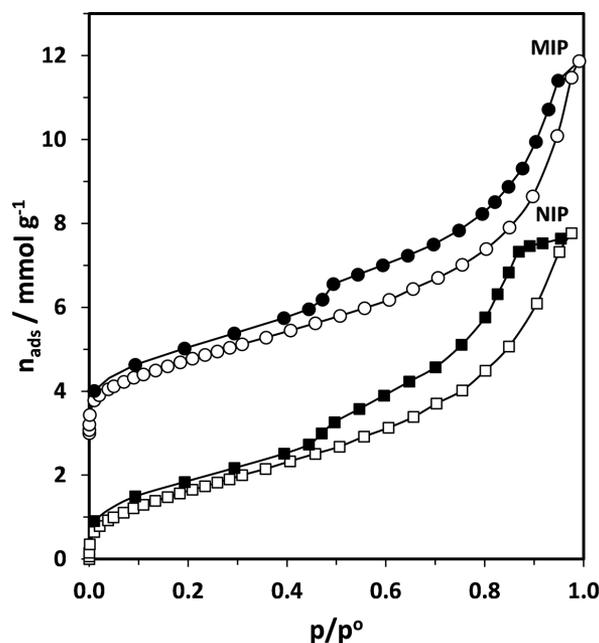


Figure 4. Nitrogen adsorption–desorption isotherms determined at 77 K on MIP and NIP (the isotherm of MIP is shifted by 3 mmol/g; closed symbols: desorption).

Thus, these molecular recognition studies allowed us to estimate the maximum binding capacity of the MIP as 5 mg/g.

3.3.2 Cross-selectivity screening studies

Selectivity is a key factor on the achievement of highly selective SPE sorbents. Indeed, it is of crucial relevance the study of the selectivity of this imprinting material in the presence of some close structurally analogs. Thus, the occurrence of “cross-selectivity” has been evaluated for some compounds belonging to triazine class, atrazine, and ametryn (Fig. 1). Table 1 summarizes the results obtained in the cross-selectivity assays.

The MIP exhibits the highest specificity for terbuthylazine. However, the MIP shows no distinct difference in recognizing the other two template analogues, which present similar imprinting factors. Additionally, the results indicated that MIP presents an extensive “cross-reactivity” with 1,3,5-triazine derivatives (atrazine and ametryn), which is attributed to the fact that the target molecule and the two counterparts form the same type of hydrogen bond interaction with MAA, the molecules form intermolecular hydrogen bonds on the –NH– group and the nitrogen atoms of the triazine ring, as illustrated in Fig. 2. Although the tested 1,3,5-triazines have only small structural differences, from the α values, terbuthylazine was more retained than the other congeners. So, it seems that the selectivity of MIP for terbuthylazine was induced during the imprinting process. Overall, the recognition behavior of MIP on the cross-selectivity assays seems to prove that the imprinting effect is not only playing a

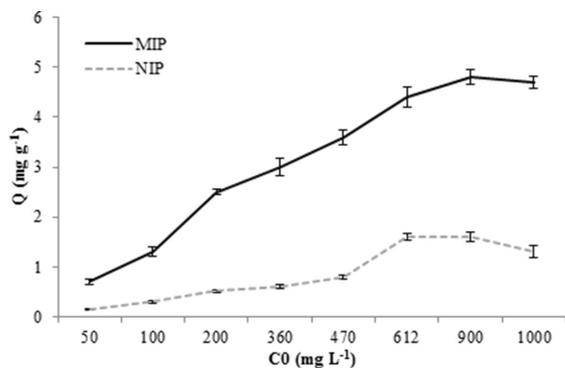


Figure 5. Binding affinity assays of MIP and NIP for terbuthylazine. Error bars represent the standard error ($n = 3$).

significant role on the interaction of the target analyte with functional groups within the three dimensional polymer network, but additionally has a broadly combined effect of shape and size complementary with the binding sites of the imprinting material.

3.5.3 Optimization of the MISPE procedure

The MISPE procedure comprises three steps: loading, clean-up, and elution. The conditions used on each of this steps need to be optimized since it is crucial for the achievement of a reliable sample preparation methodology that enable an efficient isolation/preconcentration of the target compound, while minimizing the coextraction of interfering compounds that could hinder an accurate analyte trace analysis.

The screening studies performed for the optimization of MISPE loading procedure are summarized in Supporting Information Fig. S3. The nature of the loading solvent influences drastically the binding of the terbuthylazine in the imprinting material. Thus, whereas the use of polar solvents leads to poor retention of the template being only 45% retained in the polymeric structure, the employment of less polar and apolar solvents enable to increase significantly the binding of the template to the MIP. Therefore, dichloromethane has been selected as the loading solvent on the MISPE procedure.

On the optimization of the MISPE procedure was also assessed the influence of the washing solvent (data not shown). Thus, the development of a “specific clean-up” step that enables the release of impurities from the MISPE column, while the target analyte remains almost retained in the porous material, has been attempted. The solvents heptane and dichloromethane fulfill the requirements mentioned above and, consequently, have been selected as clean-up solvents for the MISPE procedure.

Further, on the optimization of the elution step (nature of the solvent and volume) of the MISPE procedure (data not shown), methanol was selected as eluent (at a volume of 1 mL) since it provides efficient recoveries of the template molecule.

3.6 Extraction and quantification of terbuthylazine from spiked olive oil by MISPE procedure

Calibration curves and statistical data are presented in Supporting Information Table S1. Good linearity was obtained with the correlation coefficients (R^2) > 0.999. For terbuthylazine, values of 0.002 and 0.006 mg/L for the LOD and LOQ, respectively, were obtained.

To investigate the applicability of the MISPE procedure on the isolation/preconcentration of terbuthylazine, we have evaluated the reproducibility, sensitivity, and recovery rates across the application of the implemented methodology on organic olive oil samples spiked with known concentration of terbuthylazine (Table 2). This procedure will enable to evaluate the matrix effect. As the maximum residue limit (MRL) for terbuthylazine in olives for oil production is 0.05 $\mu\text{g/g}$ [27], this amount was chosen as one of the concentration under study. At the same time, the recovery rates obtained for concentrations of terbuthylazine slightly below (0.025 $\mu\text{g/g}$) the MRL have been also investigated to gain insights about the performance of the imprinting system. As listed in Table 2, MISPE purification and chromatographic analysis of terbuthylazine extracted from spiked olive oil samples has been successfully achieved for concentrations of terbuthylazine similar to MRL and even at levels below the limits imposed by legislation, showing higher recovery rate (around 95%) with good accuracy and precision. The results summarized in Table 2 also indicated a low matrix influence on the extraction process. Even the complex composition of this high fatty food matrix, olive oil, did not significantly reduce terbuthylazine recovery. Altogether, the results obtained demonstrate the high suitability of the implemented methodology for the trace analysis of terbuthylazine in olive oil samples.

3.7 Comparative studies of MISPE with commercial C₁₈ SPE cartridges

Despite the lack of selectivity of C₁₈-SPE compared to MISPE, the performance of the two methodologies for the isolation/preconcentration of trace levels of terbuthylazine (0.05 $\mu\text{g/g}$, corresponding to the MRL) in spiked organic olive oil samples (Fig. 6) was investigated, due to the broad use of C₁₈-SPE for a wide range of applications. Since olive oil is a very complex food matrix and the coextraction of many interfering substances occurs very often, SPE procedure has been preceded by a previous step of sample extraction, such as LLE, to address the lack of selectivity of the C₁₈ sorbent. Hence, on comparing the HPLC chromatograms of the extracts obtained through the two extraction methodologies is noteworthy the superior suitability of the MIP as selective sorbent for the trace analysis of terbuthylazine (Fig. 6), as it gives cleaner extracts hindering the occurrence of coelution phenomenon, which enable an accurate analysis. Furthermore, the use of MISPE as sample preparation methodology is less-time consuming and requires less sample-handling. Altogether, all these features justify the

Table 2. Precision and accuracy of the MISPE column for the extraction of terbuthylazine from spiked organic olive oil samples

Spiked concentration ($\mu\text{g/g}$)	Concentration of bound pesticide \pm SD ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	RSD ^{b)} (%)	Recovery rates (%)
0.05 ^{c)}	0.046 ± 0.001	2.2	94
0.025	0.048 ± 0.002	4.2	96

a) Average \pm SD; b) Variant coefficient (RSD); c) Concentration of terbuthylazine corresponding to the MLR; tests were performed in triplicate ($n = 3$).

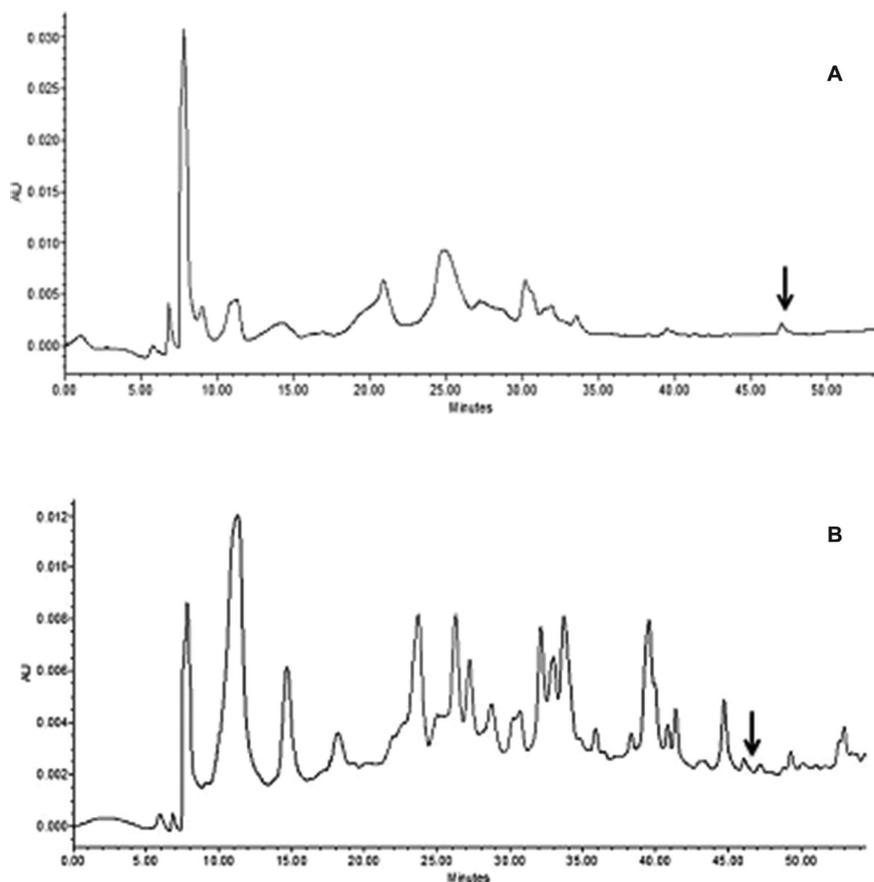


Figure 6. HPLC–DAD chromatograms of eluates obtained after extraction of 0.05 $\mu\text{g/g}$ of terbuthylazine from olive oil using MIP column (A), and commercial C_{18} -silica cartridge (B) after LLE with acetonitrile; UV detection at 220 nm; retention time: 47.3 min.

widespread use of MIPs for the development of more selective extraction methodologies, which is particularly desirable in highly complex matrices due to the remarkable increase in selectivity.

4 Concluding remarks

In this study, a reliable and efficient MISPE methodology was implemented to the trace analysis of terbuthylazine from spiked olive oil samples allowing the selective separation and fast enrichment of terbuthylazine from complicated matrices enabling the detection and quantification of this target pesticide at the lowest MRL levels, with high accuracy, precision, and high recovery rate. Thus, the proposed MISPE-based sample preparation methodology proves to have analytical potential for the preconcentration/isolation of trace amounts of terbuthylazine in very complex food samples

presenting also remarkable advantages, like cost-effectiveness, reusability, high storage stability, and low detection limits. The MISPE methodology was also shown to be more selective to terbuthylazine than the conventional SPE method, owing to the specific recognition of MIP toward the target molecule that leads to improvements on the purification efficiency, avoiding the presence of matrix interferences in the chromatographic analysis.

This work has been supported by FEDER and National funds, through the Programa Operacional Regional do Alentejo (InAlentejo) Operation ALENT-07–0262-FEDER-001871/Laboratório de Biotecnologia Aplicada e Tecnologias Agro-Ambientais and FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors –COMPETE and National Funds through FCT – Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/QUI/UI0619/2014 and Project PTDC/AGR-ALI/

117544/2010. Elisabete P. Carreiro thanks the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for a post-doctoral research fellowship (SFRH/BPD/72182/2010). Laboratory HERCULES at the University of Évora is acknowledged for the SEM analyses.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] García-Reyes, J. F., Ferrer, C., Gómez-Ramos, M. J., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A. R., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2007, *26*, 239–251.
- [2] Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., *Talanta* 2009, *79*, 109–128.
- [3] Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., Chen, F., *Cent. Eur. J. Chem.* 2012, *10*, 900–925.
- [4] Buszewski, B., Szultka, M., *Anal. Chem.* 2012, *42*, 198–213.
- [5] Beltran, A., Borrull, F., Cormack, P. A. G., Marcé, R. M., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2010, *29*, 1363–1375.
- [6] Hu, Y., Pan, J., Zhang, K., Lian, H., Li, G., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2013, *43*, 37–52.
- [7] Martín-Esteban, A., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2013, *45*, 169–181.
- [8] Lasáková, M., Jandera, P., *J. Sep. Sci.* 2009, *32*, 799–812.
- [9] Haginaka, J., *J. Sep. Sci.* 2009, *32*, 1548–1565.
- [10] Cheong, W. J., Yang, S. H., Ali, F., *J. Sep. Sci.* 2013, *36*, 609–628.
- [11] Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., *Anal. Chim. Acta* 2007, *591*, 29–39.
- [12] Garcia, R., Cabrita, M. J., Costa Freitas, A. M., *Am. J. Anal. Chem.* 2011, *2*, 16–25.
- [13] Farré, M., Barceló, D., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2013, *43*, 240–253.
- [14] Song, X., Xu, S., Chen, L., Wei, Y., Xiong, H., *J. Appl. Polym. Sci.* 2014, *131*, 40766–40783.
- [15] Pichon, V., Chapuis-Hugon, F., *Anal. Chim. Acta* 2008, *622*, 48–61.
- [16] Simões, M., Martins, N., Cabrita, M. J., Burke, A. J., Garcia, R., *J. Polym. Res.* 2014, *21*, 368–380.
- [17] LeBaron, H. M., McFarland, J. E., Burnside, O. C. (Eds.), *The Triazine Herbicides—50 Years Revolutionizing Agriculture*, Elsevier, Amsterdam 2008.
- [18] Xu, S., Li, J., Chen, L., *Talanta* 2011, *85*, 282–289.
- [19] Xu, S., Li, J., Chen, L., *J. Mat. Chem.* 2011, *21*, 4346–4351.
- [20] Chen, J., Bai, L.-Y., Liu, K.-F., Liu, R. -Q., Zhang, Y. -P., *Int. J. Mol. Sci.* 2014, *15*, 574–587.
- [21] Silva, R. G. C., Vigna, C. R. M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Augusto, F., *J. Sep. Sci.* 2010, *33*, 1319–1324.
- [22] Mhaka, B., Cukrowska, E., Bu, B. T. S., Ramström, O., Haupt, K., Tutua, H., Chimuka, L., *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 6796–6801.
- [23] Chapuis, F., Pichon, V., Lanza, F., Sellergren, B., Hennion, M.-C., *J. Chromatogr. B* 2004, *804*, 93–101.
- [24] Sellergren, B., Shea, K. J., *J. Chromatogr.* 1993, *635*, 31–49.
- [25] Dauwe, C., Sellergren, B., *J. Chromatogr. A* 1996, *753*, 191–200.
- [26] Ferrer, I., Lanza, F., Tolokan, A., Horvath, V., Sellergren, B., Horvai, G., Barceló, D., *Anal. Chem.* 2000, *72*, 3934–3941.
- [27] Commission Regulation (EU) No. 212/2013.
- [28] Bakas, I., Oujji, N. B., Moczko, E., Istamboulie, G., Piletsky, S., Piletska, S., Ait-Addi, E., Ait-Ichou, I., Noguer, T., Rouillon, R., *J. Chromatogr. A* 2013, *1274*, 13–18.
- [29] European Commission (2013) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013.
- [30] Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquéro, J., Siemieniowska, T., *Appl. Chem.* 1985, *57*, 603–619.
- [31] Rouquerol, F., Rouquerol, J., Sing, K., *Adsorption by Powders and Porous Solids*, Academic Press, London 1999.
- [32] Rosengren, A. M., Karlsson, B. C. G., Nicholls, I. A., *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 1207–1217.
- [33] Gregg, S. J., Sing, K. S. W., *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2nd edn., Academic Press, London 1982.

Electronic Supplementary Material

Development of a selective sorbent for Solid-Phase Extraction of Terbutylazine in Olive Oil Samples: a molecular imprinting-based strategy

Raquel Garcia^{1,*}, Nuno Martins¹, Elisabete P. Carreiro², Marco Simões³, M.M.L. Ribeiro Carrott^{2,3}, P.J.M. Carrott^{2,3}, Anthony J. Burke^{2,3}, Maria João Cabrita⁴

¹ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

²Centro de Química de Évora, IIFA, Universidade de Évora, Colégio L.A. Verney, 7000 Évora, Portugal.

³Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Colégio L. A. Verney, 7000 Évora, Portugal.

⁴Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, ICCAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

*Corresponding author. Tel.: +351-266-760-869; fax: +351-266-760-828. E-mail addresses: raquelg@uevora.pt, rmartagarcia@yahoo.com

(1) Supplementary Figures (SF)

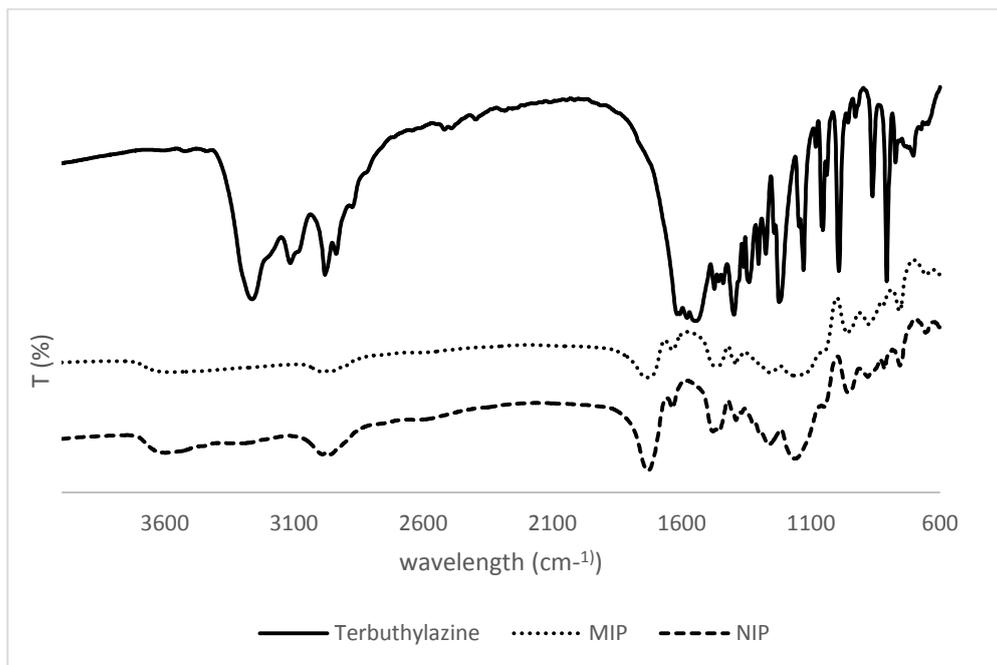


Figure S1. FTIR spectra of the terbutylazine, MIP and NIP.

