



SURYIA MANZOOR

ثريا منظور

**MATERIAIS IMPRESSOS MOLECULARMENTE (MIMs):
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO.**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

SURYIA MANZOOR

**MATERIAIS IMPRESSOS MOLECULARMENTE (MIMs): SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO.**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADRIANA VITORINO ROSSI
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. REGINA BUFFON**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR SURYIA MANZOOR, ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ADRIANA VITORINO ROSSI**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

M319m Manzoor, Suryya (1984-).
Materiais impressos molecularmente (MIMs):
síntese, caracterização e avaliação / Suryya Manzoor. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.
Coorientadora: Regina Buffon.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Polímero de impressão molecular (MIP). 2. Silica
modificada organicamente (ORMOSIL). 3. Cafeína.
4. Fluconazol. 5. Antocianinas. I. Rossi, Adriana Vitorino.
II. Buffon, Regina. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecularly imprinted materials (MIMs): synthesis, characterization and evaluation

Palavras-chave em inglês:

Molecularly imprinted polymer (MIP)
Organically modified silica (ORMOSIL)
Caffeine
Fluconazole
Anthocyanins

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Adriana Vitorino Rossi [Orientadora]
Éder Tadeu Gomes Cavalheiro
Ery Maria Vieira
Matthieu Tubino
Pedro Paulo Corbi

Data de defesa: 22/02/2013

Programa de pós-graduação: Química

There were thousands and thousands of forms of joy in the world, but that all were essentially one and the same, namely, the joy of being able to love.”

— Michael Ende, The Neverending Story

*I dedicate this thesis to my family:
Manzoor Hussain, Balquees Begum,
Adriana Vitorino Rossi, Sadia,
Shamaila, Fareeha and Ahmed Mustafa*

Acknowledgements

Without the aid of a few individuals who contributed in the development of this thesis in one way or another, the completion of this thesis would not have been possible.

It is my deepest pleasure to thank the Third World Academy of Sciences- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (TWAS-CNPq) for providing me with the fellowship to accomplish my PhD.

First and foremost, I would like to express my sincerest gratitude and deepest appreciation to my supervisor, Prof. Adriana, and my co-supervisor, Prof. Regina, for their continuous support to my PhD study and research, their patience, motivation and extensive knowledge.

When I came to Brazil, Dr. Adriana became not only my mentor, but my friend and family as well. My relation with her gradually grew stronger and it will remain fresh forever.

Before I proceed forward, I would say my heartfelt thanks to Professors Nivaldo Baccan, Pedro Paulo Corbi, Solange Cadore, Susanne Rath, and Heloise de Oliveira Pastore, who showed their trust in me and supported me at every stage right from my first day in Unicamp until now.

I am indebted to Prof. Dr. Matthieu Tubino especially for his guidance. He had been a teeming source of encouragement for me.

My special thanks to Prof. Dr. Maria Isabel Maretti Bueno, who had not only been a source of inspiration throughout my doctoral research period but to whom I am indebted for her moral support as well, when I was in its dire need and to Professor Alviçlér Magalhães for his willingness to review some of the spectra included in this work.

While working in my laboratory, Acacia kept me well-stocked with the chemicals and was always there to support me in tough times especially when I arrived in Brazil and had to deal with a lot of official documentation. Deuma was always so helpful too. My sincerest wishes go to these two very friendly and helpful people.

I would like to express my deep gratitude to the technicians Ricardo, Rita, Priscila, Daniel, Raquel, Fabiana, Gustavo, Anderson and Marcia for rendering a strong technical support to the completion of this work and to Isabel, Gabriella and Miguel, from the Coordination of Graduate Programme (CPG-IQ), for their continuous assistance and guidance.

In my life, I thank God for blessing me with such a lively and amicable group of friends who did not only prove themselves in our friendship, but also in their unflinching help.

During the compilation of my thesis, there were some very important friends who showed me much patience: Isaias, Renan and Danielle. They made it possible for a great part of the literature for my thesis to come to me quickly. I find myself blessed to encounter these enlightened souls who extend their hands of kindness in all the tough moments.

I deem myself very lucky for having friends like Rebecca, Jonas, Maria Helena, and Danilo, who stood by my side through every situation. Maria and Danilo's support never dwindled; rather it swelled everytime. Also, the combined studies with Rebecca and her emotional support created an atmosphere that pulled me into work when I was in a non-serious mood. And I can never forget how encouraging Jonas was when I was nearly losing hope. Rebecca and Jonas were always there giving me strength and courage.

During my time in doctoral research program, there came such times when I needed help and wanted someone to discuss my ideas with. That was the time when Monica came forward with her unselfish motives and unflinching support.

Here, I also express my heartfelt regards to Almas, Fouzia, Anamika, Iram and Sumaira. These friends always made sure that we enjoyed our holidays and our outings, which imparted in me the energy to face the difficult tasks ahead.

My heartfelt appreciations to Martha, Flávio, William, Patrícia Castro, Aline, Patrícia Tonon, Jackiney, Ivan, Eva, Lilia, Carol, Monique, Vanderlei, Roberto, Tathiana, Priscilla, Felipe, Sabir, Vitória, Taynara, Raissa, for giving me strength and for being so helpful.

These friends have tried their best to make my stay in Brazil an easy one. I owe my thanks to them. I am indebted to these people for extending their aid to me.

CURRICULUM VITAE

SURYIA MANZOOR

Mestre em Química Analítica

University of Peshawar, Pakistan.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Professora em “Army Public College, Peshawar, Pakistan”. Setembro 2007- Fevereiro 2009.

TRABALHO DESENVOLVIDO NO MESTRADO

“Quantitative analysis of Clarithromycin and Lidocaine using ion-pair spectrophotometric methods.” Período: 2006 a 2007

Orientadora: Prof. Dr. Jasmin Shah

TRABALHO PUBLICADO

Shah, J.; Jan, M. R.; Manzoor, S.; Extractive spectrophotometric methods for determination of clarithromycin in pharmaceutical formulations using Bromothymol Blue and cresol Red. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55, 1107, 2008.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Synthesis of inorganic-organic hybrid materials using molecularly imprinting polymerization technique and their application as sorbents in solid phase extraction cartridges. International Conference and Expo on Materials Science and Engineering, Chicago United States of America, 2012.

Polímero de impressão molecular para fluconazol. 16° Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, Brasil, 2011.

Caracterização e aplicação de polímero híbrido de impressão molecular seletivo para extração de cafeína. 34^a Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, Brasil, 2011.

Molecularly Imprinted Polymer for the extraction of caffeine. 12th International Symposium on Natural Product Chemistry, Karachi, Pakistan, 2010.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

Síntese de novas fases estacionárias para purificação de antocianinas por polímerização de impressão molecular. Faculdade de Educação-UNICAMP, 2012.

Síntese de polímero de impressão molecular para purificação de antocianina. Faculdade de Educação-UNICAMP, 2011.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

Monitora no Simpósio de Profissionais do Ensino de Química – 10° SIMPEQ, IQ-UNICAMP, 2011.

Monitora no Simpósio de Profissionais do Ensino de Química – 11° SIMPEQ, IQ-UNICAMP, 2012.

Participação no Workshop Isothermal Titration Calorimetry, IQ-UNICAMP, 2011.

Participação no IV Fórum de Pós-Graduação em Química, IQ-UNICAMP, 2010.

Maiores detalhes no Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6341749353446610>.

RESUMO

Materiais impressos molecularmente (MIMs): síntese, caracterização e avaliação.

Autora: Suryyia Manzoor

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Co-Orientadora: Profa. Dra. Regina Buffon

Este trabalho envolveu um estudo elaborado da técnica de impressão molecular para síntese, caracterização e avaliação de materiais impressos molecularmente (MIMs) para fluconazol (FLU), cafeína (CAF) e antocianinas (ACYs). O polímero de impressão molecular para FLU (FLUMIP) foi sintetizado utilizando-se ácido metacrílico (monômero funcional), etilenoglicoldimetacrilato (EGDMA) (agente reticulador) e acetonitrila em polimerização térmica. O FLUMIP foi caracterizado e aplicado como sorvente em cartuchos de extração em fase sólida (SPE). Sua capacidade de interação seletiva com o analito foi avaliada, obtendo-se alta afinidade para FLU, em comparação com análogos estruturais, com limite de detecção menor que $1,63 \times 10^{-10}$ mmol/L com cromatografia de ultra alta eficiência acoplada com espectrometria de massas. Este MIP foi usado em cartuchos de SPE para extrair o analito de medicamento em cápsula, com recuperação de 91 ± 10 % ($n=9$). Outro MIM obtido foi uma sílica organicamente modificada (ORMOSIL) para extração de CAF, a partir da reação de metacrilato de 3-(trimetoxisilil) propila e acetato de vinila, seguindo-se condensação e hidrólise com tetraetilortosilicato usando CAF como molécula modelo. Este ORMOSIL foi caracterizado e testado quanto à sua eficácia de extrair CAF de amostras de café, com recuperação de 88 ± 5 % ($n=9$); ele atuou como grupo seletivo com alta porcentagem de recuperação para teofilina (77 %) e teobromina (82 %). Limites de detecção e quantificação $5,14 \times 10^{-4}$ e $1,71 \times 10^{-3}$ mmol/L respectivamente foram obtidos com cromatografia líquida de alta eficiência. Também foi sintetizado um MIP usando rutina molécula modelo (RUTMIP), acrilamida (monômero funcional), EGDMA (agente reticulador) e tetraidrofurano por polimerização em bulk. Embora tenha sido alcançada impressão bem sucedida de rutina, confirmada pela comparação de afinidade de RUTMIP em aplicação de SPE (12 vezes maior que afinidade do polímero não impresso), não se alcançou a seletividade esperada para ACYs utilizando o RUTMIP.

Palavras chave: MIM, MIP, ORMOSIL, cafeína, fluconazol, antocianinas

ABSTRACT

Molecularly imprinted materials (MIMs): synthesis, characterization and evaluation.

Author: Suryyia Manzoor

Adviser: Prof. Dr. Adriana Vitorino Rossi

Co-Adviser: Prof. Dr. Regina Buffon

This work involves an elaborative study of molecularly imprinting technique. Keeping in view its robustness and selectivity, this technique was applied for the synthesis of molecularly imprinted materials for the extraction of fluconazole (FLU), caffeine (CAF) and anthocyanins (ACYs). Molecularly imprinted polymer (MIP) for FLU (FLUMIP) was synthesized using methacrylic acid (functional monomer), ethyleneglycoldimethacrylate (crosslinker) and acetonitrile through thermal polymerization. The FLUMIP was characterized and applied as sorbent in solid phase extraction (SPE) cartridges. It was then evaluated for its ability to selectively interact with the analyte and presented an apparent affinity for FLU, which was confirmed by comparing it with structural analogues. The application of ultra high performance liquid chromatography with spectrometer mass detection, allowed a limit of detection $\leq 1.63 \times 10^{-10}$ mmol/L. Furthermore, the SPE procedure was applied to extract FLU from medicine samples with recovery of 91 ± 10 % (n=9). An organically modified silica (ORMOSIL) for CAF was also synthesized by reacting vinyl acetate and 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate, followed by the condensation and hydrolysis with tetraethyl orthosilicate, using CAF as template molecule. The ORMOSIL was characterized and tested for its efficiency to extract the analyte from coffee samples and the percentage recovery of 88 ± 5 % (n=9) was obtained. The cross reactivity studies for theophylline and theobromine showed high recovery (77 % and 82% respectively). The limit of detection and quantification, 5.14×10^{-4} and 1.71×10^{-3} mmol/L respectively, were achieved using high performance liquid chromatography. Also, a MIP for ACYs (RUTMIP) was synthesized using rutin (template molecule), EGDMA (cross linker) and tetrahydrofuran by the bulk polymerization method. A successful imprinting of rutin was attained. This can be confirmed by the high affinity of rutin for MIP (12 times greater than non imprinted polymer) during SPE procedure; however, the RUTMIP was not efficient enough to selectively extract ACYs from vegetal extracts.

Keywords: MIP, MIM, ORMOSIL, caffeine, fluconazole, anthocyanins

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxvii
PREFÁCIO	xxix
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1. Introdução	3
1.1. Polímero de impressão molecular (MIP)	3
1.1.1. Estratégias de síntese	3
1.1.1.1. Abordagem covalente	3
1.1.1.2. Abordagem não covalente	5
1.1.1.3. Abordagem semi-covalente	6
1.1.2. Síntese de MIP	8
1.1.2.1. Seleção de monômero funcional	10
1.1.2.2. Seleção do solvente	11
1.2. Géis híbridos	12
1.3. Caracterização	14
1.3.1. Análise elementar	14
1.3.2. Ressonância magnética nuclear (NMR)	14
1.3.3. Adsorção/dessorção de nitrogênio	15
1.3.4. Técnicas de microscopia	15
1.4. Aplicações de MIM	16
1.4.1. Sensores	16
1.4.2. Cromatografia	18
1.4.3. Extração em fase sólida	20
1.5. Moléculas modelo estudadas	24
1.5.1. Fluconazol	24
1.5.2. Cafeína	26
1.5.3. Antocianinas	31
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	35
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	39
3.1. Reagentes	41
3.2. Materiais e Equipamentos	42
3.3. Amostras	42
CAPÍTULO 4: FLUCONAZOL	43
4.1. Parte Experimental	45
4.1.1. Síntese	45
4.1.2. Caracterização	45
4.1.3. Procedimento de MIM/SPE	46
4.1.3.1. Condições de MIM/SPE	46
4.1.3.2. Análise da amostra	46
4.1.3.3. Análises por UHPLC–MS	46
4.1.4. Figuras de mérito	47
4.1.5. Estudos de seletividade	47
4.1.6. Comparação com C18	48