Thermogravimetric (TGA) analysis

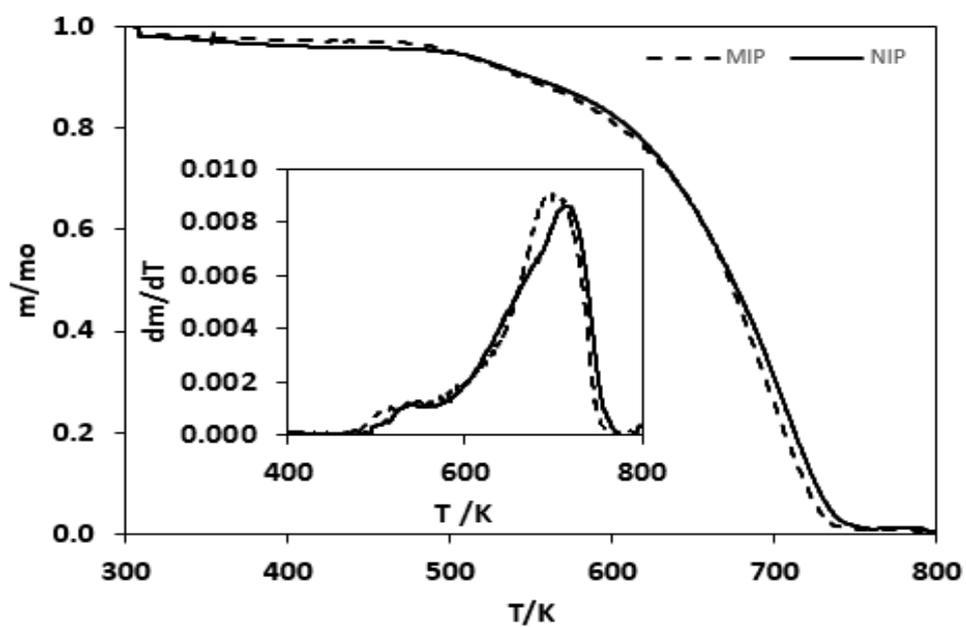


Figure S2. TGA curves for the MIP and NIP.

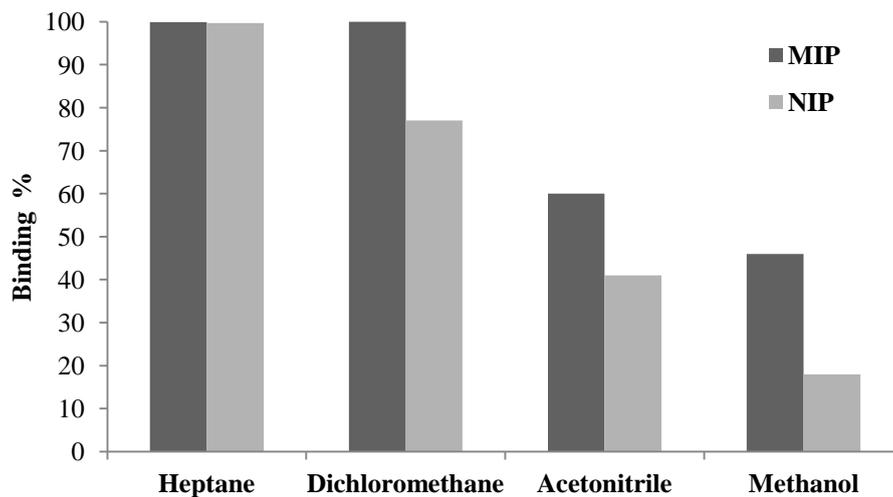


Figure S3. Effect of different loading solvents on the binding capacity of terbuthylazine on the MIP and NIP.

(2) Supplementary Tables (ST)

Table S1. Statistical data for the calibration curves for all the pesticides studied.

Standard	Wavelength (nm)	Intercept	Slope	Correlation coefficient (r^2)	Linear range (mgL^{-1})	LOD ^a (mgL^{-1})	LOQ ^b (mgL^{-1})
Terbuthylazine	220	1518.7	446174	0.9992	0.01-0.07	0.002	0.006
Terbuthylazine	220	433754	4×10^8	0.9995	2.1-104	3.3	10
Atrazine	220	337922	4×10^8	0.9999	1.0-130	2.0	6.0
Ametryn	220	264027	5×10^8	0.9999	1.0-140	1.4	4.0

All experiments were conducted in triplicate, and the average value taken; ^a multiplying the standard deviation by a factor of 3; ^b multiplying the standard deviation by a factor of 10.



Design and development of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of deltamethrin in olive oil: An integrated computational-assisted approach



Nuno Martins^a, Elisabete P. Carreiro^b, Abel Locati^b, João P. Prates Ramalho^{b,c}, Maria João Cabrita^d, Anthony J. Burke^{b,c}, Raquel Garcia^{a,*}

^a ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

^b Centro de Química de Évora, IIFA, Universidade de Évora, Colégio L.A. Verney, 7000 Évora, Portugal

^c Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Colégio L.A. Verney, 7000 Évora, Portugal

^d Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, ICAAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2015

Received in revised form 5 July 2015

Accepted 6 July 2015

Available online 10 July 2015

Keywords:

Molecularly imprinted polymer

Molecular recognition

DFT calculations

Solid phase extraction

Olive oil

Deltamethrin

ABSTRACT

This work firstly addresses the design and development of molecularly imprinted systems selective for deltamethrin aiming to provide a suitable sorbent for solid phase (SPE) extraction that will be further used for the implementation of an analytical methodology for the trace analysis of the target pesticide in spiked olive oil samples. To achieve this goal, a preliminary evaluation of the molecular recognition and selectivity of the molecularly imprinted polymers has been performed. In order to investigate the complexity of the mechanistic basis for template selective recognition in these polymeric matrices, the use of a quantum chemical approach has been attempted providing new insights about the mechanisms underlying template recognition, and in particular the crucial role of the crosslinker agent and the solvent used. Thus, DFT calculations corroborate the results obtained by experimental molecular recognition assays enabling one to select the most suitable imprinting system for MISPE extraction technique which encompasses acrylamide as functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as crosslinker. Furthermore, an analytical methodology comprising a sample preparation step based on solid phase extraction has been implemented using this “tailor made” imprinting system as sorbent, for the selective isolation/pre-concentration of deltamethrin from olive oil samples. Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) methodology was successfully applied for the clean-up of spiked olive oil samples, with recovery rates up to 94%.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Molecular imprinting technology (MIT) has emerged as a versatile technique widely used for the synthesis of “tailor-made” polymeric materials affording the production of highly cross-linked materials, as stable recognition matrices for a wide range of analytes, mimicking the recognition mechanism of antigens and antibodies. These materials are considered to be artificial receptors possessing highly specific sites towards the target molecule presenting additionally improved properties, namely higher physical robustness, strength, resistance to temperature and pressure as well as stability in acid and basic media [1]. During the imprinting

process, an *in situ* formation of the monomer template complex is considered as a key step followed by the use of a crosslinker entity that allows the preservation of the structure of the monomer template complex and, thus the creation of an artificially generated three-dimensional polymer network which possesses binding sites with structural and functional groups complementary to the template molecule. After the polymerization process, the template molecule is removed from the polymer leaving specific recognition sites complementary in shape, size and chemical functionality to the template molecule, allowing the MIP be able to recognize and bind selectively to only the template molecule. Moreover, the less expensive synthesis and the higher storage stability – keeping their recognition ability for several years at room temperature – and reusability, constitute the major advantages of these imprinting materials [2]. The remarkable properties of these imprinting systems have allowed their widespread application over several fields covering chemistry – chromatography [3,4], catalysis [5,6],

* Corresponding author. Tel.: +351 266 760 869; fax: +351 266 760 828.

E-mail addresses: raquelg@uevora.pt, rmartagarcia@yahoo.com (R. Garcia).

sample preparation [7]; biology – drug delivery [8] and engineering – sensor technology [9,10].

Over the last years, the use of molecular modelling methods for the study and characterization of MIPs has emerged as a rational design tool that enables one to optimize the MIP formulations and is a promising approach for finding highly selective MIPs [11]. This approach improves the tedious and time-consuming conventional method of MIP synthesis especially if the variation in the formulation is performed by trial-and-error. Some reviews covering the computational aspects of MIP study and design recently appeared in the literature [12–15]. However, the main drawback of the computational approach arises from the difficulty in simulating the real recognition process in MIPs being usually restricted to the rationalization of the interactions between the functional monomers and the template during the pre-polymerization stage [16]. A better stability of a given monomer/template complex in the pre-polymerization stage is typically correlated with a better imprinting effect of the functional monomer towards the template. The porogen is typically treated using continuum solvation models [17], and the cross-linker is mostly ignored. Other rational MIP design computational approaches, including atomistic and coarse-grain molecular dynamics methods that can describe the polymerization itself, or tackle issues such as the template aggregation were also reported [18,19]. Nevertheless, most of the studies found in the literature focus on the pre-polymerization stage [20–22].

Hence, computational modelling have proven to be a helpful guide to the selection of the more appropriate formulations contributing to the development of “rationally designed” selective MIPs for a broad range of templates. Moreover, this approach has also become a powerful tool to elucidate the physical mechanisms underlying the ligand selectivity of the polymeric sorbents prepared by molecular imprinting technology.

In recent years, the use of organochlorides and organophosphorus insecticides has declined owing to their high toxicity being replaced by pyrethroids. Deltamethrin is a synthetic pyrethroid widely used to control insect pests in crops, however, this substance still presents high toxicity affecting the central nervous system of humans and is also suspected to have endocrine-disrupting effects with a long persistence and a high toxicity to the aquatic environment [23]. Thus, the eventual presence, even at trace levels, of this substance in foodstuffs is a matter of great concern making it necessary the development of robust analytical methodologies that enable high precision and selective detection and quantification.

The use of molecular modelling studies to elucidate the molecular interactions within the imprinting system for the development of deltamethrin selective MIPs has never been attempted. In fact, very few reports on deltamethrin-molecularly imprinted polymers in the literature have been described to date [24–27]. Recently, a chemiluminescence nanosensor has been developed based on a quantum dot MIPs – based and used for the selective detection of trace amounts of deltamethrin in fruits and vegetables [28,29].

The propose of this work is the implementation of a highly selective sample preparation methodology based on molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) for the pre-concentration/isolation and further quantification of trace amounts of deltamethrin in olive oil samples. To achieve this goal, the present study addresses the synthesis and chemical characterization of molecularly imprinted polymers selective for deltamethrin by means of chemical and morphological techniques and, furthers the evaluation of the molecular recognition of these imprinting systems. Additionally, computational modelling studies have been used as a tool to understand the molecular imprinting process at the molecular level.

Hence, in this work a molecularly imprinted polymer selective for deltamethrin was successfully used as SPE sorbent for

the implementation of the MISPE methodology allowing the pre-concentration/isolation of deltamethrin and further quantification by HPLC-DAD in spiked olive oil samples. High reproducibility's and recovery rates were observed.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Acrylamide (AM) and metacrylic acid (MAA) (the functional monomers), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA; crosslinker), 1,1'-azobisisobutyronitrile (initiator), were purchased from Sigma–Aldrich, dichloromethane for synthesis and acetic acid and methanol for MIP washing were obtained from Merck. All the chemicals were used as received.

HPLC grade acetonitrile and methanol, n-heptane and dichloromethane were purchased from VWR International S.A.S. (Fontenay-Sons-Bois, France). The water used in all experiments was distilled and purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The analytical standards deltamethrin, λ -cyhalothrin, fenpropathrin and phenothrin were purchased from Sigma–Aldrich (Bellefonte, PA, USA) and were used without further purification. The 3 mL reservoir glass columns with their frits were supplied by Chromabond-Macherey-Nagel (Germany). Previously to HPLC injection all samples were filtered through 13 mm syringe filters (w/0.45 μ m PTFE membrane) (VWR, USA). The organic extra virgin olive oil was purchased from a local supermarket.

2.2. Instrumentation

The morphology of the synthesized copolymers were characterized using SEM on a Hitachi S-3700N instrument, with an accelerating voltage set to 10 kV. Samples were mounted on aluminium stubs using carbon tape and were gold coated.

FTIR spectroscopy analysis measurements were performed on a PerkinElmer Spectrum Two IR spectrophotometer.

All the chromatographic measurements were performed using a HPLC Waters Alliance System 2695-series Separation Module equipped with Alliance Series Column Heater and the detection was carried out using a photodiode array detector (2998 PDA Detector) (Waters, USA). Chromatographic experiments were carried out with a LiChroCART C18 Purospher STAR reverse phase column (250 mm \times 4.6 mm ID, 5 μ m) (Merck Millipore, Germany) and the detection has been performed in the range of 190–600 nm. Empower 3 FR2 software was used for management, acquisition and treatment of data.

2.3. Synthesis of the molecular imprinting systems

The synthesis of two different molecular imprinted polymers, MIP1 and MIP2, and their corresponding non-imprinted polymers, NIP1 and NIP2 were carried out using a bulk polymerization method, with the functional monomers MAA (MIP1) and AM (MIP2), respectively, the cross-linker EGDMA, dichloromethane as the porogen and with deltamethrin (template), and in its absence in the case of the non-imprinted polymer (NIPs) (Fig. 1). Briefly, deltamethrin-MIPs were synthesized using a molar ratio of template, radical initiator, functional monomer, and crosslinker of (1:1.9:4:20). To a 50 mL round-bottomed flask immersed on an ice bath at 0 °C were added successively and under stirring MAA (42.8 μ L, 0.5 mmol) or acrylamide (36 mg, 0.5 mmol), EGDMA (0.48 mL, 2.5 mmol), deltamethrin (63.1 mg, 0.125 mmol), and dichloromethane (2.4 mL). The 1,1'-azobisisobutyronitrile (40 mg, 0.24 mmol) was added afterwards to the reaction mixture. The mixture was sonicated under a nitrogen atmosphere for 10 min in an ice bath, and then stirred in an oil bath at 60 °C. After 24 h,

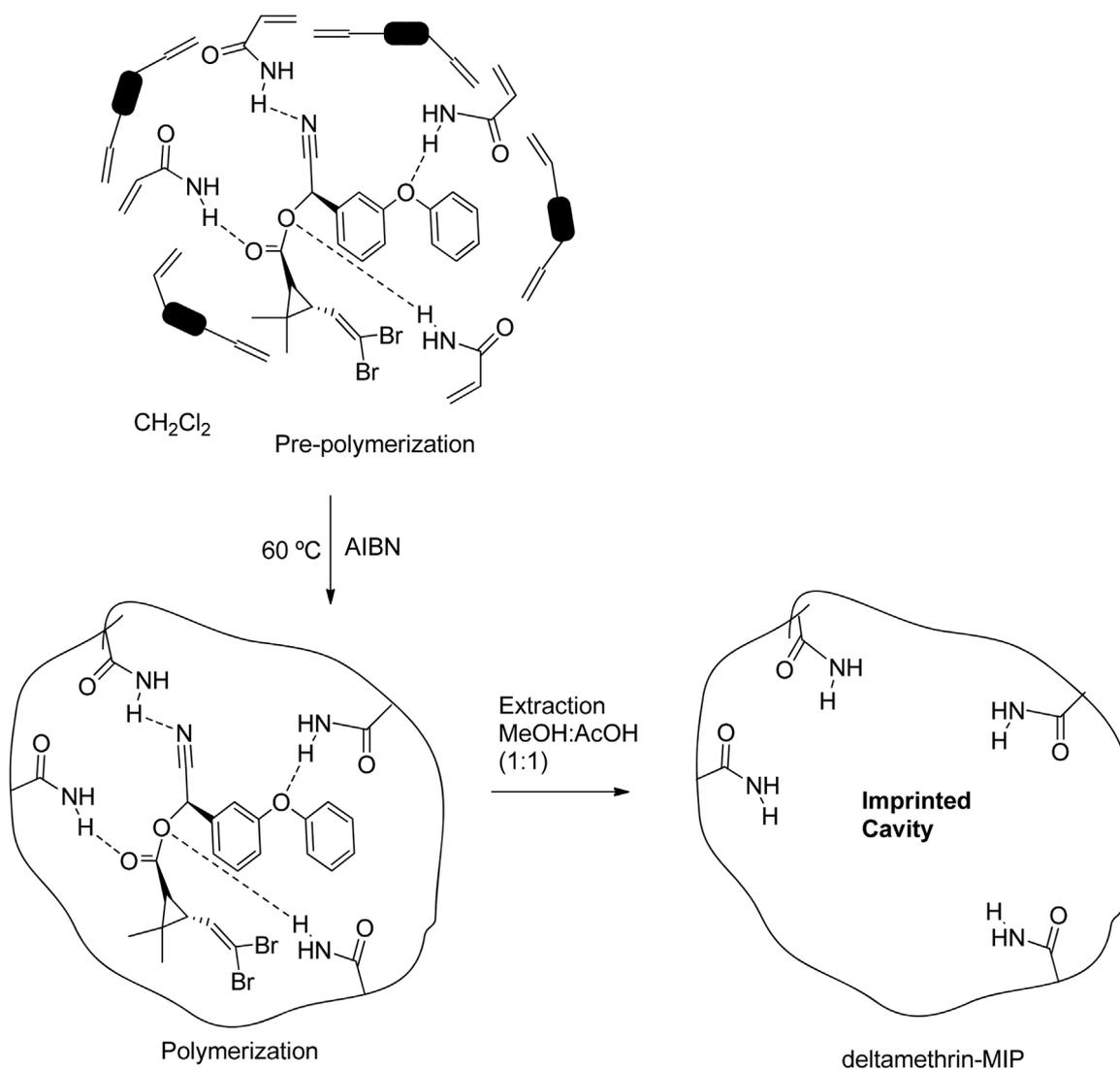


Fig. 1. Representative scheme for the controlled formation of the imprinted cavity through appropriate hydrogen bonding, halogen bonding, dipole-dipole and π - π interactions between the AM, EGDMA and deltamethrin (template).

the polymer monolith was crushed, ground, and wet sieved with methanol to obtain particles ranging in size from 63 to 125 μm . The particles were washed extensively in a Soxhlet extractor with methanol/acetic acid solution (1:1, v/v) until no more template was detected by HPLC-DAD analysis of the washing solvent. Subsequently, deltamethrin-MIP was washed in a Soxhlet extractor with methanol for 24 h to remove the residual acetic acid and, then, dried under vacuum at 60°C . The NIP1 and NIP2 were synthesized using the same procedure but in the absence of template.