4.2. Resultados e discussão	48
4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho (IR).....	49
4.2.2. Termogravimetria	49
4.2.3. Adsorção/dessorção de nitrogênio.....	52
4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura	54
4.2.5. Aperfeiçoamento do procedimento do FLUMIP/ SPE.....	54
4.2.6. Figuras de mérito.....	56
4.2.7. Estudos de seletividade	57
4.2.8. Comparação com cartucho de SPE com C18	59
4.2.9. Conclusão.....	60
CAPÍTULO 5: CAFEÍNA	61
5.1. Parte Experimental	63
5.1.1. Síntese do polímero híbrido de impressão molecular (HMIP)	63
5.1.2. Caracterização	64
5.1.3. Análise por HPLC	64
5.1.4. Aplicações	64
5.1.5. Estudos de seletividade	65
5.1.6. Figuras de mérito.....	65
5.2. Resultados e discussão	66
5.2.1. Espectroscopia no Infravermelho de HMIP1 e HNIP1	67
5.2.2. Espectros de ²⁹ Si NMR para HMIP1 e HNIP1	68
5.2.3. Adsorção/dessorção de nitrogênio e SEM de HMIP1 e HNIP1	69
5.2.4. Comparação com coluna comercial de C18	72
5.2.5. Adsorção/dessorção de nitrogênio e SEM de HMIP2 e HNIP2	73
5.2.6. Espectroscopia no Infravermelho de HMIP2 e HNIP2	74
5.2.7. Espectros de ²⁹ Si NMR de HMIP2 e HNIP2.....	75
5.2.8. Espectroscopia de ¹³ C NMR de HMIP2 e HNIP2.....	76
5.2.9. Termogravimetria de HMIP2 e HNIP2	77
5.2.10. Aplicação analítica.....	78
5.2.11. Estudos de seletividade	80
5.2.12. Conclusão.....	82
CAPÍTULO 6: ANTOCIANINAS.....	85
6.1. Parte Experimental	87
6.1.1. Síntese de MIP/Rutina.....	87
6.1.2. Aplicação de RUTMIP para SPE.....	88
6.1.3. Análise por HPLC de Rutina e ACYs	88
6.2. Resultados e discussão	89
6.3. Conclusão	91
CAPÍTULO 7: CONCLUSÃO	93
CAPÍTULO 8: PERSPECTIVAS	97
CAPÍTULO 9: TRATAMENTO DE RESÍDUOS	101
REFERÊNCIAS	105

LISTA DE ABREVIATURAS

1-MA-3MI-Br	Brometo de 1-(α -acrilato de metila)-3-metilimidazólio
AA	Acrilamida
ACN	Acetonitrila
ACYs	Antocianinas
AIBN	2,2'-Azobis(2-metilpropionitrila)
APTMS	3-Aminopropiltrimetoxissilano
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BJH	Barret-Joyner-Halenda
CAF	Cafeína
CE	Eletroforese capilar
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTG	Derivada da curva termogravimétrica
DVB	Divinilbenzeno
EGDMA	Etilenoglicoldimetacrilato
FLU	Fluconazol
FLUMIP	Polímero de impressão molecular para fluconazol
FLUMIP/SPE	Extração em fase sólida com polímero de impressão molecular para fluconazol
FLUNIP	Polímero não impresso para fluconazol
FLUNIP/SPE	Extração em fase sólida com polímero não impresso para fluconazol
HMIP	Polímero híbrido de impressão molecular
HMIP/SPE	Extração em fase sólida com polímero híbrido de impressão molecular
HNIP	Polímero híbrido não impresso
HNIP/SPE	Extração em fase sólida com polímero híbrido não impresso
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
IR	Espectroscopia no infravermelho
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
m/z	Razão massa/carga

MAA	Ácido Metacrílico
MeOH	Metanol
MIG	Gel de impressão molecular
MIM	Material de impressão molecular
MIM/SPE	Extração em fase sólida usando material de impressão molecular
MIP	Polímero de impressão molecular
MIT	Técnica de impressão molecular
MIX	Xerogel de impresso molecular
NIP	Polímero não impresso
NIX	Xerogel não impresso
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
ORMOSIL	Sílica organicamente modificada
RUT	Rutina
RUTMIP	Polímero de impressão molecular de rutina
RUTMIP/SPE	Extração em fase sólida com polímero de impressão molecular para rutina
RUTNIP	Polímero não impresso de rutina
RUTNIP/SPE	Extração em fase sólida com polímero não impresso para rutina
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SPE	Extração em fase sólida
TEOS	Tetraetoxissilano
TGA	Análise termogravimétrica
TG	Curva termogravimétrica
THF	Tetraidrofurano
TMOS	Tetrametoxissilano
TMSPM	3-(Trimetoxisilil) propil metacrilato
TRIM	Trimetilpropano metacrilato
UHPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada com espectrometria de massas
UV-VIS	Espectroscopia de ultravioleta-visível
VTMOS	Viniltrimetoxissilano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	: Representação esquemática da abordagem covalente para síntese de MIP...	04
Figura 2	: Representação esquemática de impressão covalente do açúcar 4-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo utilizando ácido 4-vinilfenilborônico como monômero funcional. Adaptado de HOLLAND, 2008).....	04
Figura 3	: Representação esquemática da abordagem não-covalente para síntese de MIP.....	05
Figura 4	: Representação esquemática de síntese do MIP para quercetina. Adaptado de SONG <i>et al.</i> 2009b.....	06
Figura 5	: Representação esquemática da abordagem semi-covalente para síntese de MIP.....	07
Figura 6	: Representação esquemática da síntese de MIP para propazina por abordagem semi covalente. Adaptado de CACHO <i>et al.</i> (2006).....	08
Figura 7	: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (SEM) das partículas após moagem e peneiração do MIP obtido usando D, L fenilalanina como molécula modelo. Adaptado de LIN <i>et al.</i> (1997)	09
Figura 8	: Estruturas moleculares de monômeros funcionais (A) ácidos, (B) básicos e (C) neutros.....	11
Figura 9	: Espectro de ^1H NMR de solução de cafeína em acetonitrila deuterada, (b) o complexo de pré-polimerização de cafeína apresentando a blindagem do pico em 5 ppm para 7,3. Adaptado de FARRINGTON <i>et al.</i> (2006).....	15
Figura 10	: Ilustração esquemática da utilização de MIP como sensor.....	17
Figura 11	: A) Cromatogramas de HPLC da solução aquosa de tiabendazol (0,1 mg/L) percolada em coluna de MIP (preto) e de NIP (cinza). B) Cromatograma de amostra de água de rio fortificada com benzimidazol (0,1 $\mu\text{g/L}$), pelo procedimento <i>on-line</i> MIM/SPE. Condições cromatográficas: vazão: 1 L/min; fase móvel: metanol por 3 min, seguindo-se metanol/ácido acético 80:20 v/v; detecção ultravioleta. Adaptado de CACHO <i>et al.</i> (2009).....	19
Figura 12	: Cromatogramas de furosemida em plasma, (A) após a purificação com cartucho de MIP-SPE, (B) o cromatograma do branco, (C) após extração da amostra pelo cartucho de SPE C18. Adaptado de GHOLIVAND <i>et al.</i> (2010)...	21
Figura 13	: Cromatogramas de amostras de extrato de trigo contendo fenurona: a) obtido diretamente após a injeção da amostra no sistema cromatográfico; b) purificação da amostra fortificada (100ng/g de fenurona) com MIP/SPE com fortificação (e c) purificação com MIP/SPE sem fortificação com HPLC-UV. Adaptado de BAGGIANI <i>et al.</i> (2007).....	23