2.4. Screening of the molecular recognition abilities of the imprinting systems

In order to evaluate the suitability of these polymeric materials as sorbents for SPE applications some molecular recognition assays were performed using a molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) methodology according to the following procedure: a slurry of 50 mg of the synthesized MIPs and NIPs in methanol was packed into an empty glass SPE column (3 mL) with two polyethylene frits placed on each end to form a regular sorbent bed, and then were placed in a vacuum manifold, connected to a vacuum pump. Firstly, the cartridge was consecutively conditioned with 5 mL of methanol to remove impurities before use, followed by the addition

of 5 mL of heptane. In the loading step, 1 mL of pesticide solutions in heptane containing known concentration of the deltamethrin (1.0 mg L^{-1}) were added to the MISPE cartridge, followed by the addition of 2 mL of heptane containing 10% of dichloromethane (washing step). Finally, the elution of deltamethrin was performed with 2 mL of methanol and the fraction was collected and evaporated to dryness. The residue obtained was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analyzed with HPLC-DAD employing the following chromatographic conditions: the binary mobile phase consisted of solvents A (water) and B (acetonitrile) with the following gradient: 25–100% B from 0 to 7 min, then 100% B from 7 to 14 min, after that 100–25% B from 14 to 19 min, followed by 25% B from 19 to 24 min; The flow rate was fixed at 0.5 mL min^{-1} during the entire chromatographic process. The injection volume was 25 μL ; the temperature of 25°C ; DAD detection was done at 220 nm and the detection was set between 190 and 600 nm to monitor the UV-vis spectra. All the experiments were conducted in triplicate and the average value taken.

2.5. Molecular modelling

In order to rationalize the design of MIPs with deltamethrin as template molecule, we carried out calculations using density

functional theory (DFT) methods. Contrary to most of the previous studies, complexes with more than one monomer unit and, in some cases, the crosslinker were considered in the present work. Calculations were performed with the M06 functional [30], as implemented in the GAMESS – US program [31]. The standard 6-31G(d) basis set was used for N, C, H, O atoms [32,33]. Bromine atoms were described using the SDD effective core potential for the inner electrons and its associated basis set for the outer ones [34]. The SMD method was used in order to take into account the solvent effects [35].

To compare the relative stability of the monomer(s)/template complexes, interaction energies were calculated as:

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - E_{\text{template}} - nE_{\text{monomer}}$$

where E_{template} and E_{monomer} refer to the energies of the isolated optimized species and n is the number of monomers in the complex. For the cases where the cross-linker was considered, the energy of the isolated optimized cross-linker was also subtracted.

2.6. Screening of MIP towards selectivity with deltamethrin analogues

Attending to the suitability of MIP2 as sorbent for MISPE applications, its binding specificity has been assessed by means of “cross-selectivity” assays towards some structurally deltamethrin analogues, namely λ -cyhalothrin, fenprothrin and phenothrin. To carry out this screening study, some binding assays towards the selected deltamethrin counterparts have been undertaken based on MISPE methodology, using standard solutions of those analogues and the extraction procedure and the chromatographic conditions described in Section 2.4. The determination of the recovery rates for the different template analogues for the imprinted and non-imprinted system (MIP2 and NIP2) was performed. All the experiments were conducted in triplicate and the average value taken.

2.7. Optimization of the sample preparation methodology based on SPE

In order to optimize the several stages encompassed on the MISPE procedure, the effect of different parameters, namely the flow rate and the solvents used on the loading, washing and elution steps have been carefully evaluated. To perform this optimization, the MISPE and NISPE cartridges were previously conditioned with methanol and, after that with the same solvent used in the respective loading step. To optimize the loading step, the effect of the polarity of the solvents (methanol, acetonitrile, dichloromethane and heptane) on the performance of the imprinting system has been evaluated. So, for carrying out these assays, a solution with known concentration of deltamethrin (1.0 mg L^{-1}) in different solvents was loaded into the MISPE/NISPE columns and the amount of the unretained pesticide was determined by HPLC-DAD. Since, the occurrence of non-specific interactions could also take place, it is mandatory the optimization of the washing step on the MISPE procedure. To address this particular point, the effect of the use of several solvents (heptane and dichloromethane) and their mixtures were investigated. Finally, in the elution step, the methanol was chosen as the elution solvent however the elution volume was also optimized through the assay (data not shown). A volume of 1 mL of methanol was selected since it provides efficient recoveries of the template molecule. During all the stages of the MISPE procedure a regular eluent flow rate (approximately 1 drop per second) through the mixed-bed was attained. The chromatographic conditions used in these assays are similar to those described in the Section 2.4. Tests were performed in triplicate and the average value taken.

2.8. Implementation of the analytical methodology for the selective extraction of deltamethrin in olive oil samples

Aiming to implement an analytical methodology for the selective extraction and trace analysis of deltamethrin in olive oil samples, some analytical parameters, such as the accuracy, sensitivity and recovery rates have been assessed, using aliquots of the same organic olive oil samples spiked with known concentrations of deltamethrin ($1.0, 0.8, 0.6$ and $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$) in n-heptane. Previously, the MISPE cartridge was conditioned with 5 mL of methanol and then with 5 mL of heptane. After conditioning step, the column was loaded with aliquots of 1 g of the same organic olive oil spiked with the different concentrations of deltamethrin in heptane ($1.0, 0.8, 0.6$ and $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$) diluted with 5 mL of heptane. Immediately, the interfering components present in the sample were removed with 2 mL of heptane followed by 1 mL of heptane containing 10% of dichloromethane (washing step) and, further, the template was eluted with 1 mL of methanol. The eluted fractions were collected, concentrated up to dryness and the residue obtained was dissolved in 1 mL of acetonitrile and analyzed by HPLC-DAD.

In order to gain insights about the reproducibility of the implemented analytical methodology for the trace analysis of deltamethrin in olive oil samples, a complementary assay involving the extraction and quantification of deltamethrin contents in spiked organic olive oil samples using three different MISPE cartridges containing MIP2 as sorbent has been carried out. For this study, samples of organic olive oil spiked with a concentration of deltamethrin of $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$, corresponding to the MRL for deltamethrin in olives for olive oil production, have been applied.

During all the stages of the MISPE procedure was attained a regular eluent flow rate (approximately 1 drop per second). Due to the inherent complexity of olive oil, an improved version of the chromatographic method described in Section 2.4 has been used in order to ensure an efficient discrimination of the peak corresponding to the target analyte avoiding its eventual co-elution with some matrix interferents. The chromatographic conditions used to perform these studies were the following: a binary mobile phase consisted of solvents A (water) and B (acetonitrile) as follows: 25–100% B from 0 to 80 min, then 100% B from 80 to 85 min, followed by 100–25% B from 85 to 90 min and, after that 25% B until 95 min; the flow rate was fixed at 0.4 mL min^{-1} during the entire chromatographic process. The injection volume was 25 μL ; a temperature of 25 °C; DAD detection was done at 220 nm. All the experiments were conducted in triplicate and the average value taken.

2.9. Standard addition method

The standard addition method (SAM) has been applied in this study [36] to evaluate the matrix effect. Experimentally, an assay encompassing the extraction of a sample of organic olive oil spiked with a concentration of deltamethrin of $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ using the MISPE procedure has been performed. The eluted fraction (1 mL) was split into five equal volumes (200 μL) in separate vials. The first vial is then diluted to a final volume of 1 mL with acetonitrile. A standard solution of deltamethrin is then added in increasing volumes to the subsequent vials and each vial is then diluted with acetonitrile to the final volume of 1 mL, varying the concentrations of added deltamethrin in the range 0.95 – 1.59 mg L^{-1} . Then, the five solutions are analyzed by HPLC-DAD using the chromatographic conditions detailed in Section 2.8. The instrument response is measured and the data is plotted with the standard added concentration in the x-axis and instrument response in the y-axis. Linear regression is performed and the slope and the y-intercept of the calibration curve are used to calculate the concentration of the analyte in the sample. Tests were performed in triplicate.

2.10. Experimental validation (calibration curves/repeatability)

The identification of each pesticide was achieved by comparison of its retention time and UV–vis spectra with those of the corresponding standards. The quantification was determined by calculating the areas of the relevant chromatographic peaks obtained by UV detection at 220 nm using standard solutions of the pesticides with known concentrations. All experiments were conducted in triplicate, and the average value taken. The analytical parameters for the calibration curves of these standard solutions were presented in Electronic Supplementary Material (Table S1).

3. Results and discussion

3.1. Synthesis, chemical and morphological characterization of the imprinted systems

Two molecularly imprinted polymers selective for deltamethrin were synthesized using MAA (MIP1) or AM (MIP2) as functional monomers and EGDMA as the crosslinker in dichloromethane. Deltamethrin-MIPs (MIP1 and MIP2) and the corresponding NIPs (NIP1 and NIP2) were synthesized using traditional bulk radical polymerization with a thermal free radical initiator, as depicted in Fig. 1 for the MIP2. The imprinting system MIP1/NIP1, containing MAA as functional monomer, have previously been prepared by Shi and co-workers [24] and Shingh and co-workers [26]. Nevertheless, in our work some modification of those synthetic procedures have been performed, namely in the use of dichloromethane as porogen and AIBN as radical initiator. The MIP2 and the corresponding NIP2 were prepared using AM as the functional monomer owing to its advantage of having several sites for hydrogen bonding, halogen bonding, dipole–dipole and π – π interactions (Fig. 1), leading to significant imprinting and the formation of well-defined imprinted cavities. In this study, the removal of the template from the deltamethrin-MIPs was accomplished through Soxhlet extraction with a mixture of methanol/acetic acid (1:1, v/v) to afford the free imprinted cavities for the selective rebinding of the template molecules.

The characterization of the imprinting systems under study encompasses a morphological evaluation by SEM and physico-chemical characterization using spectroscopic analysis (FTIR).

3.1.1. FTIR

Concerning the imprinting system MIP1/NIP1, the FTIR spectra are very consistent with those reported in the literature [26]. The FTIR spectra of MIP2 and NIP2 are shown in Supplementary Material (Fig. S1). The spectra of MIP2 showed peaks at 3408, 3462 and 1680 cm^{-1} due to the stretching and bending vibrations of the N–H and C=O bonds of acrylamide. Also, the characteristic peak at 1393 cm^{-1} is attributed to the stretching of the C–N bond of AM. The band for the C–H stretch appeared at 2957 and 2991 cm^{-1} , respectively. The band at 1154 cm^{-1} was probably due to a C–O stretch whilst the band at 1728 cm^{-1} is attributed to the C=O stretch. The presence of a band at 1638 cm^{-1} probably assigned to a C=C stretch of the unreacted EGDMA is also observed in the spectra. As expected, the FTIR spectra of MIP2 and NIP2 were very similar.

3.1.2. SEM

The morphology of the imprinting systems under study were assessed by SEM since the overall morphological feature of these materials, including the distribution and texture of the porous, affects greatly the performance of the MIPs in terms of molecular recognition abilities. The SEM micrographs of the imprinting system MIP2/NIP2 are shown in Fig. 2, exhibiting different morphologies for the imprinted and non-imprinted polymers. The NIP2

Table 1

Retention of deltamethrin on the different molecularly imprinted systems under study.

Polymers	Amount of bound template \pm SD ^a (mg)	IF \pm SD ^a
MIP 1	0.28 \pm 0.01	2.0 \pm 0.1
NIP 1	0.140 \pm 0.005	
MIP 2	0.930 \pm 0.007	
NIP 2	0.20 \pm 0.01	

All experiments were conducted in triplicate ($n=3$).

^a Average \pm standard deviation (SD); IF (imprinting factor) = MIP/NIP.

shows a smooth and compact (homogeneous) featured image while the imprinted polymer is more heterogeneous, showing fractures and an irregular surface, which seems to indicate that the presence of the template molecule influence the morphology of these tailor made materials. SEM images also show that the imprinted polymer have a more uniform dispersion and quantity of imprinting cavities than the non-imprinted polymer.

3.2. Evaluation of the molecular recognition of the imprinting systems

The molecular intrinsic affinity of these imprinting systems is a crucial feature on the development of selective sorbents for SPE applications. In this work a preliminary study encompassing the molecular recognition abilities of the imprinting systems MIP1/NIP1 and MIP2/NIP2 has been performed, in order to select the most appropriate polymeric porous material to be further used as MISPE selective sorbent. This screening assay has been conducted by means of a MISPE-based procedure for the extraction of deltamethrin using standard solutions of this target analyte with a concentration similar to the maximum residue limit established for olives for olive oil production [37]. As summarized in Table 1, these preliminary results have indicated that the MIP2 displays the highest imprinting factor showing that AM-based polymer binds deltamethrin better than the MAA-based polymer.

3.3. Computational modelling studies of the imprinted systems

Deltamethrin, a pyrethroid ester, is a highly flexible template. The presence of seven torsion angles makes the number of possible conformations particularly high. In addition, there are several possible sites of interactions between the template and the monomers including the nitrile group, the ester, the $-\text{CBr}_2$, and the ether. Given that calculating the huge number of conformations was virtually impossible, we decided to focus on two conformers, one extended conformation in which deltamethrin is somewhat linear, and another more compact conformation in which deltamethrin is folded, with the biaryl group close to the $-\text{CBr}_2$ group (Fig. 3). These two conformations were used to evaluate the interactions with the monomer. In order to mimic the experimental conditions, the calculations were performed in CH_2Cl_2 . Both conformers have similar energies, with the “compact” conformer approx. 0.9 kcal/mol lower than the “extended” one. Similar conformers were already reported in studies using semi-empirical techniques [38,39]. Since the energy of the “compact” conformer is lower, we used this conformation for our studies. It should also be noted that a full conformational study of the template does not guarantee that the conformational minimum would be the best one for the interaction with the functional monomer.

The two functional monomers tested experimentally (MAA and AM) were inspected for this computational study. AM has the best imprinting effect towards deltamethrin, while MAA, despite its wide applicability in the design of MIPs, has showed lower molecular recognition abilities. Different possibilities of interaction

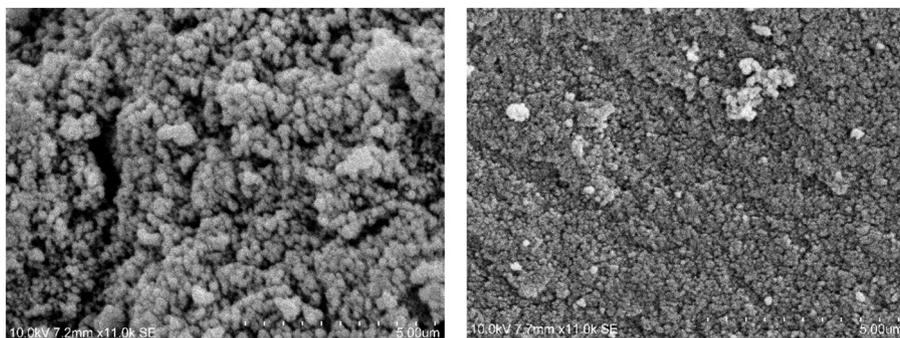


Fig. 2. SEM micrographs of MIP2 (left) and NIP2 (right).

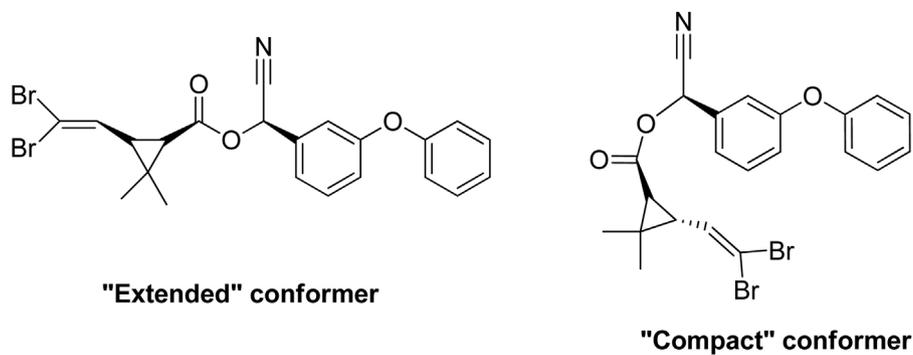


Fig. 3. Representations of the two selected conformers of deltamethrin.

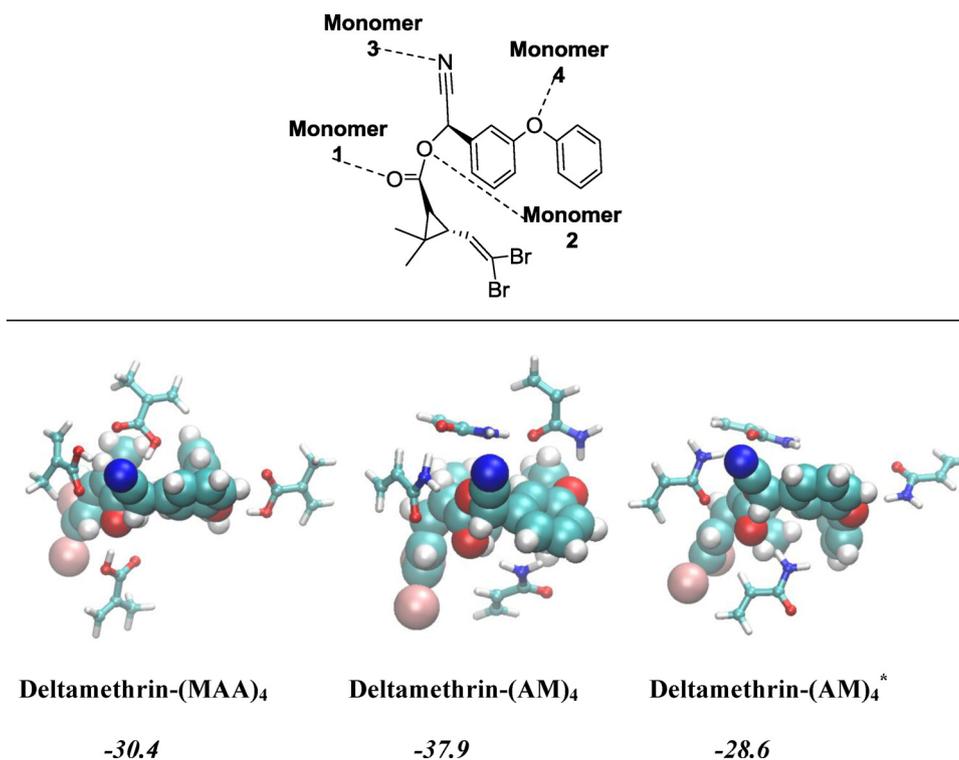


Fig. 4. Schematic representation of the template in the compact form, with four monomers (labelling of the monomers is shown in the upper part of the figure). In the lower part the complexes with both AM (on the right and in the middle), and MAA (on the left) are depicted. On the left an optimized structure with the template surrounded by four molecules of MAA is depicted. The optimized structure obtained with AM is shown in the middle. The complex on the far right is a constrained structure where the O—H distance between the oxygen atom of the template and the hydrogen atom of Monomer 4 of AM has been frozen. The interaction energy values are in kcal/mol. The template is shown with the Van der Waals surface, and the monomers are represented using a ball-and-stick model.

Table 2

Comparison of stability for various monomer/template complexes using AM and MAA at different sites on the template (interaction energy values in CH₂Cl₂ are in kcal/mol).

Interaction sites	MAA	AM
Carbonyl group	−8.8	−2.0
Singly bound oxygen of ester	−9.0	−7.0
Nitrile	−9.3	−4.0
Ether	−7.8	−5.9

between the monomers and deltamethrin were studied with one monomer located at various sites on the deltamethrin template, as depicted in Fig. 4. The carbonyl and the singly bound oxygen of the ester function, the nitrogen atom of the nitrile, and the oxygen of the ether were selected, because these heteroatoms are more likely to form hydrogen interactions with the monomers. Optimizations with a monomer around the −CBr₂ group always converged with the monomer moving towards the nitrile or the ester. The template-monomer complexes were optimized and their interaction energies in CH₂Cl₂ were calculated and are reported in Table 2.