Figura 14	: Fórmula estrutural do fluconazol.....	24
Figura 15	: Cromatograma de soro humano apresentando o pico referente a fluconazol em 6,6 minutos. Adaptado de INAGAKI <i>et al.</i> (1992). O eixo y expressa unidades arbitrárias de absorbância em 260 nm.....	25
Figura 16	: Fórmula estrutural molecular de cafeína.....	26
Figura 17	: Cromatogramas de amostra de refrigerante energético (a) antes de <i>clean up</i> com cartucho MIM/SPE e (b) após <i>clean up</i> com cartucho MIM/SPE.....	28
Figura 18	: Comparação de quantidade de adsorção de cafeína pelo MIP e por C18.....	31
Figura 19	: Estrutura do cátion flavílico, onde R3 é uma unidade glicosídica (COELHO, 2011).....	32
Figura 20	: Esquema de síntese de FLUMIP, com proposta de sua estrutura molecular.....	48
Figura 21	: Espectros no infravermelho de a) FLUMIP e b) FLUNIP.....	50
Figura 22	: Curvas TG/DTG de a) FLUMIP e b) FLUNIP. A linha clara é corresponde a DTG, a derivada da curva original.....	51
Figura 23	: Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio de (a) FLUMIP e (b) FLUNIP. O volume adsorvido está representado nas condições normais de temperatura e pressão.....	53
Figura 24	: SEM de a) FLUMIP e b) e FLUNIP.....	54
Figura 25	: Efeito do pH de lavagem na recuperação de FLU em MIM/SPE (n=5), utilizando-se metanol para eluição.....	55
Figura 26	: Cromatogramas UHPLC-MS da amostra comercial de fluconazol a) antes e b) após a extração usando FLUMIP/SPE. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (metanol), temperatura do forno da coluna: 40 °C, vazão de fase móvel: 0,35 mL/min, gradiente inicial: 97% de A e 3% de B, 4 a 5 minutos: 5% de A e 95% de B, Gradiente final: 97% de A e 3% de B.....	56
Figura 27	: Curva analítica para FLU com dados de UHPLC-MS, com medidas em triplicatas. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (metanol), temperatura do forno da coluna: 40 °C, vazão de fase móvel: 0,35 mL/min, gradiente inicial: 97% de A e 3% de B, 4 a 5 minutos: 5% de A e 95% de B, radiante final: 97% de A e 3% de B.....	57
Figura 28	: Estruturas moleculares de: a) fluconazol, b) secnidazol, c) tioconazol, d) miconazol.....	58

Figura 29	: Resultados do estudo de competitividade de FLUMIP comparando dados obtidos pela espectroscopia UV para amostras de fluconazol, secnidazol, miconazol e tioconazol, com seis replicatas.....	58
Figura 30	: Percentagem de recuperação de FLU, secnidazol, miconazol e tioconazol no cartucho de SPE de C18 e FLUMIP/SPE com seis replicatas, com dados de espectrofotometria com $\lambda = 260$ nm, 310 nm, 235 nm e 204 nm respectivamente.....	59
Figura 31	: Esquema de síntese de HMIP1, com proposta de estrutura molecular	66
Figura 32	: Espectros no infravermelho de a) HMIP1 e b) HNIP1.....	67
Figura 33	: Espectros de ^{29}Si NMR de a) HMIP1 e b) HNIP1.....	69
Figura 34	: SEM de a) HMIP1 e b) HNIP1.....	70
Figura 35	: Cromatograma de HPLC de amostra de extrato de café, usando coluna C18 sem procedimento <i>off-line</i> HMIP1/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v, detecção em 274 nm.....	70
Figura 36	: Cromatograma de HPLC de extrato de café eluido em acetonitrila, após procedimento <i>off-line</i> com HMIP1/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v, detecção em 274 nm.....	71
Figura 37	: Cromatograma de HPLC de extrato de café eluido em acetonitrila, após procedimento <i>off-line</i> com HNIP1/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v, detecção em 274 nm.....	71
Figura 38	: Cromatogramas de HPLC de extrato de café eluido em acetonitrila, após procedimento SPE <i>off-line</i> com a) cartucho de C18 e b) de HMIP1. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v; detecção: 274 nm.....	72
Figura 39	: Esquema de síntese de HMIP2 com proposta de estrutura molecular.....	73
Figura 40	: SEM de a) HMIP2 e b) HNIP2.....	74
Figura 41	: Espectros no infravermelho de a) HMIP2 e b) HNIP2.....	75
Figura 42	: Espectros de ^{29}Si NMR de de a) HMIP2 e b) HNIP2.....	76
Figura 43	: Espectros de ^{13}C NMR de a) HMIP2 e b) HNIP2.....	77
Figura 44	: Curvas TG/DTG de a) HMIP2 e b) HNIP2. Em azul: a derivada da curva original.....	78

- Figura 45** : Cromatograma de HPLC de amostra do extrato de café na coluna C18 de HPLC sem procedimento *off-line* HMIP2/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH = 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm..... 79
- Figura 46** : Cromatograma de extrato de café eluído em metanol, após procedimento *off-line* com HMIP2. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm..... 79
- Figura 47** : Cromatograma de extrato de café eluído em metanol, após procedimento *off-line* com HNIP2. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm..... 80
- Figura 48** : Estruturas moleculares de: a) cafeína, b) teofilina, c) teobromina..... 81
- Figura 49** : Cromatograma de HPLC do eluato da mistura da teobromina, teofilina e cafeína, após a extração em cartucho HMIP2 para SPE. Os picos em 5,95, 9,55 e 16,93 min representam esses compostos respectivamente. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm..... 81
- Figura 50** : Curva analítica construída na faixa de 0,12 a 0,61 mmol/L (n=3 para cada concentração). Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm..... 82
- Figura 51** : Estrutura molecular de rutina..... 87
- Figura 52** : Cromatogramas de solução de rutina 0,08 mmol/L após procedimento *off-line* de SPE com a) RUTMIP e b) RUTNIP. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol: água (45: 55 v/v), detecção em 356 nm..... 88
- Figura 53** : Cromatograma de extrato de ACYs de uva Brasil, injetado diretamente na coluna C18 de HPLC. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água: acetonitrila: ácido fórmico (81: 9: 10 v/v/v), detecção em 525 nm..... 90
- Figura 54** : Cromatograma de extrato de ACYs de uva Brasil eluído em metanol após SPE com RUTMIP. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água: acetonitrila: ácido fórmico (81:9:10 v/v/v), detecção em 525 nm..... 90
- Figura 55** : Cromatograma de extrato de ACYs de uva Brasil eluído em metanol após SP com RUTNIP. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água: acetonitrila: ácido fórmico (81: 9: 10 v/v/v), detecção em 525 nm..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	: Descrição do gradiente de eluição da cromatografia de UHPLC-MS.....	47
Tabela 2	: Resultados da caracterização obtidos por isothermas de adsorção / dessorção de nitrogênio.....	53
Tabela 3	: Resultados de recuperação das amostras pelo procedimento MIP/SPE.....	55
Tabela 4	: Área superficial, volume e tamanho de poros do HMIP1 e HNIP1.....	69
Tabela 5	: Área superficial, volume e tamanho de poros do HMIP2 e HNIP2.....	74
Tabela 6	: Porcentagem de recuperação das amostras de café pelo procedimento HMIP2.....	80

Prefácio

A extração do analito de interesse a partir de matrizes complexas, como amostras ambientais, biológicas, alimentícias, ou mesmo as formulações farmacêuticas, é um grande desafio em Química Analítica. Entre as diferentes técnicas aplicadas para esta finalidade, a extração em fase sólida (SPE) é a mais utilizada rotineiramente para fins de extração, purificação e concentração do analito antes da quantificação. Esta técnica envolve o empacotamento do sorvente em um cartucho vazio e, baseado na diferença de afinidade entre a fase estacionária e o analito e seus interferentes, permite a separação do composto de interesse. No entanto, a seletividade pode ser limitada se o analito coeluir com os compostos interferentes. Portanto, para melhorar a seletividade diversas técnicas para a síntese de sorventes são aplicadas, sendo a tecnologia de impressão molecular (MIT) bastante expressiva pois vem trazendo resultados muito favoráveis na extração de diversos analitos a partir de diferentes matrizes.

Neste trabalho, estratégias de impressão molecular foram aplicadas para sintetizar sorventes, que foram utilizados em cartuchos de SPE para a extração de Fluconazol (FLU), Cafeína (CAF) e Antocianina (ACYs).

Um polímero de impressão molecular (MIP) para FLU foi preparado utilizando-se um método de polimerização convencional que mostrou-se adequado para a finalidade pretendida.

Outro foco do trabalho foi desenvolver uma nova metodologia para sintetizar uma sílica organicamentemodificada(ORMOSIL), que pode ser aplicada para moléculas modelo suscetíveis de degradação durante o processo de polimerização. Para este fim, cafeína foi selecionada como molécula modelo, uma vez que é uma molécula bem caracterizada e seu uso em MIMs está bem descrito na literatura. Os resultados foram satisfatórios e o método desenvolvido pode ser aplicado para outras moléculas modelos, como antocianinas (ACYs).

No caso de ACYs, o conceito de utilização de uma molécula análoga como modelo para síntese de um polímero de impresso molecular (MIP) foi aplicado e, para esse propósito, rotina, um flavonóide com uma estrutura molecular semelhante, foi selecionada. No entanto, os resultados obtidos não corresponderam às expectativas e ainda é necessário aprofundar estudos.

Esta tese está dividida em nove capítulos:

O primeiro capítulo traz uma revisão com informações da literatura sobre MIT, diferentes técnicas de caracterização e aplicações em diferentes áreas. Também fornece informações úteis sobre as moléculas modelo estudadas neste trabalho: Fluconazol, cafeína e antocianinas.

O segundo capítulo apresenta os objetivos gerais e específicos que conduziram à realização desta tese.

No terceiro capítulo, as considerações gerais, reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho são descritos.

O quarto capítulo descreve a preparação de MIP para fluconazol incluindo a parte experimental (síntese, técnicas aplicadas para a caracterização e aplicação em cartuchos de MIP-SPE), resultados, discussão e a conclusão.

O quinto capítulo trata o trabalho desenvolvido até obtenção e testes de um ORMOSIL para cafeína.

O sexto capítulo traz o estudo para obtenção de MIP para ACYs.

No capítulo sete são apresentadas as conclusões gerais e no capítulo oito são comentadas perspectivas decorrentes deste trabalho.

O capítulo nove descreve os procedimentos para o tratamento dos resíduos gerados.

Para concluir a tese, apresentam-se as referências bibliográficas utilizadas no trabalho.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1. Introdução

Impressão molecular é um processo de produção de materiais com cavidades na forma de uma molécula pré-determinada, tida como modelo, a partir de um material reticulado, utilizando-se diversas estratégias de síntese. Esses materiais sintéticos com sítios de reconhecimento produzidos artificialmente são conhecidos como materiais de impressão molecular - MIM (PILETSKY *et al.*, 2006). Os moldes são seletivos para a molécula modelo a partir de sítios de adsorção específicos (MOSBACH, 2006). Esses materiais podem ser poliméricos, no caso polímero de impressão molecular (MIP, *molecularly imprinted polymer*), ou podem ser formados por géis de sílica como um gel de impressão molecular (MIG, *molecularly imprinted gel*) ou ainda como materiais híbridos, como sílicas organicamente modificada(ORMOSILs).

1.1. Polímero de impressão molecular (MIP)

Na produção de polímeros de impressão molecular, os monômeros são escolhidos em função da sua capacidade de interagir com os grupos funcionais da molécula modelo. Assim, três abordagens diferentes são utilizadas em suas sínteses: covalente, semi-covalente e não-covalente.

1.1.1. Estratégias de síntese

1.1.1.1. Abordagem covalente

Esta abordagem foi proposta originalmente por Wulff e Sarhan (1972) e baseia-se na formação de ligação covalente entre a molécula modelo e o monômero funcional (SELLERGEN e ALLENDER, 2005). Em seguida, a polimerização ocorre, resultando na formação de um polímero que contém a molécula modelo. A remoção da molécula modelo ocorre através da quebra de ligações covalentes, que são formadas novamente quando o analito interage com o polímero. Esta abordagem, com esquema ilustrado na Figura 1, promove a diminuição do número de sítios não específicos devido à presença de fortes interações entre a molécula modelo e o monômero funcional. No entanto, para um complexo ideal de molécula modelo e monômero, há uma gama limitada de monômeros existentes (TAMAYO *et al.*, 2007).

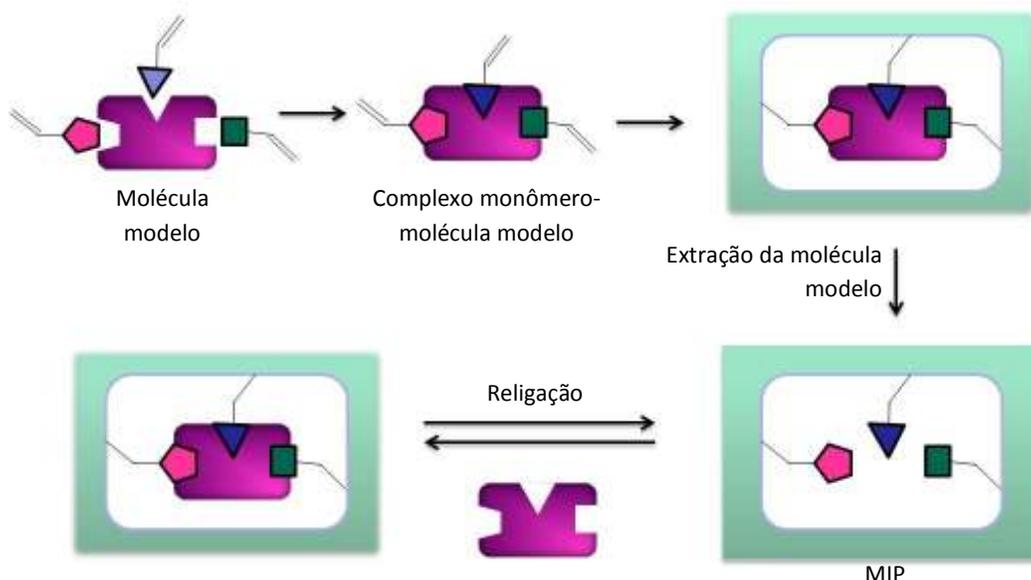


Figura 1: Representação esquemática da abordagem covalente para síntese de MIP.