All the complexes formed between MAA and the template are more stable than the ones with AM, which seems to contradict the experimental data showing that AM is the best functional monomer for deltamethrin imprinting. Calculating a relatively small number of complexes does not make this study conclusive, and looking simply at the interaction between one monomer and the template is not sufficient to rationalize the better templating effect of the acrylamide based MIP for deltamethrin. Due to the various potential sites of interaction, we thus decided to compute complexes with four monomers simultaneously around the template, instead of one. We placed two monomers (Monomer 1 and Monomer 2 in Fig. 4) around the ester function, one monomer close to the nitrile (Monomer 3), and the last monomer (Monomer 4) next to the oxygen between the two phenyl rings. We optimized the complex formed for both functional monomers. The full optimizations afford the complexes Deltamethrin-(MAA)₄ and Deltamethrin-(AM)₄, represented in Fig. 4, together with their respective interaction energies.

The optimized structures are significantly different between both monomers. In the case of MAA, the four monomers stay close to where they were initially located, *i.e.* close to the interaction sites (see Deltamethrin-(MAA)₄), as it can be seen on the left of Fig. 4. In contrast, Deltamethrin-(AM)₄ shows a different orientation of the monomer around the template. Monomer 1 remains roughly at the same position, *i.e.* close to the C=O of the ester (with a NH—O distance of 2.00 Å). Monomer 3 also stays close to its starting position, around the C≡N bond. On the contrary, Monomer 2 slightly moves from the oxygen atom of the ester to form interactions with Monomer 3. Similarly, Monomer 4 moves from the ether function towards Monomer 3. If we compare the stability of the complexes, the one formed between the template and the four MAA monomers is less stable by around 7.5 kcal/mol. This follows the experimental data which reports a better affinity of the MIP2 for deltamethrin. Nevertheless, such stability is likely to be due to the interactions between the AM themselves, and therefore do not really reflect the interactions between the template and AM. To counteract the attraction of Monomer 4 to Monomer 3, we froze the O—H distance between the oxygen atom (the one between both phenyl groups) of the template and the hydrogen atom of Monomer 4 closest to the template, allowing all monomers to be in close contact with their given interaction site. We thus obtained Deltamethrin-(AM)₄^{*}, structurally more similar to Deltamethrin-(MAA)₄. This structure cannot be considered an optimized structure due to the constraints imposed, but gives an indication of the stability of such a complex. The complex is indeed destabilized by 9.3 kcal/mol compared to Deltamethrin-(AM)₄, suggesting again

Table 3

Comparison of stability of complexes Deltamethrin-(AM)₄EGDMA and Deltamethrin-(MAA)₄EGDMA depending on the solvent (interaction energy values are in kcal/mol).

Solvent	Deltamethrin-(AM) ₄ EGDMA	Deltamethrin-(MAA) ₄ EGDMA
CH ₂ Cl ₂	−39.6	−43.4
Heptane	−48.7	−46.8
Methanol	−37.2	−41.0

that the monomer/monomer interactions play an important role in the interaction energy of the complex. Nevertheless, we presumed that such monomer/monomer interactions might be impeded by the other reagents present in solution. We thus considered the possible role of the crosslinker (EGDMA). The crosslinker makes polymer formation possible, and is the main species in solution (proportions for the template/monomer/crosslinker are 1:4:20). Such high ratio suggests that interactions between the crosslinker and the other species present in solution are very likely, even in the early pre-polymerization stage. We thus decided to compute the template with the four monomers located close to the four most likely sites of interaction with the template, together with a crosslinker molecule. The crosslinker was placed between Monomer 3 and 4, in order to avoid monomer/monomer interactions, and thus forcing monomer/template interactions (Fig. 5). The impact of the crosslinking reagent such as EGDMA prior to the establishment of the polymer network has been largely overlooked. Only recently, molecular dynamics studies emphasizing the potential role of the crosslinker in the pre-polymerization stage were reported [13,40,41].

The crosslinker (represented in black in Fig. 5) forms interactions with Monomer 3 and Monomer 4, for both MAA and AM cases. They consist of weak hydrogen interactions between the oxygen and the hydrogen atoms of both the functional monomer and the crosslinker. The crosslinker might thus impede monomer/monomer interactions, and also facilitate the monomer/template interaction. Assuming that these clusters that have been optimized in CH₂Cl₂ are a good representation of the MIP's structure, we then decided to compute their corresponding interaction energy in different solvents. When computed in CH₂Cl₂, the complex formed with the AM is less stable than the one formed with MAA, this time by around 4.0 kcal/mol (see Table 3). However, this situation is reversed when employing heptane as a solvent. In this case Deltamethrin-(AM)₄EGDMA, is more stable than Deltamethrin-(MAA)₄EGDMA by 1.9 kcal/mol. Also, both complexes are more stabilized by around 10 kcal/mol compared to the ones computed in CH₂Cl₂. On the opposite, the interaction energies are lower in methanol. This follows the trend observed experimentally where heptane is indeed the solvent affording the best binding capacity of the MIP towards deltamethrin, followed by CH₂Cl₂, and methanol (see Fig. S2 in Supplementary Material). Also, the weakest binding energies observed for methanol are consistent with the fact that it is the best eluting solvent (see experimental conditions in Sections 2.4 and 2.7).

3.4. Optimization of the SPE-based analytical methodology

As discussed in the previous Sections 3.2 and 3.3, the results obtained in the molecular recognition assays for the imprinting systems under evaluation are corroborated by computational modelling studies enabling to select the MIP2 as the more promising sorbent for the selective extraction of deltamethrin from olive oil samples using a MISPE-based methodology. Hence, the optimization of the MISPE methodology using MIP2 as selective sorbent has been carried out encompassing the selection of the most appropriate solvents for the loading and washing SPE steps.

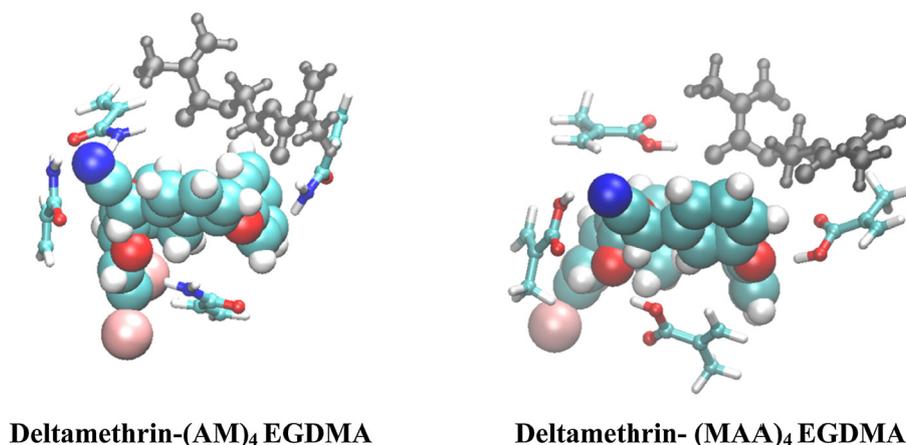


Fig. 5. Representations of the template with four monomers (AM for the complex depicted on the left, MAA for the complex on the right) and the cross-linker (EGDMA). The template is shown with the Van der Waals surface, the monomers and the cross-linker are represented as ball-and-stick models. The crosslinker is further highlighted in black.

3.4.1. Selection of the loading solvent

The effect of the polarity of the loading solvent on the binding of deltamethrin to MIP2 has been assessed by the measurement of the quantity of retained template on the polymeric material using HPLC-DAD, and the results summarized in Fig. S2 (see Supplementary Material). The data has evidenced that the binding of the target molecule is strongly dependent of the polarity of the loading solvent. In fact, the use of polar solvents, like acetonitrile (dielectric constant (ϵ)=37.5; dipole moment=3.44 D) and methanol (ϵ)=32.6; dipole moment=1.70 D), aprotic and protic solvent, respectively, leads to relatively low binding of the template (less than 50%). In the case of dichloromethane (ϵ)=9.1; dipole moment=1.60 D), an aprotic polar solvent, a poor binding of deltamethrin has been also achieved. However, the binding capacity increased significantly using heptane (ϵ)=1.9; dipole moment=0.0 D), as loading solvent, which suggested that the strongest interactions between MIP2 and the target molecule were obtained in apolar solvents. Hence, heptane has been chosen as loading solvent in further experiments.

3.4.2. Selection of washing solvent

The optimization of the washing solvent is crucial for the development of the MISPE-based analytical methodology aiming to avoid the occurrence of non-specific binding on the imprinting material and the removal of some bonded interfering compounds contained in the complex olive oil matrix. As depicted in Fig. S3 (see Supplementary Material), a heptane/dichloromethane (90:10, v/v) mixture gave the best results and was thus chosen as the washing solvent.

3.5. Screening of MIP towards selectivity with deltamethrin analogues

For the development of selective sorbents for SPE applications the evaluation of their selectivity towards some template analogues is mandatory. Thus, the cross-selectivity of MIP2 into several deltamethrin analogues, such as λ -cyhalotrin, fenprothrin and phenothrin were assessed. Table 4 summarizes the data obtained for the selectivity studies comprising the recovery rates (%) of the selected deltamethrin derivatives using a MISPE-based methodology.

As shown in Table 4, the λ -cyhalotrin and fenprothrin analogues displayed moderate binding on MIP2 since these compounds share an equivalent basic structure with deltamethrin. Nevertheless, MIP2 provides a selective entrapment of deltamethrin even in

Table 4

Recovery rates (%) of different deltamethrin structural analogues in the MIP2 and NIP2 MISPE columns obtained after loading with 1 mL of 1.0 mg L⁻¹ of the corresponding pesticide solution in n-heptane, washing with 1 mL of n-heptane containing 10% of dichloromethane and elution with 2 mL of MeOH.

Analytes	Recovery rates \pm SD ^a (%)	
	MIP2	NIP2
Deltamethrin	94.0 \pm 0.7	20.0 \pm 0.1
λ -Cyhalotrin	55.0 \pm 2.1	11.0 \pm 0.10
Fenprothrin	67.0 \pm 0.7	9.3 \pm 0.2
Phenothrin	10.0 \pm 1.4	2.0 \pm 0.1

^a Average \pm standard deviation (SD); tests were performed in triplicate ($n=3$).

the presence of some structurally related compounds proving its potential usefulness as SPE sorbents in the selective preconcentration and extraction of deltamethrin from olive oil samples.

3.6. Implementation of the MISPE methodology to spiked organic olive oil samples

Furthermore, the implementation of the MISPE methodology for the isolation/pre-concentration of spiked organic olive oil samples with deltamethrin at concentration of 1.0 μ g g⁻¹, which corresponds to the maximum residue limit (MRL) for this pesticide in olive products [37], has been successfully attempted since a high recovery rate has been achieved with good accuracy and precision. In order to gain insights about the performance of the MISPE, the implemented methodology has been applied to olive oil samples spiked with concentrations of deltamethrin slightly below the MRL (until 0.40 μ g g⁻¹), as shown in Table 5.

The results demonstrated that, even at levels below the limits imposed by legislation, the suitability of the MISPE methodology for the trace enrichment of deltamethrin in spiked organic olive oil samples has been proven, since higher recovery rates (around 94%) with good accuracy and precision were obtained. Fig. 6 depicts the chromatogram of the MISPE extraction from spiked olive oil samples at a concentration of deltamethrin corresponding at MRL.

In order to evaluate the column-to-column MISPE reproducibility, three different SPE cartridges containing the MIP2 as sorbent were prepared and the recovery rates assessed using the experimental MISPE procedure optimized in this work (for each MISPE cartridge the assays were performed in triplicate using a concentration of deltamethrin similar to the MRL). The results obtained showed that the percentage recovery rates (\pm RSD %) was 90.33 (\pm 2.8%) proving a high column-to-column reproducibility.

Table 5
Precision and accuracy of the MISPE column for the extraction of deltamethrin from spiked organic olive oil samples.

Spiked concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentration of bound pesticide \pm SD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Recovery rates \pm SD ^a (%)
1.00 ^c	0.90 \pm 0.03	3.33	90.00 \pm 2.50
0.80	0.69 \pm 0.01	1.45	87.00 \pm 1.70
0.60	0.54 \pm 0.01	1.85	90.00 \pm 1.50
0.40	0.38 \pm 0.01	0.88	94.00 \pm 1.70

^a Average \pm standard deviation (SD).

^b Variant coefficient (RSD).

^c Concentration of deltamethrin corresponding to the MLR; tests were performed in triplicate ($n=3$).

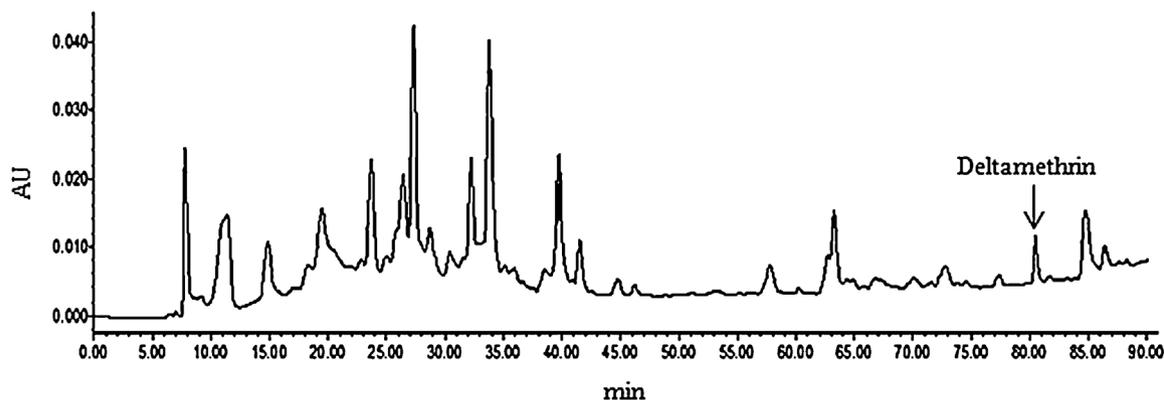


Fig. 6. HPLC/DAD chromatogram after MISPE pretreatment of olive oil sample spiked with deltamethrin at a concentration corresponding to the MRL.

3.7. Matrix effect

Owing to the complex composition of olive oil, some components of the sample matrix could interfere with the analyte signal leading to ion suppression/enhancement effects – a situation known as the matrix effect, hindering a comparison of the analytical signal of the sample and standard using the traditional calibration curve approach, thus causing inaccuracies in the quantification of the target compound. Often, these matrix effects occur during quantitative analysis in mass spectrometry detection hyphenated to liquid chromatography separation, like LC–ESI-MS/MS affecting the accuracy, the precision and the limit of detection [42].

Aiming to evaluate the matrix effect, the standard addition method (SAM) has been used in our studies which have been performed by the analysis of the unspiked sample followed by the consecutive standard addition solutions, as described in detail in Section 2.9. The number of standard additions used in SAM is the most often recommended in the literature and, as also suggested, the validation for the matrix effect has been performed choosing a concentration of the analyte as close as possible to that expected in the real samples [42]. With the experimental data, a regression line was applied in the normal way and the line equation $y = 144799x + 32,393$ ($R^2 = 0.998$) was calculated. By comparing the concentration of the “unspiked” sample extract with the concentration of the analyte in the test sample extract obtained by extrapolation using the standard addition approach it is clear that the matrix effect is absent since those concentrations are coincident.

4. Conclusions

A novel extraction and determination method for the trace analysis of deltamethrin was developed based on MISPE methodology using as selective sorbent a MIP possessing recognition abilities for deltamethrin, which was further successfully validated for the isolation and pre-concentration of this target pesticide in olive oil samples. In this work, the molecular interactions within the imprinting systems under study and the role of the crosslinker, the functional monomers, and the solvent on the template recognition

were elucidated by computational modelling studies. The crosslinker plays a critical role balancing the monomer–monomer and the template–monomer interactions and it is thus expected that it might have an impact on the pre-polymerization stage of other MIPs. Even more important is the inclusion of the solvent in order to rationalize the binding affinity of the MIP. It is important to differentiate between the solvent used for the synthesis, the loading, and the elution steps, since the binding affinity of the MIP towards the template is highly dependent on the solvent. All in all, considering all the possible interaction sites on the template, the inclusion of the crosslinker, and taking into account the proper solvent were crucial to understand the better binding capacity of MIP2 compared to MIP1.

Acknowledgments

This work has been supported by FEDER and National funds, through the Programa Operacional Regional do Alentejo (InAlentejo) Operation ALENT-07-0262-FEDER-001871/Laboratório de Biotecnologia Aplicada e Tecnologias Agro-Ambientais and FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors –COMPETE and National Funds through FCT – Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-OE/AGR/UI0115/2014 and PEst-OE/QUI/UI0619/2014, as well as project PTDC/AGR-ALI/117544/2010. Elisabete P. Carreiro thanks the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for a post-doctoral research fellowship (SFRH/BPD/72182/2010). Abel Locati is grateful for the award of a post-doc grant from INMOLFARM – Molecular Innovation and Drug Discovery (ALENT-57-2011-20) financed from the FEDER-INALENTEJO program ALENT-07-0224-FEDER-001743. Laboratory HERCULES at the University of Évora is gratefully acknowledged for the SEM analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.025>