Um exemplo de MIP sintetizado utilizando a abordagem covalente é dado pela esterificação de dois grupos hidroxila do açúcar fenil- α -D-manopiranosose com duas moléculas de ácido 4-vinilfenilborônico (monômero). Esse monômero reage fácil e reversivelmente com um diol, como ilustrado na Figura 2 (HOLLAND, 2008).

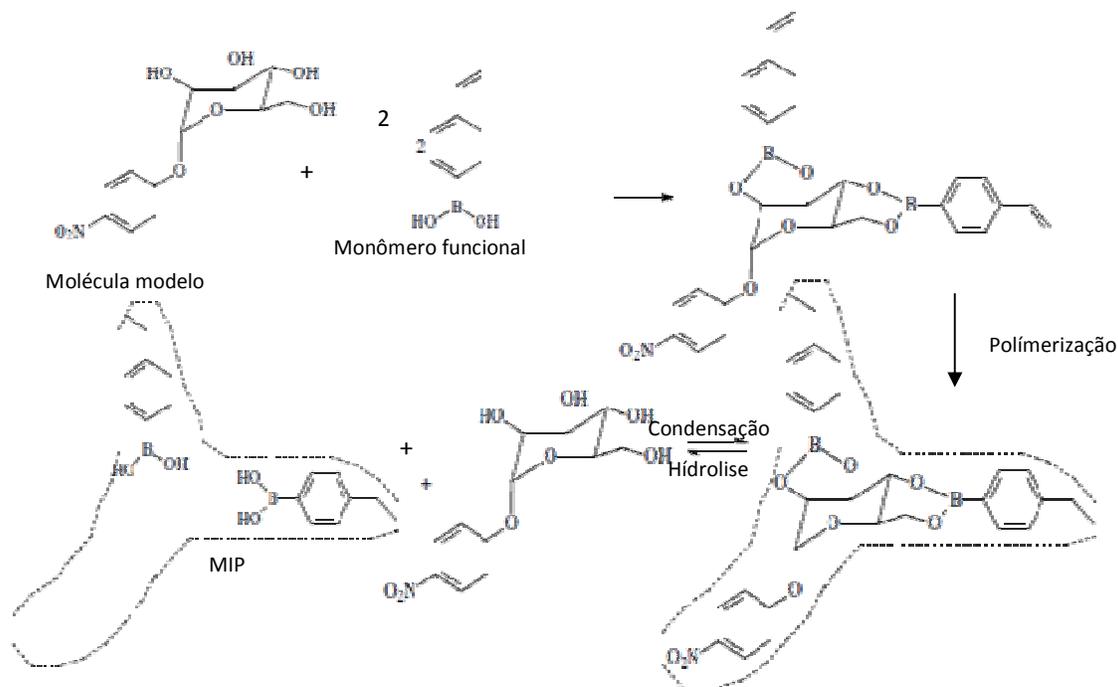


Figura 2: Representação esquemática de impressão covalente do açúcar 4-nitrofenil- α -D-manopiranosose, utilizando ácido 4-vinilfenilborônico como monômero funcional. Adaptado de HOLLAND, 2008).

1.1.1.2. Abordagem não covalente

Esta abordagem é a mais utilizada para a síntese dos polímeros devido à sua simplicidade de execução, sendo o esquema de síntese ilustrado na Figura 3 e é baseada na reversibilidade de ligações. Lembrando que as interações mais importantes incluem as forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações iônicas e forças hidrofóbicas (forças de London), destaca-se que no processo de impressão, as interações entre íons de carga oposta, ou entre os íons e dipolos são muito importantes (EKBERG e MOSBASH, 1989). Esta é mais versátil que as demais pois vários tipos de moléculas modelo podem ser usados na síntese de polímeros, sem qualquer reação química anterior, sendo experimentalmente simples. A remoção da molécula modelo requer lavagem repetitiva com o solvente adequado.

Por outro lado, a abordagem não covalente também apresenta algumas desvantagens. Sistemas não covalentes provocam a heterogeneidade inevitável dos sítios de ligação. Como a ligação não-covalente geralmente não é forte, um excesso de monômero funcional em relação à molécula modelo é necessário para favorecer a formação do complexo monômero-molécula modelo. Isso resulta numa incorporação aleatória do monômero funcional na matriz polimérica, que pode causar a formação de sítios de ligação não específicos.

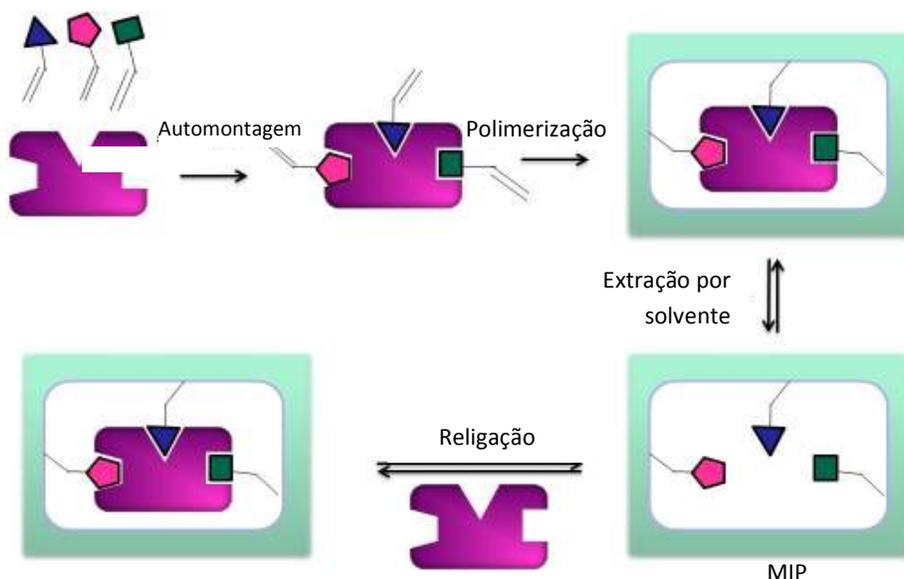


Figura 3: Representação esquemática da abordagem não-covalente para síntese de MIP.

Song *et al.* (2009b) utilizaram abordagem não covalente para a síntese de MIP para a extração de quercetina nos extratos de uma erva chinesa (*Cacumen platycladis*). O processo envolveu o estabelecimento de interações não covalentes entre o monômero e a molécula modelo, conforme esquematizado na Figura 4.

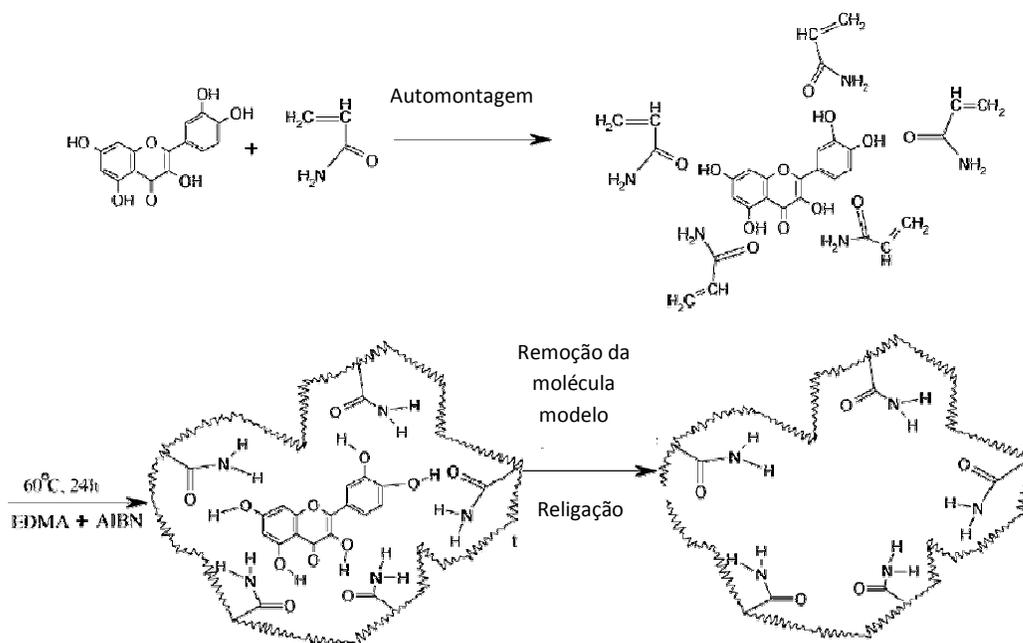


Figura 4: Representação esquemática de síntese do MIP para quercetina. Adaptado de SONG *et al.* 2009b.

1.1.1.3. Abordagem semi-covalente

A abordagem semi-covalente requer a formação de ligação covalente entre a molécula modelo e o monômero funcional durante a polimerização. Após a remoção da molécula modelo, a religação do analito ocorre através de interações não covalentes.

Esta abordagem, com esquematização ilustrada na Figura 5, tem importantes vantagens em comparação com a abordagem não-covalente, principalmente por dispensar o uso de excesso do monômero funcional durante o processo de síntese, o que resulta no aumento da seletividade devido à diminuição dos sítios não-

específicos. Além disso, existe uma maior uniformidade de sítios de ligação e melhor remoção da molécula modelo ao final da síntese, evitando eluição residual após etapas de religação com eluição de amostras (BELTRAN *et al.*, 2010).

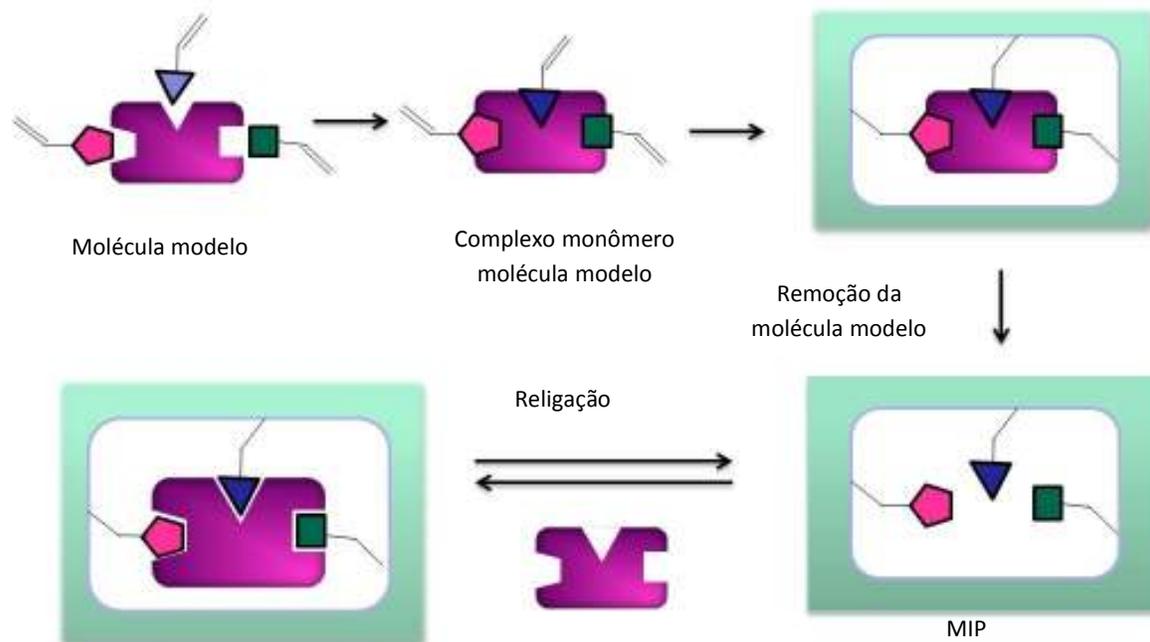


Figura 5: Representação esquemática da abordagem semi-covalente para síntese de MIP.

Cacho e colaboradores (2006) aplicaram a abordagem semi-covalente para a síntese de MIP utilizando propazina como molécula modelo. A molécula modelo foi inicialmente submetida a reação com cloreto de metacrilóila para formar metacrilato de propazina, que foi, então incorporada na matriz polimérica. Em seguida, a hidrólise foi realizada a fim de remover a molécula modelo. O polímero obtido foi capaz de interagir com o analito através de interações não covalentes, conforme esquematizado na Figura 6.