References

- [1] G. Vasapollo, R. Del Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 5908–5945.
- [2] R. Garcia, M.J. Cabrita, A.M.C. Freitas, Application of molecularly imprinted polymers for the analysis of pesticide residues in food – a highly selective and innovative approach, *Am. J. Anal. Chem.* 2 (2011) 16–25.
- [3] R.J. Ansell, D. Kriz, K. Mosbach, Molecularly imprinted polymers for bioanalysis: chromatography, binding assays and biomimetic sensors, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996) 89–94.
- [4] O. Nunez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298–323.
- [5] O. Ramstrom, K. Mosbach, Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 759–764.
- [6] G. Wulff, Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers, *Chem. Rev.* 102 (2002) 1–28.
- [7] A. Beltran, F. Borrull, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, Molecularly imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1363–1375.
- [8] F. Pouci, F. Lemma, N. Picci, Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: a review, *Curr. Drug Deliv.* 5 (2008) 85–96.
- [9] C. Malitesta, E. Mazzotta, R.A. Picca, A. Poma, I. Chianella, S.A. Piletsky, MIP sensors – the electrochemical approach, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1827–1846.
- [10] K.D. Shimizu, C.J. Stephenson, Molecularly imprinted polymer sensor arrays, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 743–750.
- [11] T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui, Combinatorial molecular imprinting: an approach to synthetic polymer receptors, *Anal. Chem.* 71 (1999) 285–290.
- [12] I.A. Nicholls, H.S. Andersson, C. Charlton, H. Henschel, B.C.G. Karlsson, J.G. Karlsson, J. O'Mahony, A.M. Rosengren, K.J. Rosengren, S. Wikman, Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 543–552.
- [13] G.D. Olsson, B.C.G. Karlsson, S. Shoravi, J.G. Wiklander, I.A. Nicholls, Mechanisms underlying molecularly imprinted polymer molecular memory and the role of crosslinker: resolving debate on the nature of template recognition in phenylalanine anilide imprinted polymers, *J. Mol. Recognit.* 25 (2012) 69–73.
- [14] E.-R.E. Mojica, Screening of different computational models for the preparation of sol-gel imprinted materials, *J. Mol. Model.* 19 (2013) 3911–3923.
- [15] I.A. Nicholls, B.C.G. Karlsson, G.D. Olsson, A.M. Rosengren, Computational strategies for the design and study of molecularly imprinted materials, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 13900–13909.
- [16] K. Karim, F. Breton, R. Rouillon, E.V. Piletska, A. Guerreiro, I. Chianella, S.A. Piletsky, How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1795–1808.
- [17] C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Implicit solvation models: equilibria, structure, spectra, and dynamics, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2161–2200.
- [18] S. Monti, C. Cappelli, S. Bronco, P. Giusti, G. Ciardelli, Towards the design of highly selective recognition sites into molecular imprinting polymers: a computational approach, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 153–163.
- [19] L. Levi, V. Raim, S. Srebnik, A brief review of coarse-grained and other computational studies of molecularly imprinted polymers, *J. Mol. Recognit.* 24 (2011) 883–891.
- [20] Y. Dineiro, M.I. Menendez, M.C. Blanco-Lopez, M.J. Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, Computational approach to the rational design of molecularly imprinted polymers for voltammetric sensing of homovanillic acid, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6741–6746.
- [21] F.F. Ahmadi, J. Ahmadi, M.J. Rahimi-Nasrabadi, Computational approaches to design a molecularly imprinted polymer for high selective extraction of 3,4-methylenedioxyamphetamine from plasma, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7739–7747.
- [22] P. Qi, X. Wang, X. Wang, H. Zhang, H. Xu, K. Jiang, Q. Wang, Computer-assisted design and synthesis of molecularly imprinted polymers for the simultaneous determination of six carbamate pesticides from environmental water, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2955–2965.
- [23] H. Rehman, M. Ali, F. Atif, M. Kaur, K. Bhatia, S. Raisuddin, The modulatory effect of deltamethrin on antioxidants in mice, *Clin. Chim. Acta* 369 (2006) 61–65.
- [24] X. Shi, J. Liu, A. Sun, D. Li, J. Chen, Group-selective enrichment and determination of pyrethroid insecticides in aquaculture seawater via molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography-electron capture detection, *J. Chromatogr. A* 1227 (2012) 60–66.
- [25] Z.F. Xu, G. Wen, D.Z. Kuang, F.X. Zhang, S.P. Tang, Selective separation of deltamethrin by molecularly imprinted polymers using a β -cyclodextrin derivative as the functional monomer, *J. Environ. Sci. Health B* 48 (2013) 336–343.
- [26] K.P. Singh, A. Kumar, P. Singh, I. Sanjesh, R. Singh, H.V. Pant, Selective recognition and detoxification of deltamethrin using molecularly imprinted polymer (MIP) matrices, *Anal. Chem. Lett.* 3 (2013) 30–39.
- [27] M. Simões, N. Martins, M.J. Cabrita, A.J. Burke, R. Garcia, Tailor-made molecularly imprinted polymers for dimethoate and deltamethrin recognition: synthesis, characterization and chromatographic evaluation, *J. Polym. Res.* 21 (2014) 368–380.
- [28] S. Ge, J. Lu, L. Ge, M. Yan, J. Yu, Development of a novel deltamethrin sensor based on molecularly imprinted silica nanospheres embedded CdTe quantum dots, *Spectrochim. Acta Part A* 79 (2011) 1704–1709.
- [29] S. Ge, C. Zhang, F. Yu, M. Yan, J. Yu, Layer-by-layer self-assembly CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymers modified chemiluminescence sensor for deltamethrin detection, *Sens. Actuators B* 156 (2011) 222–227.
- [30] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theor. Chem. Acc.* 120 (2008) 215–241.
- [31] M.W. Schmidt, K.K. Baldrige, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, U.S.J. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery, General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comput. Chem.* 14 (1993) 1347–1363.
- [32] M.M. Francl, W.J. Pietro, W.J. Hehre, J.S. Binkley, M.S. Gordon, D.J. Defrees, J.A. Pople, Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization-type basis set for second-row elements, *J. Chem. Phys.* 77 (1982) 3654–3665.
- [33] W.J. Hehre, R. Ditchfield, J.A. Pople, Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules, *J. Chem. Phys.* 56 (1972) 2257–2261.
- [34] D. Andrae, U. Haussermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuss, Ab initio pseudopotential study of the $^9\Sigma^-$ and $^7\Sigma^-$ states of GdO, *Theor. Chim. Acta* 77 (1990) 123–141.
- [35] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 6378–6396.
- [36] European Commission Health & Consumer Protection Directorate General, Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedure for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/, 2013.
- [37] Reg. EU No. 212/2013.
- [38] A. Mullaley, R. Taylor, Conformational properties of pyrethroids, *Comput. Aided Mol. Des.* 8 (1994) 135–152.
- [39] M.G. Ford, N.E. Hoare, B.D. Hudson, T.G. Nevell, L. Banting, QSAR studies of the pyrethroid insecticides Part 3. A putative pharmacophore derived using methodology based on molecular dynamics and hierarchical cluster analysis, *J. Mol. Graph. Model.* 21 (2002) 29–36.
- [40] G.D. Olsson, B.C.G. Karlsson, E. Schillinger, B. Sellergren, I.A. Nicholls, Theoretical studies of 17- β -estradiol-imprinted prepolymerization mixtures: insights concerning the roles of cross-linking and functional monomers in template complexation and polymerization, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 13965–13970.
- [41] S. Shoravi, G.D. Olsson, B.C.K. Karlsson, I.A. Nicholls, On the influence of crosslinker on template complexation in molecularly imprinted polymers: a computational study of prepolymerization mixture events with correlations to template-polymer recognition behavior and NMR spectroscopic studies, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 10622–10634.
- [42] F. Goseti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929–3937.

Electronic Supplementary Material

Design and development of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of deltamethrin in olive oil: an integrated computational-assisted approach

Nuno Martins¹, Elisabete P. Carreiro², Abel Locati², João P. Prates Ramalho^{2,3}, Maria João Cabrita⁴, Anthony J. Burke^{2,3}, Raquel Garcia^{1,*}

¹ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

²Centro de Química de Évora, IIFA, Universidade de Évora, Colégio L.A. Verney, 7000 Évora, Portugal.

³Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Colégio L. A. Verney, 7000 Évora, Portugal.

⁴Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, ICAAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

Correspondence: Dr. Raquel Garcia, e-mail: raquelg@uevora.pt, rmartagarcia@yahoo.com, Tel.: +351 266760-869; Fax: +351 266760828, ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

Table S1. Statistical data for the calibration curves of the target template (deltamethrin) and its analogues

Standard	λ (nm)	Intercept	Slope	r^2	Linear range (mgL ⁻¹)	LOD ^a (mgL ⁻¹)	LOQ ^b (mgL ⁻¹)
Deltamethrin ^c	220	-252.32	117765	0.9996	0.01-0.09	0.002	0.007
Deltamethrin ^c	220	3862	145557	0.9996	0.07-1.00	0.030	0.080
Deltamethrin ^d	220	10001	136217	0.9998	0.26-1.17	0.044	0.130
λ -Cyhalothrin ^c	220	-240.32	241711	0.9994	0.08-1.14	0.035	0.100
Fenpropathrin ^c	220	1006.6	217486	0.9997	0.09-1.31	0.030	0.090
Phenothrin ^c	220	3056.7	229887	0.9998	0.02-0.46	0.010	0.030

All experiments were conducted in triplicate, and the average value taken; ^a multiplying the standard deviation by a factor of 3; ^b multiplying the standard deviation by a factor of 10; ^c calibration curves were obtained with the chromatographic method described in the section 2.4; ^d calibration curves were obtained with the chromatographic method described in the section 2.8.

Figure S1. FTIR spectra of MIP2 and NIP2.

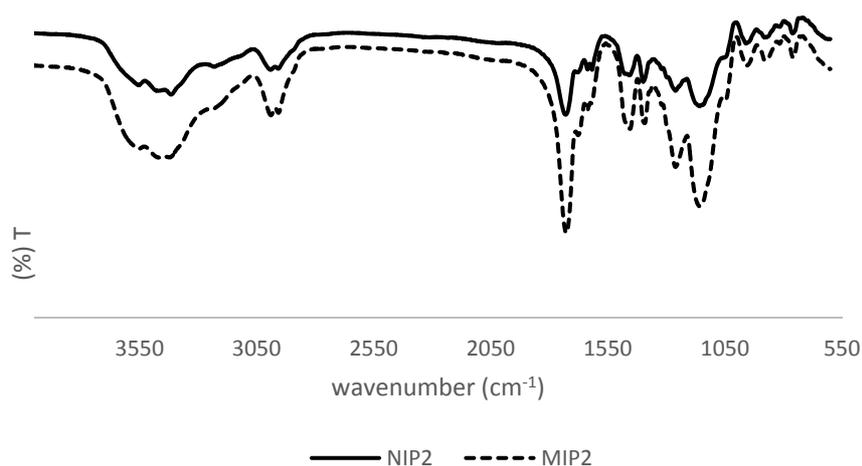


Figure S2. Effect of different loading solvents on the binding capacity of deltamethrin on the MIP; the binding capacity correspond to the recovery rates

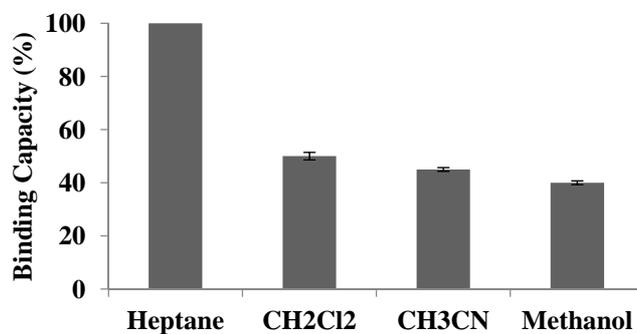
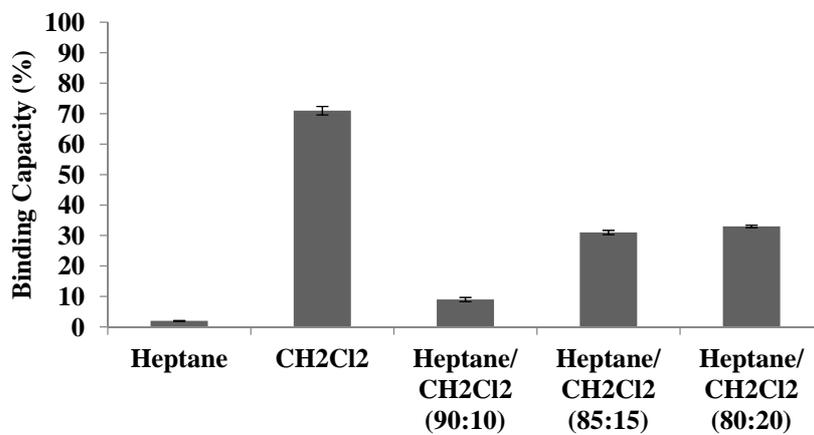


Figure S3. Effect of different washing solvents on the binding capacity of deltamethrin on the MIP; the binding capacity correspond to the recovery rates.



Cartesian coordinates of the computed structures:

Acrylamide (AM)

C 0.8180225874 -0.6704260100 0.0743850558
C -0.4646030128 0.0686692427 -0.0796170375
N -1.5743833917 -0.7142781035 -0.0451223207
O -0.5216319368 1.2857753169 -0.2136544338
H -2.4818461709 -0.2860509247 -0.1898069483
H -1.5367084512 -1.7254085444 -0.0199162165
C 1.9782578766 -0.0212392251 0.0280121093
H 0.7802962864 -1.7509910089 0.2223308315
H 1.9962386836 1.0582981013 -0.1200511774
H 2.9321675293 -0.5328388443 0.1369401376

Methacryl acid (MAA)

C -1.6623449027 -0.9410640427 0.0048059642
C -0.6927389251 0.1963429071 0.0019248118
C 0.7375580598 -0.1979877473 -0.0014767341
O 1.5893767122 0.8410559999 0.0189738693
C 1.1201715344 -1.3493060500 -0.0210452859
C -1.0510970639 1.4831947021 -0.0084141533
H -0.3194060694 2.2873772533 -0.0146755654
H -2.1010791508 1.7738315752 -0.0100449799
H 2.4921739482 0.4726919092 0.0149964212
H -1.5338217248 -1.5751780467 -0.8825847493
H -2.6954759764 -0.5768230265 0.0227763098
H -1.5093664414 -1.5931444334 0.8749150917

EGDMA

C -1.5093441648 -0.6508269413 -0.0816346360
C -0.4599137351 0.4124697564 -0.1427730215
C 0.9069151379 -0.0445769501 0.2147950457
O 1.8287284987 0.9339246641 0.1820622880
O 1.1764667320 -1.1893507568 0.5101232826
C -0.6994271634 1.6789613822 -0.4928618161
H 0.0874573588 2.4282287074 -0.5295352437
H -1.7042511813 2.0079547925 -0.7562979394
H -1.2735612874 -1.4807173392 -0.7611058739
H -2.4922578746 -0.2496954290 -0.3526465407
H -1.5767064548 -1.0860008701 0.9244814704
C 7.3669461567 2.8477542077 -1.8175937470
C 6.4844266518 2.9639486281 -0.6151977732
C 6.4406241780 1.7516865724 0.2532724995
O 5.2991946851 1.4127990352 0.8868039089
O 7.4265724085 1.0793164136 0.4502047999
C 5.8952540363 4.0986482252 -0.2310982068
H 5.2983056202 4.1725531734 0.6764723875
H 6.0195187745 5.0193895967 -0.8009158783
H 8.3930608480 2.5953329646 -1.5216129288
H 7.3868110016 3.7848239252 -2.3850830840
H 7.0278656292 2.0462346685 -2.4885275452
C 3.1536067603 0.5409971627 0.5307890737
C 3.9963796755 1.7923285466 0.4482586790
H 3.5949252307 2.5671494376 1.1150959538
H 3.5182624267 -0.2289478780 -0.1620719064
H 3.1701866411 0.1192680654 1.5440914229
H 4.0132434097 2.1907762393 -0.5730166711

Deltamethrin “Compact” conformer

C -1.8121568663 -0.5568470606 1.2493648562
C -0.3315400436 -0.8051812848 1.4643365814
C -0.8501743547 0.5799384341 1.0677731496

H -2.3793195187 -0.5255991588 2.1826397079
C -2.5628949143 -1.1343787923 0.1143817631
C -3.7809635869 -0.7286379326 -0.2271319608
Br -4.7635940990 -1.5135595234 -1.6834109825
Br -4.7085190938 0.6880016007 0.6928075704
H -0.0034277358 -0.9019481028 2.4979802952
C 0.4781883562 -1.5770262505 0.5127131366
O 0.2070245934 -1.8636492969 -0.6321533399
O 1.6648297353 -1.9092377305 1.0914586369
C 2.5905920381 -2.6265968292 0.2767680098
H 2.0435297174 -3.0340904170 -0.5893992060
C 3.0659127657 -3.7603449911 1.0770448004
N 3.4454050118 -4.6649063220 1.6941961685
C 3.7143363912 -1.7325133645 -0.2092500982
C 4.9885866311 -2.2494441740 -0.4292526327
C 5.9824922620 -1.4272985072 -0.9526601031
C 5.7165175003 -0.0984082267 -1.2488629538
C 4.4375816072 0.4081088506 -1.0295488050
C 3.4308473453 -0.4018407607 -0.5119716106
O 4.2234816874 1.7001774229 -1.4210686118
C 3.2780519377 2.4837197504 -0.7974594055
C 3.2362758085 2.6114435239 0.5890130010
C 2.3213809289 3.4920712983 1.1570280728
C 1.4604716248 4.2375378594 0.3532545615
C 1.5197186711 4.1023959947 -1.0309066938
C 2.4284610615 3.2232073621 -1.6128172483
C -0.5787818637 1.1163349778 -0.3132765678
C -0.8018609361 1.6227923179 2.1537945065
H -2.1031891243 -1.9193353817 -0.4854772485
H 5.2109291140 -3.2899159907 -0.1961258551
H 6.9804060077 -1.8272452097 -1.1216534437
H 6.4820185115 0.5596909090 -1.6555166556
H 2.4360133971 0.0114768159 -0.3531528781
H 3.9210277823 2.0354086248 1.2099006049
H 2.2919361510 3.6047529354 2.2402131754
H 0.7449285141 4.9216360889 0.8062343598
H 0.8527594762 4.6821776346 -1.6669601373
H 2.4947343186 3.1041922464 -2.6929102467
H -0.6016773110 0.3439046317 -1.0889158665
H 0.4036032057 1.6102527197 -0.3476174789
H -1.3293685974 1.8774771014 -0.5719270654
H 0.2021409697 2.0633152851 2.2250146978
H -1.0622134620 1.2088324698 3.1368618706
H -1.5065016153 2.4376384522 1.9325075689

Deltamethrin “Extended” conformer

C 2.8147538741 -0.7981986417 0.9658345104
C 1.3024386523 -0.6899175119 0.8407945635
C 2.0818625230 -1.7605470746 0.0793072278
H 3.1365873068 -1.2117654532 1.9246570599
C 3.7247191446 0.2267320166 0.4125962664
C 5.0344963565 0.0461859410 0.2833587724
Br 6.2031028122 1.4079296362 -0.4121023175
Br 5.9241263322 -1.5907781015 0.7746161229
H 0.7299706657 -1.0467940247 1.6952601541
C 0.6720061192 0.4426965590 0.1458446527
O 1.1479253564 1.1422158720 -0.7225223652
O -0.5866448469 0.6346347703 0.6156124543
C -1.3272969992 1.6929872738 -0.0116869786
H -1.1820278695 1.6382884985 -1.1002269526
C -0.7961976039 2.9865003165 0.4451468622
N -0.3933217984 4.0073694836 0.8190015019
C -2.7780615971 1.5144217648 0.3503270642
C -3.2613951764 1.9333588085 1.5899129838
C -4.5959966154 1.7152559035 1.9085531954
C -5.4496631436 1.0815910054 1.0112135531
C -4.9500834117 0.6477417495 -0.2151482280

C -3.6166348734 0.8685066028 -0.5512410165
O -5.7186703065 0.0541683438 -1.1753946100
C -6.8716879044 -0.6197154113 -0.8312009597
C -8.0182158028 -0.3272411170 -1.5596288405
C -9.1872158181 -1.0374595863 -1.3038182937
C -9.2079892688 -2.0248167887 -0.3227748889
C -8.0501291091 -2.3072480840 0.3987038223
C -6.8717576340 -1.6137597681 0.1438878328
C 2.2493371082 -1.6673248532 -1.4147561430
C 1.9170869796 -3.1684391587 0.5918394327
H 3.3107897754 1.1774860151 0.0760961514
H -2.6009350385 2.4337974271 2.2975897474
H -4.9862777970 2.0521925316 2.8669690187
H -6.4976260870 0.9302319838 1.2615386453
H -3.2555642003 0.5252809849 -1.5201258665
H -7.9783740206 0.4506849221 -2.3200854025
H -10.0870587027 -0.8122301685 -1.8739936463
H -10.1250173264 -2.5754541267 -0.1206390195
H -8.0580126651 -3.0835423286 1.1624717504
H -5.9592334363 -1.8383269493 0.6941401473
H 2.3222011381 -0.6367260212 -1.7751035483
H 1.4052065588 -2.1489518142 -1.9270349547
H 3.1643600755 -2.1968084683 -1.7168939709
H 1.0249166800 -3.6438327480 0.1615741013
H 1.8240283756 -3.2019263235 1.6854247439
H 2.7880832193 -3.7784138868 0.31116156645

H -2.8834431769 -4.7265350883 -2.2274952364
H -4.1713674227 -2.6689413302 -2.8233714576
H 0.6076140768 -1.7408227502 -1.0258198362
H -0.9197931423 -2.4687303058 -0.4842625585
H 0.5750299229 -3.4101712144 -0.4189776025
H -0.9929297561 -3.3216153565 2.0506367849
H 0.1812628777 -2.6366280821 3.1955184415
H 0.6886502658 -3.8871122426 2.0412951871
C 2.0088235882 5.4489200198 1.1402800673
C 1.9385231754 4.7909582054 -0.1997511460
C 1.4725231681 3.3841611661 -0.1818967417
O 1.3159502864 2.8297195796 -1.3901241942
O 1.2387647247 2.7752740345 0.8493343806
C 2.2595021679 5.3896639162 -1.3501803852
H 2.1898935478 4.8777457764 -2.3071200968
H 2.6077018971 6.4220397823 -1.3688629943
H 0.9384426103 1.9319314921 -1.2499306871
H 1.0236874528 5.4437822496 1.6273728535
H 2.3503345852 6.4863065439 1.0525412845
H 2.6911301827 4.9127067666 1.8129951617

Template /Single monomer complexes

Interaction site :Singly bound oxygen of ester.

Monomer : MAA

Interaction site :Carbonyl group.

Monomer : MAA

C 1.5170418251 -1.0216314472 1.4886235510
C 0.0825611789 -0.5152540437 1.5596807701
C 0.4011591272 -1.9540213040 1.1397395272
H 1.9562090699 -1.1834661137 2.4774262010
C 2.4652115390 -0.4449659043 0.5095032146
C 3.5081281246 -1.0880616429 -0.0005800811
Br 4.7371580999 -0.2323946221 -1.2104040281
Br 3.9358185390 -2.9144052696 0.4237285085
H -0.3418058617 -0.3795200137 2.5523191893
C -0.4065443737 0.4442941374 0.5666303887
O -0.0687524565 0.5193047428 -0.6022532869
O -1.3588489653 1.2318386020 1.1083170874
C -1.9643246001 2.2118127151 0.2580531252
H -1.4223904960 2.2192507301 -0.7000570621
C -1.7668850359 3.5196358693 0.8898493708
N -1.6114443555 4.5656019676 1.3646546762
C -3.4134786926 1.8538305535 0.0202309793
C -4.4500050687 2.7650308130 0.1879171076
C -5.7578654516 2.3715097886 -0.0924054644
C -6.0339832411 1.0814480194 -0.5200104633
C -4.9866140059 0.1742301735 -0.6768159279
C -3.6761945306 0.5570051953 -0.4208791777
O -5.3078981528 -1.0692307628 -1.1448230889
C -4.5322077276 -2.1499530072 -0.7763875262
C -4.3513240526 -2.4705845197 0.5664518780
C -3.6370552602 -3.6172218090 0.8955269368
C -3.1058454371 -4.4315823905 -0.1037117813
C -3.2951079209 -4.0956228017 -1.4414140811
C -4.0080102208 -2.9496006284 -1.7843909957
C 0.1596708395 -2.4025629976 -0.2795953756
C 0.0514242892 -3.0002821245 2.1678324710
H 2.3390369535 0.6010861439 0.2290261820
H -4.2489425446 3.7770008243 0.5366608300
H -6.5727845792 3.0810280429 0.0388208463
H -7.0503390949 0.7548294385 -0.7312157475
H -2.8656490351 -0.1554334649 -0.5729673660
H -4.7804837446 -1.8335123141 1.3387945363
H -3.5097566724 -3.8827877614 1.9442962772
H -2.5457460400 -5.3266749766 0.1622965749

C -2.1414699207 -0.7321493422 1.2321786833
C -0.6896041125 -1.1378581097 1.0638297941
C -1.1069356228 0.3371736388 1.0409585679
H -2.4949989364 -0.8455577271 2.2599349659
C -3.1656299782 -1.0258493496 0.2067458793
C -4.3594000744 -0.4433424314 0.1836120501
Br -5.6933951889 -0.8726833436 -1.1350497833
Br -4.9003321591 0.8902101425 1.4637742418
H -0.1714385265 -1.4515140084 1.9678745115
C -0.1771229002 -1.7393093841 -0.1688053621
O -0.6673479325 -1.6995416969 -1.2748092378
O 1.0252021266 -2.3496795460 0.0674747257
C 1.8134726801 -2.6833687110 -1.0933903596
H 1.1280088656 -2.7787122665 -1.9481500892
C 2.4077187329 -3.9941500851 -0.8285131423
N 2.8869951517 -5.0285796855 -0.6203119089
C 2.8313461836 -1.5942005332 -1.3456765597
C 4.1767614761 -1.7405237287 -1.0148850972
C 5.0568892080 -0.6776891408 -1.2035794310
C 4.5997562200 0.5340468143 -1.7084852508
C 3.2521063943 0.6711495937 -2.0245625532
C 2.3644493392 -0.3807077489 -1.8523676673
O 2.8010958802 -1.8531374338 -2.5643412261
C 2.1731624806 2.7499226816 -1.7322215535
C 2.2685083103 2.6923586305 -0.3444249124
C 1.6208653302 3.6626820909 0.4168741996
C 0.8820744314 4.6721700801 -0.1908576910
C 0.7941710017 4.7112236755 -1.5818087683
C 1.4378040915 3.7550624056 -2.3573244181
C -1.0632755509 1.1177175549 -0.2464585184
C -0.6858156198 1.1358467678 2.2462126330
H -2.9408602118 -1.7459361099 -0.5798603013
H 4.5449042306 -2.6809907843 -0.6060596393
H 6.1077852767 -0.7940794217 -0.9456125132
H 5.2690347035 1.3796208503 -1.8594917944
H 1.3152058003 -0.2436154940 -2.1164048671
H 2.7974335786 1.8787697171 0.1480228461
H 1.6976371703 3.6162355026 1.5033862567
H 0.3773733450 5.4240208540 0.4130813822
H 0.2150360391 5.4934432249 -2.0706103753
H 1.3811150941 3.7691026404 -3.4445510838
H -1.4335217555 0.5559571867 -1.1092663895

H -0.0340075267 1.4436635462 -0.4559273509
H -1.6761490514 2.0246914687 -0.1445844365
H 0.3514369513 1.4772727480 2.1273567104
H -0.7469471763 0.54964945796 3.1731543496
H -1.3292983713 2.0203837526 2.3607322390
C 4.8760199059 1.2134279471 2.1946828919
C 4.6219149070 -0.2549783158 2.3087625816
C 3.2612610959 -0.6973684635 1.9148422982
O 3.0580054313 -2.0178448245 2.0233152921
O 2.3899711024 0.0611479989 1.5308836504
C 5.5402975811 -1.1423006345 2.7009969065
H 5.3281499402 -2.2075487970 2.7498561090
H 6.5432139796 -0.8258678458 2.9865579411
H 2.1674788574 -2.1884107116 1.6532255925
H 4.8678878831 1.5299326038 1.1404361499
H 5.8510146441 1.4796074156 2.6181260460
H 4.0995201943 1.7993736949 2.7040207862

Interaction site: Nitrile

Monomer : MAA

C 2.4066836919 -0.0569886458 -1.1827006737
C 0.9330500053 -0.4031136388 -1.1255787451
C 1.4758198483 0.8555342727 -0.4373397256
H 2.7217112713 0.3170201722 -2.1596510358
C 3.4341694374 -0.8550832117 -0.4808316794
C 4.6943705049 -0.4601333448 -0.3374432131
Br 6.0178754276 -1.5340427205 0.5567619350
Br 5.3506164444 1.2247818436 -1.0022216939
H 0.3558330536 -0.2225682833 -2.0310699469
C 0.4122518733 -1.5018967624 -0.3023137643
O 0.9722079985 -2.0971728241 0.5906495003
O -0.8823215770 -1.7543240476 -0.6431911383
C -1.5731362888 -2.6286499931 0.2383796370
H -0.8868505336 -3.4227505114 0.5727804421
C -2.6488183303 -3.2504965149 -0.5386041239
N -3.5160423966 -3.7675034802 -1.1073981009
C -2.1411566206 -1.8947476361 1.44133549607
C -2.7650564434 -2.6284514431 2.4466980891
C -3.2851861376 -1.9624856856 3.5521073715
C -3.1805942959 -0.5822220547 3.6559912379
C -2.5497131247 0.1386832305 2.6439802167
C -2.0278023626 -0.5120075189 1.5301720135
O -4.294771672 1.4809728613 2.8615157767
C -2.1901589578 2.3860483417 1.8532752297
C -2.8500849410 2.3510861535 0.6259844556
C -2.6272343479 3.3851736039 -0.2797615212
C -1.7639966614 4.4345665156 0.0251674011
C -1.1064250449 4.4481127534 1.2523777145
C -1.3171325570 3.4241916697 2.1685793487
C 1.5552551812 0.9332297067 1.0652865311
C 1.1069165398 2.1592030775 -1.0950368047
H 3.1494460013 -1.8104138158 -0.0403707569
H -2.8475150593 -3.7125165998 2.3679261210
H -3.7742106339 -2.5260075253 4.3445441289
H -3.5746946082 -0.0442190387 4.5158218699
H -1.5575930090 0.0559217070 0.7307563486
H -3.5224113141 1.5294537704 0.3753652562
H -3.1454927115 3.3726370028 -1.2377314488
H -1.6040628716 5.2366143977 -0.6930479220
H -0.4259483936 5.260477583 1.5023449598
H -0.8247962417 3.4158927770 3.1395560682
H 1.7080814187 -0.0391393106 1.5452566828
H 0.6342846382 1.3770448129 1.4736749799
H 2.3878685405 1.5889461227 1.3586139832
H 0.1034799434 2.4844143864 -0.7817492471
H 1.113555953 2.0866314681 -2.1906439881
H 1.8170713723 2.9470725978 -0.8042988739
C -5.2828093713 1.7023920523 -2.2314244625
C -5.7917591681 0.3306409224 -2.5338421428
C -5.0895030695 -0.7727156082 -1.8283267584
O -5.5505689312 -1.9881093007 -2.1358309558

Interaction site :Ether

Monomer : MAA

C 2.1007326848 -0.1564702445 -1.9765367943
C 0.6583759237 -0.4369338406 -2.3482100030
C 1.0866499046 0.9366841476 -1.8187624555
H 2.7540499125 -0.0548464468 -2.8474411885
C 2.7528239845 -0.7977747653 -0.8118622613
C 3.8405312821 -0.3101472092 -0.2258056752
Br 4.7012708123 -1.1865153262 1.2557216315
Br 4.6939776961 1.3217070449 -0.7891086347
H 0.4302173608 -0.4753597676 -3.4121121552
C -0.2117369419 -1.2901929829 -1.5289936098
O -0.0361312559 -1.6568476586 -0.3868911246
O -1.3330612279 -1.5986826880 -2.2333421279
C -2.3109593672 -2.4064887460 -1.5657069999
H -1.8130356420 -2.9403379508 -0.7411665653
C -2.7602508792 -3.3898135885 -2.5550563086
N -3.1221020670 -4.1714062702 -3.3303176164
C -3.4313438317 -1.5494045593 -1.0169762310
C -4.7741063343 -1.8064675382 -1.2852565625
C -5.7627546805 -1.0052284694 -0.7204269906
C -5.4226040532 0.0610135902 0.1040489326
C -4.0797147489 0.3046540239 0.3585129143
C -3.0799236004 -0.4867547423 -0.1865982276
O -3.7412389810 1.3153233606 1.2412170123
C -3.0515800366 2.4131910240 0.7594342695
C -3.0748376016 2.7813182984 -0.5817245520
C -2.3933383667 3.9312704381 -0.9767466056
C -1.7068101002 4.7048713128 -0.0473690011
C -1.7018185220 4.3226944468 1.2928195660
C -2.3693215240 3.1756459879 1.7019797529
C 0.6713057229 1.3718123926 -0.4392962961
C 1.0902694006 2.0452315361 -2.8392844228
H 2.3317690158 -1.7187944379 -0.4077412442
H -5.0580750548 -2.6353195595 -1.9323813920
H -6.8100063036 -1.2125689788 -0.9311190778
H -6.1789246355 0.6995336697 0.5561961854
H -2.0410237566 -0.2742887818 0.0668207957
H -3.6202448538 2.1856614517 -1.3113281451
H -2.4125998424 4.2244020024 -2.0254295851
H -1.1795949973 5.6029543162 -0.3640189321
H -1.1678632111 4.9203411072 2.0301027458
H -2.3655604960 2.8575360721 2.7428639237
H 0.6716400373 0.5605871392 0.2953105858
H -0.3390297947 1.8088220424 -0.4570868750
H 1.3567009096 2.1543388091 -0.0817575892
H 0.0859809702 2.4786433998 -2.9459626331
H 1.4167990679 1.6993192614 -3.8290547367
H 1.7672778937 2.8521961719 -2.5247087402
C 0.8662899093 -1.7188005082 2.9513576171
C -0.5788203944 -1.6980589398 3.3325263057
C -1.3295360697 -0.5089698532 2.8591375121
O -2.6326888860 -0.5062114002 3.1710394676
O -0.8125401456 0.3970899399 2.2337681536
C -1.1847404224 -2.6571278323 4.0376713943
H -2.2415380820 -2.6079137264 4.2901162962
H -0.6351274331 -3.5304856569 4.3876678215
H -3.0182427200 0.2876999275 2.7388201679
H 0.9755499165 -1.6865088340 1.8580343546
H 1.3633304117 -2.6195295679 3.3298342924
H 1.3952220443 -0.8389280970 3.3418636614

Interaction site: Carbonyl group.

Monomer : AM

C 1.4849016217 -1.0965315221 1.4598513991
C 0.1162770605 -0.4657108650 1.6576269535
C 0.2649433515 -1.9223458090 1.1959856899
H 1.9878319212 -1.3158178685 2.4059314179
C 2.4029499456 -0.6438396342 0.3894419797
C 3.3674017801 -1.3994472311 -0.1226581520
Br 4.5738129002 -0.7482053107 -1.4711810979
Br 3.6838345095 -3.2156939937 0.4279724051
H -0.2167304480 -0.3258671917 2.6843342819
C -0.4012307881 0.5354504495 0.7220904991
O -0.0473405482 0.7161349317 -0.4268559013
O -1.3962408429 1.2507465192 1.3003338812
C -2.0551411939 2.2276257324 0.4814214482
H -1.4854289197 2.3328196477 -0.4552321571
C -1.9760398637 3.5036693587 1.1961646521
N -1.9061755229 4.5194216285 1.7497333147
C -3.4671318854 1.7829452636 0.1745361872
C -4.5676266537 2.6105423448 0.3738054000
C -5.8379892576 2.1583330666 0.0229550292
C -6.0165579871 0.8883825595 -0.5061331895
C -4.9077704021 0.0652966919 -0.6943431161
C -3.6318535615 0.5085222968 -0.3676435732
O -5.1256035524 -1.1537731240 -1.275641029
C -4.3904337003 -2.2441494064 -0.8614882124
C -4.2833869991 -2.5710312439 0.4884596971
C -3.6071414903 -3.7317898068 0.8490105339
C -3.0395943114 -4.5533368315 -0.1235697475
C -3.1584479150 -4.2129879385 -1.4682702447
C -3.8328536286 -3.0543928404 -1.8437183109
C -0.1125788927 -2.3071927880 -0.2108835887
C -0.1109615041 -2.9514189487 2.2311181935
H 2.3133821089 0.3707498116 0.0019098424
H -4.4442199542 3.6053528384 0.7991049898
H -6.7007925359 2.8037020451 0.1780933948
H -7.0025351583 0.5146901795 -0.7754084144
H -2.7740296778 -0.1378718456 -0.5542936791
H -4.7388005023 -1.9298172136 1.2420532321
H -3.5378649042 -4.0033828229 1.9018719577
H -2.5073489579 -5.4572223068 0.1682488675
H -2.7192940959 -4.8497165354 -2.2346762199
H -3.9399108681 -2.7696514033 -2.8890394653
H 0.2396560566 -1.5962010307 -0.9639088485
H -1.2049448451 -2.3994453322 -0.3022712221
H 0.3115382731 -3.2929525851 -0.4489174765
H -1.1976342385 -3.1142202278 2.2360502443
H 0.1915785108 -2.6527144055 3.2433292059
H 0.3682361242 -3.9148444451 2.0059446962
C 2.8275330477 5.0365082020 -1.7944032900
C 2.1281724326 3.7430449582 -2.0268214497
N 1.4880336308 3.2394646454 -0.9378996248
O 2.1098864809 3.1817184373 -3.1162313671
H 1.0376830641 2.3326334774 -1.0168707752
H 1.5965589176 3.6396199240 -0.0150647088
C 3.4778491693 5.6365993034 -2.7878107406
H 2.7819447908 5.4799882531 -0.7985029349
H 3.5056821340 5.1805060208 -3.7769889368
H 3.9949077753 6.5844739213 -2.6530884858

H 1.3316298132 -2.9037824770 -1.6633795570
C 2.5057693136 -3.9901227286 -0.3123506133
N 2.9350072766 -4.9993453527 0.0627419314
C 3.0335163285 -1.6921152852 -1.1150441042
C 4.3940019930 -1.9570626156 -0.9717005095
C 5.3294738688 -0.9710649289 -1.2713341915
C 4.9168926195 0.2846350518 -1.7001505073
C 3.5575507453 0.5377149444 -1.8417982248
C 2.6121905554 -0.4397048560 -1.5598222358
O 3.1603279525 1.7604198204 -2.3290635964
C 2.4776819948 2.6136124005 -1.4945369947
C 2.5152722745 2.5013202759 -0.1078827819
C 1.8343239604 3.4397913396 0.6631001064
C 1.1197681602 4.4730931006 0.0655009535
C 1.0898309220 4.5673842456 -1.3249066318
C 1.7647018452 3.6402640787 -2.1102187258
C -0.9725240450 1.1640079193 -0.2545625791
C -0.7930248116 1.1916578331 2.2663755055
H -2.7615044715 -1.6788841153 -0.7509409004
H 4.7306646303 -2.9326417605 -0.6227195609
H 6.3911510362 -1.1806730091 -1.1550378627
H 5.6305817358 1.0740146957 -1.9283600955
H 1.5540386579 -0.2126204593 -1.6935539950
H 3.0363537914 1.6767131463 0.3746334041
H 1.8630652433 3.3476034004 1.7489706973
H 0.5890547397 5.2000535371 0.6776346695
H 0.5307641980 5.3686887044 -1.8060845454
H 1.7532175684 3.6971922530 -3.1974758084
H -1.2247626238 0.5748557456 -1.1421622013
H 0.0588570422 1.5302973421 -0.3586729720
H -1.6316774469 2.0439235403 -0.2345808607
H 0.2773026408 1.4355824002 2.2820475040
H -1.0238617126 0.6348495971 3.1848356948
H -1.3691757538 2.1282990846 2.2824735579
C 4.7724683593 -0.0675252812 2.2338490966
C 3.3740636868 -0.5752353006 2.2075258698
N 3.2660987960 -1.9253440065 2.3056655113
O 2.3956416796 1.0595915953 2.1007401119
H 2.3414595294 -2.3371630467 2.3037689405
H 4.0548957201 -2.5286219675 2.5000744896
C 5.0271059096 1.2330507469 2.3520453909
H 5.5833954863 -0.7950069796 2.1655358623
H 4.2116267751 1.9507350491 2.4398982913
H 6.0423756540 1.6231433552 2.3775153285

Interaction site: Nitrile.

Monomer : AM

C 2.6430783308 -0.0224810702 -0.9951319652
C 1.1525333617 -0.2622203416 -1.0532978934
C 1.7318200939 0.8880698391 -0.2207557536
H 3.0427102716 0.4119113945 -1.9144449405
C 3.5735561962 -0.9459028889 -0.3109944979
C 4.8335759210 -0.6309616585 -0.0311509009
Br 6.0410786297 -1.8583957770 0.8276388245
Br 5.6048473494 1.0840470264 -0.4524537483
H 0.6443124601 0.0450848058 -1.9659361664
C 0.4848078940 -1.3668699657 -0.3529334418
O 0.9407242342 -2.1205088769 0.4757652585
O -0.8263980245 -1.4036974905 -0.7247515708
C -1.6584208592 -2.2284594319 0.0800018718
H -1.1742982122 -3.2030867069 0.2508046708
C -2.8801281804 -2.4420379905 -0.7059540136
N -3.8618017138 -2.6139984131 -1.2950285597
C -1.9976044766 -1.5804873913 1.4105427037
C -2.4744209287 -2.3755852592 2.4475057438
C -2.8094590918 -1.7792624009 3.6603444215
C -2.6687332388 -0.4101824857 3.8354743841
C -2.1878058656 0.3751923485 2.7883203295
C -1.8559799809 -0.2035909491 1.5662551888
O -2.0186213115 1.6993709374 3.0709475567
C -1.8525916326 2.6401660541 2.0767728787
C -2.7555558721 2.7680511898 1.0246359874
C -2.5765742183 3.7965556159 0.1044942694
C -1.5197251309 4.6941492153 0.2411482448

Interaction site: Singly bound oxygen of ester.

Monomer : AM

C -2.1569544966 -0.6846400554 1.1408367655
C -0.6921551189 -1.0738862007 1.0972466532
C -1.1166210000 0.3932637833 1.0308420981
H -2.6004168428 -0.7927364909 2.1335316023
C -3.0818408856 -0.9871711932 0.0280401193
C -4.2884657852 -0.4446368154 -0.0910894389
Br -5.4818014737 -0.8862331391 -1.5363762599
Br -4.9912897493 0.8439357321 1.1556503225
H -0.2360798576 -1.3678423888 2.0408685011
C -0.0681960507 -1.6903508614 -0.0784968612
O -0.4806346379 -1.7088474279 -1.2189384017
O 1.1290722982 -2.2270498826 0.2748937784
C 1.9657119613 -2.7125940926 -0.7839617406

C	-0.6323426194	4.5597101317	1.3056570626
C	-0.7930329655	3.5285946486	2.2260366281
C	1.7221933873	0.8178634123	1.2845249323
C	1.4809802177	2.2675172188	-0.7702322008
H	3.2140227269	-1.9288069919	-0.0067040390
H	-2.576022920	-3.4526054872	2.3149386642
H	-3.1772812054	-2.3907348655	4.4821111347
H	-2.9147910256	0.0707032465	4.7802680440
H	-1.4832739310	0.4096378710	0.7474516057
H	-3.5921619827	2.0764824140	0.9345392164
H	-3.2790632865	3.9006921296	-0.7209726113
H	-1.3914750957	5.4984616711	-0.4808761042
H	0.1958478322	5.2570394820	1.4211655253
H	-0.1153425265	3.4059468722	3.0694447801
H	1.7987717255	-0.2025706508	1.6745435987
H	0.7997196993	1.2673245820	1.6817381260
H	2.5650250982	1.3965772449	1.6886624068
H	0.4677844757	2.6110593557	-0.5124306365
H	1.5821593399	2.3015257371	-1.8631156042
H	2.1933140751	2.9874542050	-0.3408346049
C	-6.4762607027	-0.3630624759	-2.4201730693
C	-7.2253662226	-1.5395228659	-2.9445275770
N	-6.5916607980	-2.7223663714	-2.7573777736
O	-8.3167277176	-1.4422354683	-3.4966034241
H	-7.0309063180	-3.5753903964	-3.0831918552
H	-5.6883939764	-2.7857735386	-2.2964004085
C	-6.9762050440	0.8641658845	-2.5341956143
H	-5.5102966040	-0.5424485545	-1.9434324834
H	-7.9422785910	1.0199840830	-3.0136210476
H	-6.4500016782	1.7406181475	-2.1615215529
H	0.5522495853	0.5446736970	0.3588753809
H	-0.4724071865	1.5824601064	-0.6406847448
H	1.1961673213	2.0640592915	-0.2988590229
H	-0.0212570721	1.7917239338	-3.1944914334
H	1.3557061210	0.9152542504	-3.8979956330
H	1.6357622937	2.3063197850	-2.8285983589
C	-0.8459914072	-1.1859778905	3.8392800324
C	-1.5165100190	-0.0962039989	3.0821622465
N	-2.7890927492	0.1784028832	3.4650396803
O	-0.9606123731	0.5247569944	2.1796733870
H	-3.3206332704	0.8330150559	2.8983834594
H	-3.2942847325	-0.3955227972	4.1279197718
C	0.3835914701	-1.5682261022	3.5040460987
H	-1.3862909779	-1.6582952148	4.6614648512
H	0.8911483633	-1.0764996265	2.6743233474
H	0.9088714494	-2.3647834293	4.0271834445

Template + Four monomers complexes

Deltamethrin-(MAA)

4

C	2.7250541987	0.0070439120	0.8952266055
C	1.6973809669	0.9873060188	0.3853007899
C	1.2968607990	-0.1450390138	1.3389233433
H	3.3837204008	0.4528499633	1.6470794639
C	3.3912248750	-0.9976109793	0.0376546964
C	4.1090017768	-2.0060030685	0.5212905097
Br	5.0277033149	-3.2545971187	-0.6146895735
Br	4.3226557812	-2.3318424311	2.4060213332
H	1.7020494206	1.9782800560	0.8422239195
C	1.1661336809	0.9963929595	-0.9800621754
O	1.4004868395	0.2547742850	-1.9066495088
O	0.2220557132	1.9808770991	-1.0714952392
C	-0.4223514694	-2.1985067703	-2.3344424998
H	0.0968002852	1.5972311231	-3.0972913387
C	-0.2219159132	3.6194393704	-2.6358353853
N	-0.0525268813	4.7056554912	-2.8285594748
C	-1.8806693674	1.8130277200	-2.2158879106
C	-2.9124222394	2.6536774328	-2.6280418714
C	-4.2360154278	2.2576002945	-2.4584415049
C	-4.5401972349	1.0391605782	-1.8635021143
C	-3.4994799667	0.2089598869	-1.4686254192
C	-2.1727504829	0.5724507493	-1.6512593873
O	-3.8024618982	-1.0216239007	-0.9210992941
C	-3.3746174002	-1.2895760784	0.3705698720
C	-3.2162960769	-0.2850338853	1.3186120420
C	-2.8016162350	-0.6341306260	2.6009118064
C	-2.5704116632	-1.9655204607	2.9349590801
C	-2.7606283698	-2.9591009575	1.9770621704
C	-3.1613648032	-2.6261220610	0.6878868310
C	0.4718178460	-1.2906297765	0.8171205774
C	0.9465477554	0.2839255470	2.7397926949
H	3.3115085755	-0.9225825531	-1.0469031592
H	-2.6909687821	3.6230786607	-3.0722038352
H	-5.0412573563	2.9180092229	-2.773553479
H	-5.5654859013	0.7267659180	-1.6733547876
H	-1.3840129517	-0.1153471770	-1.3439874172
H	-3.3972469910	0.7559616119	1.0568509895
H	-2.6565410417	0.1508392917	3.3435174336
H	-2.2444139865	-2.2286687871	3.9396845752
H	-2.5851163032	-4.0033955110	2.2296272884
H	-3.3046856623	-3.3859732621	-0.0788759456
H	0.7381758996	-1.6054070433	-0.1997009459
H	-0.5950500011	-1.0185628035	0.8419446220
H	0.5950087153	-2.1657270885	1.4716768187
H	-0.1071510028	0.5952673155	2.7938303973
H	1.5713658720	1.1211936107	3.0813958492
H	1.0794669393	-0.5514277106	3.4424904216
C	4.8948193628	2.5855855273	-0.2538722809
C	3.8333451342	3.5693950328	0.1215011393
C	2.8746085668	3.9015623573	-0.9631596421
O	2.2232122575	5.0526740427	-0.7880499845
O	2.7020284272	3.1843500810	-1.9339429369
C	3.6638964294	4.0621450248	1.3518889581

Interaction site: Ether.

Monomer : AM

C	2.0797959852	-0.5277664877	-1.7251465260
C	0.6570459503	-0.9348800476	-2.0427747696
C	1.0141725352	0.5307823895	-1.7849288529
H	2.7398412175	-0.5576065568	-2.5956421766
C	2.7461757192	-0.8875971391	-0.4550827695
C	3.8819936638	-0.3342891596	-0.0453595615
Br	4.7529362214	-0.8494565668	1.5931705426
Br	4.7984428743	1.0417201337	-1.0339650070
H	0.4432340171	-1.1830467606	-3.0812470560
C	-0.1975996807	-1.6487060368	-1.0815820347
O	0.0194833165	-1.8712256685	0.0881725126
O	-1.3575363892	-2.0106281647	-1.6967069316
C	-2.3428919467	-2.6545429667	-0.8796096662
H	-1.8564244587	-2.9607800756	0.0600465723
C	-2.7568507282	-3.8626340216	-1.5975084994
N	-3.0884425541	-4.8216450302	-2.1576088208
C	-3.4831435600	-1.7019376644	-0.5919110158
C	-4.8106626073	-2.0121181319	-0.8804394844
C	-5.8194931198	-1.1052133651	-0.5670544554
C	-5.5127838613	0.1136901677	0.0258736437
C	-4.1835210574	0.4085177668	0.3051133771
C	-3.1636499171	-0.4853553141	0.0086815900
O	-3.8929409535	1.5877409248	0.9590684112
C	-3.0878895006	2.5101376655	0.3221976919
C	-3.0875098538	2.6589977951	-1.0617449485
C	-2.3075954880	3.6613714618	-1.6337712942
C	-1.5420529891	4.5055922958	-0.8357233937
C	-1.5578350697	4.3432273027	0.5482794749
C	-2.3219921321	3.3408747170	1.1333106845
C	0.5519112082	1.1997671225	-0.5182932216
C	0.9963073018	1.4272306126	-2.9953424166
H	2.2851404852	-1.6368419740	0.1883857770
H	-5.0658657368	-2.9608656181	-1.3508144489
H	-6.8545636897	-1.3511196471	-0.7959856564
H	-6.2853385089	0.8388445717	0.2747045939
H	-2.1416918841	-0.2217548938	0.2890923752
H	-3.6968277107	2.0061818462	-1.6847040321
H	-2.3104146437	3.7841279755	-2.7160612932
H	-0.9374694834	5.2892137622	-1.2887723913
H	-0.9603614809	4.9971817771	1.1817438435
H	-2.3334733062	3.1875190644	2.2106171267

H 2.8456598687 4.7366003717 1.5926290828
H 4.3292414146 3.7767393699 2.1670730744
H 1.5962879048 5.1560322297 -1.5342362174
H 4.4485025807 1.6669306793 -0.6601508192
H 5.5181725637 2.3228962680 0.6086062214
H 5.5490519589 2.9822360306 -1.0427795683
C -9.1833094024 -1.4026752693 1.1908468388
C -8.2572231213 -2.2802098824 0.4120756714
C -7.0460698201 -1.6047813075 -0.1188988058
O -6.2453926173 -2.3957120787 -0.8407185089
O -6.7998169600 -0.4295963284 0.0823055094
C -8.4677779851 -3.5815287873 0.1968897488
H -7.7698469355 -4.1926167465 -0.3705495786
H -9.3538896366 -4.0810234343 0.5878930675
H -5.4583761874 -1.8573608387 -1.0244568220
H -8.6748468809 -0.9658421162 2.0615513884
H -10.0524990613 -1.9658893271 1.5488656246
H -9.5367667353 -0.5583972440 0.5853810413
C 2.1567977650 -5.5076633785 -3.0935379063
C 2.6763216419 -4.1958683149 -3.5866704874
C 2.1155497384 -3.0016736268 -2.9053776501
O 2.5853557943 -1.8327627840 -3.3584776934
O 1.2928877704 -3.0721565341 -0.122834162
C 3.5825292150 -4.0686117105 -4.5598919494
H 3.9403310267 -3.0963251371 -4.8900115444
H 3.9978209161 -4.9431930806 -5.0602004161
H 2.1150262101 -1.1244729351 -2.8668008316
H 2.3729946352 -5.6410243728 -2.0244568368
H 2.6053515185 -6.3425038926 -3.6435346160
H 1.0653246971 -5.5690595207 -3.1956708524
C -0.3584148783 4.3050794456 4.3332425396
C -1.2362808014 3.5347922357 3.4007114443
C -0.6304925358 3.2204444273 2.0833531637
O -1.3552396512 2.3828472152 1.3266068174
O 0.4419550244 3.6640078664 1.7174853772
C -2.4863633213 3.1599831051 3.6881722974
H -3.1087384666 2.6272035975 2.9723456671
H -2.9393702503 3.3988352741 4.6495668718
H -0.8670317670 2.2634382011 0.4839994097
H 0.5715341366 3.7593855086 4.5466954633
H -0.8682713504 4.4996663104 5.2832044332
H -0.0593224408 5.2652958506 3.8938455589

Deltamethrin-(AM)

4
C -1.7823096662 0.0181244506 -0.9500190243
C -0.2946893488 0.2745261199 -1.1162103318
C -0.8364248329 -1.1431899261 -0.9490783874
H -2.3469951530 0.1594696904 -1.8771539981
C -2.4757702623 0.5395459017 0.2509901295
C -3.4567153365 -0.0797052082 0.8948624160
Br -4.3396417482 0.7154737474 2.4135537611
Br -4.1295860298 -1.8145712864 0.4034840135
H 0.0582003787 0.5579512510 -2.1064420773
C 0.4512951293 0.8926447206 -0.0164131718
O 0.2022651123 0.8185883498 1.1699133061
O 1.5435903023 1.5344638235 -0.4938682873
C 2.2752886583 2.2859985373 0.4594709270
H 1.5901441601 2.5632903757 1.2766530596
C 2.6787776783 3.5330644594 -0.2024055296
N 3.0160526905 4.5321580870 -0.6848627346
C 3.4616771445 1.5195045526 1.0172051005
C 4.3904130675 2.1936930934 1.8091293303
C 5.4640240397 1.4976716141 2.3536712406
C 5.6089478439 0.1354418638 2.1238573930
C 4.6707849132 -0.5287244341 1.3387067321
C 3.5952538404 0.1547252318 0.7750816644
O 4.8997705461 -1.8623467629 1.1312934674
C 3.8392592439 -2.6984817893 0.8110418539
C 3.6887551667 -3.1277300160 -0.5007903918
C 2.6925870098 -4.0572961197 -0.7916214975
C 1.8583461957 -4.5335509223 0.2169066500
C 2.0124764401 -4.0727625504 1.5232305994
C 3.0095084619 -3.1526680089 1.8290976130
C -0.5359899578 -1.9040059842 0.3175423256
C -0.7861040246 -1.9882927012 -2.1959343154
H -2.1767767692 1.5272158713 0.6113808853

H 4.2800584677 3.2614586900 1.9980654797
H 6.1922650277 2.0205396629 2.9709138406
H 6.4394770119 -0.4291643776 2.5441900000
H 2.8920776108 -0.3744544236 0.1331910547
H 4.3517888799 -2.7243020282 -1.2654826187
H 2.5702802161 -4.4112167140 -1.8146474744
H 1.0779276041 -5.2559410602 -0.0177398597
H 1.3535084909 -4.4224727521 2.3173653058
H 3.1388174883 -2.7962879845 2.8511957187
H -0.9287472895 -1.4114308705 1.2091863904
H 0.5483802804 -2.0335993384 0.4543817328
H -0.9789559516 -2.9080280544 0.2653190288
H 0.1853480442 -2.4975844104 -2.2725074075
H -0.9338803755 -1.3943622720 -3.1081394075
H -1.5669848358 -2.7619396197 -2.1674008290
C 2.8220419467 0.0972203570 -3.2843864995
C 3.0464122652 1.5388655972 -2.9919753000
N 4.1833901360 1.7888308497 -2.3080777331
O 2.2728342449 2.4259538505 -3.3582324675
H 4.4442441099 2.7511066427 -2.1248037631
H 4.8042089454 1.0321403213 -2.0128310138
C 1.8179260101 -0.2882664767 -4.0686543287
H 3.5353480855 -0.6155807491 -2.8631824460
H 1.1355532322 0.4484999461 -4.4949521210
H 1.6536704782 -1.3331476024 -4.3249571093
O -0.4673259523 3.17366640333 3.7466489329
C 1.0032963108 -1.4130802452 3.9736274040
N 1.6681002857 -0.3474204120 3.4618042005
O 1.5639169130 -2.3193860580 4.5855750772
H 2.6795921111 -0.3367986586 3.5271815796
H 1.2285724992 0.2667033937 2.7810820186
C -1.2389073613 -2.3979330855 4.1097153242
H -0.8823892392 -0.4930733346 3.2549198694
H -0.8051984777 -3.2730057356 4.5934868657
H -2.3144152470 -2.3972298013 3.9421716548
C -2.5204784649 3.8580928283 -1.6572913417
C -1.0968372445 3.5060784532 -1.4043114146
N -0.3392236696 3.3715531213 -2.5124321692
O -0.6554841435 3.3438795667 -0.2628471433
H 0.6411494164 3.0893083168 -2.4617423400
H -0.7346706279 3.4528014865 -3.4395875216
C -3.3600072292 4.0695701294 -0.6465593124
H -2.8538283074 3.9410605714 -2.6930399585
H -3.0098907292 4.0006089782 0.3834952996
H -4.4047572985 4.3284870267 -0.8064241864
C 7.7222090455 -0.5187645428 -2.7289260595
C 6.7815327459 -0.9682764512 -1.6744742267
N 7.3048356056 -1.7550894128 -0.7157510424
O 5.5857675451 -0.6504499509 -1.6648495141
H 6.6942941037 -2.0678203907 0.0342528896
H 8.2692666246 -2.0616751144 -0.7175872049
C 7.2940469280 0.2120178803 -3.7558042066
H 8.7702153188 -0.8059646978 -2.6392261175
H 6.2436042912 0.4908321868 -3.8440193542
H 7.9672925072 0.5524947701 -4.5396688964

Deltamethrin-(AM) *

4
C -1.8653769311 -0.0598618621 -0.7427899762
C -0.4790212801 0.4583807249 -1.0667357859
C -0.7417175664 -1.0382471725 -0.9149967775
H -2.5534161217 0.0015922216 -1.5922145536
C -2.4996694991 0.2857653966 0.5500599755
C -3.3705677186 -0.4820862738 1.1926710144
Br -4.2158491183 0.0838957292 2.8308166483
Br -3.9264337374 -2.2152422720 0.5664090428
H -0.3086404367 0.8293090927 -2.0763127427
C 0.2966988688 1.1469202730 -0.0306741539
O 0.1553284288 1.0590692534 1.1712831232
O 1.2950796832 1.8747896349 -0.5894533215
C 2.0175730568 2.6780071945 0.3265118434
H 1.3149871038 3.0759914646 1.0763942326
C 2.5455374192 3.8232367264 -0.4267662848
N 3.0025203403 4.7416568048 -0.9673361306
C 3.1435599692 1.9466095420 1.0369682276
C 3.7128077299 2.5676855723 2.1494367899

C 4.7580992090 1.9514323924 2.8257771646
C 5.2293443044 0.7112774226 2.4060860685
C 4.6533672687 0.0997456882 1.2973023943
C 3.6101526479 0.7107242920 0.5977725264
O 5.1932330775 -1.0997555052 0.8934234789
C 4.3119330838 -2.1214761580 0.5529749488
C 4.3686781624 -2.6336918912 -0.7355596501
C 3.5195366542 -3.6856729380 -1.0742116434
C 2.6383739703 -4.2121055105 -0.1336170304
C 2.6121806798 -3.6934656150 1.1599880282
C 3.4524283080 -2.6438338366 1.5135707358
C -0.1456135227 -1.7677219613 0.2615654287
C -0.7113130985 -1.8245302672 -2.2002911223
H -2.2696640502 1.2631046466 0.9794682507
H 3.3331884987 3.5325139132 2.4867756820
H 5.2019579870 2.4302227246 3.6962586149
H 6.0400116142 0.2046361671 2.9259720148
H 3.1731168355 0.2249777759 -0.2748606536
H 5.0972082843 -2.2287971045 -1.4377165213
H 3.5526166262 -4.0963713232 -2.0822703322
H 1.9716422612 -5.0283540800 -0.4073881191
H 1.9280139074 -4.0970127722 1.9060920826
H 3.4366872549 -2.2495100633 2.5299534222
H -0.4361161331 -1.3325280988 1.2210442091
H 0.9539503165 -1.7632128327 0.2073916727
H -0.4697298724 -2.8175261293 0.2578265590
H 0.3170803857 -2.1271934625 -2.4461683204
H -1.1077312746 -1.2471192749 -3.0462109278
H -1.3145857402 -2.7389266306 -2.1051653234
C 1.6159563325 0.9083081480 -1.133070223
C 2.0596856679 2.188838484 -3.5043294672
N 3.3467634013 2.2061621551 -3.0865742415
O 1.3224007732 3.1680360215 -3.3909554207
H 3.7352509854 3.0893167447 -2.7752482528
H 3.9932305198 1.4541938440 -3.2831143719
C 0.4252679426 0.8167223995 -4.7021439590
H 2.3023020541 0.0603898151 -4.0909666295
H -0.2462109065 1.6758156529 -4.7275556364
H 0.0893093500 -0.0990476418 -5.1843461219
C -0.3481373367 -1.4184794639 3.7591781437
C 1.1376582413 -1.3360985330 3.8290146689
N 1.6581468207 -0.1834917795 3.3412187987
O 1.8334797099 -2.2275056615 4.3112890283
H 2.6676082588 -0.1063130400 3.2939768470
H 1.1155672306 0.4331867853 2.7421077750
C -0.9858919563 -2.5131668191 4.1663335922
H -0.8892373002 -0.5591308552 3.3531777431
H -0.4248970414 -3.3589379250 4.5626927894
H -2.0693962856 -2.6039287985 4.1246432996
C -3.3816225638 3.7601294824 -1.0591600017
C -1.9155774746 3.5137163331 -1.1206037802
N -1.3895334471 3.4954691585 -2.3642718289
O -1.2412842093 3.3123181567 -0.1074123527
H -0.3828878423 3.3809609944 -2.5056498231
H -1.9358508438 3.7656397884 -3.1738858436
C -4.0118032142 3.8337530297 0.1107801882
H -3.9239061941 3.8773986065 -1.9990822576
H -3.4577154426 3.7273180678 1.0432992712
H -5.0830243438 4.0112717667 0.1799940911
C 9.5179377653 -3.3583732665 -1.1241185887
C 8.2251309447 -2.6334939260 -0.9911879799
N 7.9684391154 -2.1494620237 0.2497519779
O 7.4540950002 -2.4792448903 -1.9331844213
H 7.0808768250 -1.6873193236 0.4263165733
H 8.6017192235 -2.2775208012 1.0281279217
C 9.8614890470 -3.9209419387 -2.2795898865
H 10.1659491789 -3.4245720300 -0.2485786387
H 9.2004908881 -3.8470975637 -3.1426938013
H 10.7969334371 -4.4623073025 -2.4045391347
C -3.8259473046 1.2469957900 -0.8167142142
C -2.6999076462 1.2776333076 0.1865541440
C -2.4354523820 0.8946639130 -1.2730275213
H -4.1605621023 2.2470549020 -1.1071640293
C -4.9010167044 0.2327334264 -0.7836067757
C -5.7672892497 0.0501377707 -1.7734279265
Br -7.1908567399 -1.2420232553 -1.6663926331
Br -5.7039065192 1.0471432973 -3.4201215255
H -2.3208966600 2.2568672552 0.4714963290
C -2.4896251072 0.2618898187 1.2189301172
O -3.1213452876 -0.7656747185 1.3868807419
O -1.4128991322 0.6001817063 1.9642425032
C -0.9238144849 -0.3634658593 2.9106420295
H -1.5782987051 -1.2456708914 2.8666283477
C -1.0713940366 0.2411299649 4.2372741513
N -1.2182754067 0.7510854654 5.2692895479
C 0.4978682972 -0.7270489483 2.5585391860
C 1.5759985326 -0.4025525224 3.3779285210
C 2.8660837337 -0.7442284561 2.9844289807
C 3.0852945116 -1.3997995105 1.7801942181
C 2.0022366384 -1.7059151742 0.9647510668
C 0.7074773238 -1.3725328543 1.3395460740
O 2.2452442326 -2.4103152540 -0.1989592140
C 1.7342431378 -1.9154385596 -1.3943601663
C 1.7119073605 -0.5540115749 -1.6697624545
C 1.2627431674 -0.1310402211 -2.9159120133
C 0.8241781252 -1.0517952285 -3.8643728720
C 0.8446212370 -2.4116147631 -3.5648950617
C 1.3016476404 -2.8504828930 -2.3255570873
C -2.1255401086 -0.5386634434 -1.6206421439
C -1.6699207520 1.9155903825 -2.0731163598
H -4.9883510445 -0.4140400060 0.0884660275
H 1.4172912550 0.1214016048 4.3196595725
H 3.7191774465 -0.4880430723 3.6089703575
H 4.0965427981 -1.6638608286 1.4771407262
H -0.1309282070 -1.6377552317 0.6942996826
H 2.0692987277 0.1716867374 -0.9409116910
H 1.2636848066 0.9355388753 -3.1380023545
H 0.4622301876 -0.7101413532 -4.8326528875
H 0.5127517038 -3.1419788038 -4.3015010563
H 1.3401049076 -3.9090126944 -2.0736189560
H -2.7034499622 -1.2609210866 -1.0337928857
H -1.0529564511 -0.7473346336 -1.4869260012
H -2.3593897665 -0.7203221350 -2.6799654077
H -0.5986528313 1.8882353313 -1.8257533001
H -2.0299802937 2.9378714312 -1.8899398960
H -1.7719244058 1.7140207940 -3.1498151138
C 8.7549490375 -1.0588456729 2.6023554314
C 8.3670361604 -0.1282524578 1.4983413953
C 6.9036591899 0.0310291238 1.3077305106
O 6.5760562655 0.8429448015 0.2863365358
O 6.0744086473 -0.5125570163 2.0077989284
C 9.2448664537 0.5238149791 0.7305922649
H 8.9331406972 1.2098007875 -0.0534772404
H 10.3173264855 0.4026024695 0.8793995404
H 8.3998119889 -0.6906688291 3.5743931985
H 9.8431580529 -1.1754122839 2.6540938749
H 8.3029297593 -2.0503695687 2.4648173739
C 2.8277090600 5.2099673066 0.0654676206
C 3.4698898147 4.3527664436 -0.9802150379
C 2.9347119218 2.9736286420 -1.1010633601
O 3.7065883707 1.9770514888 -1.5558559021
O 1.7687190743 2.7110924937 -0.8584735711
C 4.3195903314 4.8166726248 -1.9017828759
H 4.7067608005 4.1974265806 -2.7095137682
H 4.6339027815 5.8597697905 -1.9006404886
H 1.7933991495 5.4497473975 -0.2179498519
H 3.3749750649 6.1515896179 0.1846475907
H 2.7930073506 4.7083380855 1.0423168231
C 5.1851242114 1.0836755578 0.0830919565
C 5.0915459716 1.8320956499 -1.2266145107
H 5.5266682087 1.2342570723 -2.0342866193
H 4.7814994031 1.6733372929 0.9220210922
H 4.6276081549 0.1414881023 0.0191975140
H 5.6067211463 2.7968889834 -1.1736912336
C -6.4922520061 -0.7106978042 2.6920944977

Template + Four monomers + Crosslinker complexes

Deltamethrin-(MAA) -EGDMA

4

C -5.7570423450 0.5899897589 2.6894991634
C -4.5962912550 0.6551772466 3.6102304265
O -3.8806523397 1.7933731380 3.5127241218
O -4.2988184803 -0.2297631922 4.3849585441
C -6.0945702835 1.6345599612 1.9273637564
H -5.5418460223 2.5713655827 1.9484377807
H -6.9546239407 1.5863094681 1.2587839444
H -3.1924348588 1.7536231305 4.2067493034
H -5.8272902862 -1.5413577743 2.4167778285
H -7.3318467371 -0.6888084603 1.9876913547
H -6.8833088433 -0.9472098530 3.6903448420
C -3.0431332482 6.1110472932 -0.1921286367
C -2.2621309260 5.0947031642 0.5767494297
C -0.9747415427 4.6833145272 -0.0460654895
O -0.3523912817 3.6878817063 0.5876546777
O -0.5396429448 5.1982943226 -1.0603354920
C -2.6531916911 4.5775928884 1.7459167353
H -2.0445814627 3.8502644066 2.2801766095
H -3.5814272715 4.8918952664 2.2226446651
H 0.4468987053 3.4429569729 0.0566178793
H -2.4672122471 7.0363737833 -0.3257798319
H -3.9827518354 6.3564223983 0.3188339734
H -3.2803312945 5.7491047229 -1.2028463925
C -1.2646671624 -5.5345004764 -1.5755979451
C -1.0507537574 -4.7744498426 -0.3066605866
C -2.1630686202 -3.8717290250 0.0791208848
O -1.9876420229 -3.2580265708 1.2595156898
O -3.1448053190 -3.6809149837 -0.6112864605
C 0.0643341547 -4.8383525796 0.4279062176
H 0.1845510218 -4.2651407825 1.3445542382
H 0.8913221597 -5.4892267629 0.1443300348
H -2.7104645778 -2.6014470455 1.3579604620
H -2.1620201293 -6.1652184632 -1.5141658609
H -0.4074528461 -6.1790712659 -1.8016442558
H -1.4255086695 -4.8536225888 -2.4223534452
C 7.8413527659 -1.4635428455 -1.9572857081
C 7.1020682145 -2.3725688130 -1.0292571666
C 5.6210622090 -2.2714666995 -1.0835354408
O 4.9790860285 -3.1976187745 -0.3619677739
O 5.0385009938 -1.4168519758 -1.7254072340
C 7.6984159118 -3.1822935327 -0.1486148610
H 7.1284273514 -3.8172311630 0.5260805977
H 8.7849405882 -3.2386046586 -0.0813577720
H 4.0159814681 -2.9926233385 -0.40212765634
H 7.5566921031 -1.6421890513 -3.0031625324
H 8.9246228652 -1.5997882244 -1.8639547374
H 7.6042416739 -0.4121504506 -1.7409715302

Deltamethrin-(AM) -EGDMA
4

C -3.9471411600 1.2553825041 -0.5609749576
C -2.7348307268 1.2966877505 0.3344723072
C -2.6189999798 0.8413530122 -1.1296298174
H -4.2714017348 2.2547165757 -0.8665843819
C -5.0678434239 0.3087472324 -0.3496254325
C -5.8701620901 -0.1050521699 -1.3225279158
Br -7.3479560210 -1.2974291749 -1.0010923280
Br -5.6811140011 0.4450421630 -3.1612795638
H -2.2956644335 2.2696314123 0.5511482106
C -2.4665367660 0.2847846959 1.3573445103
O -3.1324348987 -0.7003182967 1.6226054857
O -1.2819748285 0.5483245891 1.9608323443
C -0.7838739873 -0.4259148719 2.8900823846
H -1.4279108434 -1.3141833041 2.8264431428
C -0.9547739446 0.1403692146 4.2304937873
N -1.1660111953 0.6076391305 5.2709938147
C 0.6357791617 -0.7721502674 2.5248493401
C 1.7198802527 -0.4965131150 3.3532468456
C 3.0020240298 -0.8471484332 2.9398560357
C 3.2063140138 -1.4618859263 1.7107194537
C 2.1143808786 -1.7211488307 0.8901322065
C 0.8281070696 -1.3862082772 1.2887474599
O 2.3349123573 -2.3740767505 -0.3067091893
C 1.7265107525 -1.8637945444 -1.4500851268
C 1.7206354753 -0.4978737020 -1.7044523417
C 1.1605016390 -0.0394208101 -2.8908286421
C 0.6168008231 -0.9341887028 -3.8104046802
C 0.6425021994 -2.3000611376 -3.5411541036
C 1.1979070936 -2.7739403895 -2.3551076132
C -2.3391348433 -0.6104878296 -1.4250403487
C -1.9071381793 1.8021944995 -2.0456687808
H -5.2782149781 -0.0387703028 0.6621719689
H 1.5728979963 -0.0094572939 4.3167005148
H 3.8620782434 -0.6305023955 3.5700256782
H 4.2130702658 -1.7268117338 1.3926841825
H -0.0209868664 -1.6131366168 0.6439795858
H 2.1539528245 0.2035067975 -0.9944026921
H 1.1705018712 1.0308924135 -3.0960227532
H 0.1771498753 -0.5672443716 -4.7365061102
H 0.2262894012 -3.0079015758 -4.2566978078
H 1.2294357367 -3.8378674111 -2.1232605453
H -2.9339622154 -1.2987687371 -0.8157910027
H -1.2681940146 -0.8331662732 -1.2818257476
H -2.5689649578 -0.8311425292 -2.4763022125
H -0.8214624218 1.7599518873 -1.8763893347
H -2.2413085814 2.8363979492 -1.8900444115
H -2.0921476711 1.5400500102 -3.0976858062
C 8.9066440448 -1.3257764586 2.5219022878
C 8.5328616128 -0.2861822745 1.5145457966
C 7.0726234631 -0.0738141748 1.3566238842
O 6.576339789 0.8349789269 0.4152055445
O 6.2359994029 -0.6586348900 2.0130354041
C 9.4199501339 0.4170807994 0.8048215439
H 9.1196284940 1.1786487731 0.0891621683
H 10.4901974625 0.2548657138 0.9286931518
H 8.5567088629 -0.10509629900 3.5260553614
H 9.9929108079 -1.4635939208 2.5599279642
H 8.4394741511 -2.2919472942 2.2873039911
C 3.0163696845 4.9043033532 0.6984785475
C 3.6146448582 4.3042412906 -0.5356866197
C 3.0904582304 2.9667766947 -0.9198490481
O 3.8942938372 2.0180970206 -1.4024013447
O 1.8972006568 2.7120365052 -0.8615642264
C 4.4367328704 4.9517822911 -1.365658824
H 4.8056964381 4.5060309791 -2.2884632177
H 4.7410793039 5.9788464599 -1.1675763010
H 1.9353509396 5.0624644279 0.5780742045
H 3.4747487860 5.8733885138 0.9224011700
H 3.1438516105 4.2520289684 1.5731254182
C 5.3712777625 1.1083672801 0.2295628475
C 5.2797452102 1.8906522556 -1.0596580231
H 5.7269696317 1.3140023898 -1.8757411257
H 4.9844329022 1.6775897765 1.0902838880
H 4.7947763476 0.1797888921 0.1382557710
H 5.7768497135 2.8629810727 -0.9869908179
C -5.6922561825 -1.5142156718 3.7863675673
C -4.8978926146 -0.4188921841 4.4213871942
C -4.7730444263 0.8179800168 3.5965030190
O -3.7436681858 1.6471134941 3.8473046495
O -5.5542670957 1.0960655387 2.7146048738
C -4.3982346685 -0.4883306257 5.6585764300
H -3.8726580558 0.3335859863 6.1442014556
H -4.5301102036 -1.3803781370 6.2698963573
H -3.1608836200 1.2995343956 4.5473509963
H -6.7123610017 -1.1751804282 3.5640401619
H -5.7499342756 -2.3929139337 4.4380680179
H -5.2480638851 -1.8163309107 2.8281544543
C -1.1425026862 6.9911000513 -1.5566418520
C -0.5761023105 5.6090185886 -1.4796356934
C -1.1572886787 4.7572616717 -0.39729251765
O -0.4427831422 3.7358608362 0.0806955955
O -2.2646118593 4.9701622660 0.0512816489
C 0.3014110092 5.1235336936 -2.3623743145
H 0.6738537592 4.1005205074 -2.3360334546
H 0.6666986407 5.7385786185 -3.1842410476
H 0.4382105432 3.6080475056 -0.3399725103
H -2.2236275212 6.9559864943 -1.7420076630
H -0.6689183115 7.5688089753 -2.3581635381
H -1.0078047750 7.5326418294 -0.6106338395
C -1.2318212905 -5.5536263831 -1.5221926269
C -1.0096899970 -4.7471465601 -0.2836521059
C -2.1349543734 -3.8565727024 0.0916179824

O -1.9260802985 -3.1480489826 1.2133839104
O -3.1574801352 -3.7563802465 -0.5557363384
C 0.1143629114 -4.7769370464 0.4392843778
H 0.2394955340 -4.1745336281 1.3364167829
H 0.9480152451 -5.4215611486 0.1609854675
H -2.6783125927 -2.5270145277 1.3214831251
H -2.1094730456 -6.2061270344 -1.4211103610
H -0.3617874771 -6.1803254234 -1.7496295838
H -1.4322503318 -4.9040161231 -2.3853387586
C 7.8992299622 -1.2764322624 -2.0737094158
C 7.1800032096 -2.2558665121 -1.2036831716
C 5.6993298486 -2.1456271517 -1.2121737227
O 5.0672265396 -3.1309219668 -0.5654316366
O 5.1025895630 -1.2339265543 -1.7559753379
C 7.7929207572 -3.1417117451 -0.4126080327
H 7.2364587242 -3.8289548029 0.2207681934
H 8.8805564440 -3.2080838693 -0.3804343405
H 4.1040505014 -2.9239638010 -0.5885033257
H 7.5703213023 -1.3503606381 -3.1188833937
H 8.9825191294 -1.4379906671 -2.0369216186
H 7.6929710224 -0.2463429152 -1.7498303509



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO
E FORMAÇÃO AVANÇADA

Contactos:

Universidade de Évora
Instituto de Investigação e Formação Avançada - IIFA
Palácio do Vimioso | Largo Marquês de Marialva, Apart. 94
7002-554 Évora | Portugal
Tel: (+351) 266 706 581
Fax: (+351) 266 744 677
email: iifa@uevora.pt