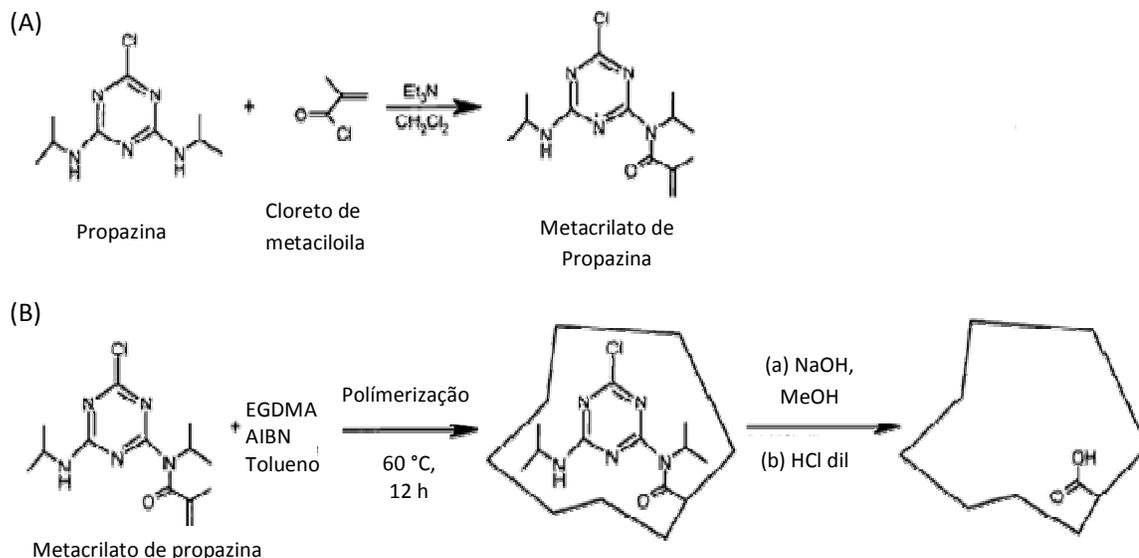


Figura 6: Representação esquemática da síntese de MIP para propazina por abordagem semi covalente. Adaptado de CACHO *et al.*, 2006.

1.1.2. Síntese de MIP

Vários métodos para a síntese de MIP utilizando essas abordagens são descritos na literatura. A técnica mais utilizada é impressão em massa (*bulk*), também chamada de abordagem monolítica. Esta técnica não envolve o uso de solventes, o que contribui para a estabilidade do complexo modelo-monômero, por haver somente interações modelo-monômero (YIN *et al.*, 2005; MOHAJERI *et al.*, 2011). O polímero resultante apresenta-se na forma de grandes aglomerados, necessitando, portanto, pós-tratamentos que incluem moagem e tamisação, resultando na produção de partículas bastante irregulares, com perda de muitos sítios de ligação (WANG *et al.*, 2007, VALLANO e REMCHO, 2000). A obtenção de partículas irregulares pode ser confirmada através das imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), que estão na Figura 7 (LIN *et al.*, 1997).

A fim de melhorar os métodos para síntese de MIPs, novas técnicas estão sendo introduzidas, incluindo polimerização em suspensão, polimerização em emulsão e polimerização por precipitação. Essas técnicas permitem a produção de polímeros de impressão molecular com controle de tamanho e forma de partículas, o que é adequado para HPLC, inclusive devido às propriedades de transferência de massa.

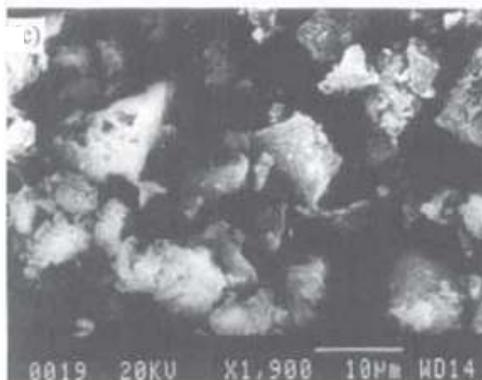


Figura 7: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (SEM) das partículas após moagem e tamisação do MIP obtido usando D,L fenilalanina como molécula modelo. (Adaptado de LIN *et al.*, 1997).

A polimerização em suspensão é comumente utilizada na preparação de MIPs, principalmente para íons metálicos, fármacos e proteínas. Esse processo de polimerização emprega agitação mecânica para a mistura do(s) monômero(s) em uma fase líquida, como a água ou perfluorocarbono, dispersando-o(s) na forma de pequenas gotas pela agitação contínua da suspensão (MAYES e MOSBACH, 1996). Apesar de resultar na formação de partículas (ou grânulos) esféricas, este processo tem algumas desvantagens; por exemplo, envolve a utilização de surfactantes e estabilizantes que podem interferir na formação dos locais de ligação específicos, sendo também, mais dispendioso. Portanto, alternativas vem sendo estudadas para obter o MIP sem o uso de estabilizadores.

A técnica de polimerização em suspensão foi usada por Walsh e colaboradores (2011) para síntese de MIP de reconhecimento quiral de anti-histamínicos. O MIP foi sintetizado utilizando ácido metacrílico como monômero funcional, trimetilolpropano metacrilato (TRIM) como agente reticulador, 2,2'-Azobis(2-metilpropionitrila) (AIBN) como iniciador e clorofórmio como solvente porogênico. A mistura, na presença de molécula modelo, foi purgada com nitrogênio e, em seguida, agitou-se com água para formar uma suspensão de gotículas uniformes. Na sequência, a foto-polimerização foi induzida por radicais livres. Como resultado, o MIP foi obtido na forma de partículas esféricas com pouca variação de tamanho. O material obtido foi adequado para uso como fase estacionária em coluna de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Além disso, a água foi utilizada como fase contínua e o uso de estabilizadores foi eliminado neste método.

A polimerização por precipitação é um processo no qual o iniciador, o monômero, a molécula modelo e quaisquer outras espécies inicialmente presentes (por exemplo, solvente, agente de transferência de fase) são colocados em um reator e, conforme a polimerização prossegue, ocorre a precipitação de partículas de polímero (BOONPANGRAK *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2003). Esta técnica também produz partículas com tamanho uniforme, adequadas para serem utilizadas em colunas de HPLC e em cartuchos de extração em fase sólida (SPE). Devido à facilidade de síntese, métodos aplicando precipitação por polimerização vem sendo amplamente adotados (BELTRAN *et al.*, 2009).

1.1.2.1. Seleção de monômero funcional

A seleção do monômero é crucial para o sucesso na impressão da molécula modelo no polímero e, portanto, afeta o seu desempenho. A formação do complexo monômero-molécula modelo é o primeiro passo em todos os métodos anteriormente mencionados. Em geral, assume-se que a maior estabilidade desse complexo resulta em uma maior seletividade do MIP, porque assim as cavidades do polímero formado são pouco ou nada afetadas por outras espécies além da molécula modelo. Isso confere maior uniformidade aos sítios de ligação que são diretamente relacionados com a seletividade do MIP.

A estabilidade do monômero na mistura reacional durante a polimerização também é um critério importante para selecioná-lo. Como a polimerização é iniciada por irradiação ultravioleta ou calor, o monômero e a molécula modelo devem ser suficientemente estáveis nessas condições (KARIM *et al.*, 2005).

Os monômeros normalmente utilizados são classificados em três grandes categorias: ácidos, básicos e neutros, sendo alguns apresentados na Figura 8.

Entre estes monômeros, o ácido metacrílico é um dos mais utilizados e tem a capacidade de formar ligações hidrogênio com moléculas modelo que contêm grupos funcionais básicos, devido à presença do grupo carboxílico (VALLANO e REMCHO, 2000). Da mesma forma, a presença de grupos funcionais ácidos na molécula modelo requer a seleção de monômero com caráter básico, como vinilpiridina, vinilimidazol, etc (YAN e RAMSTROM, 2005).

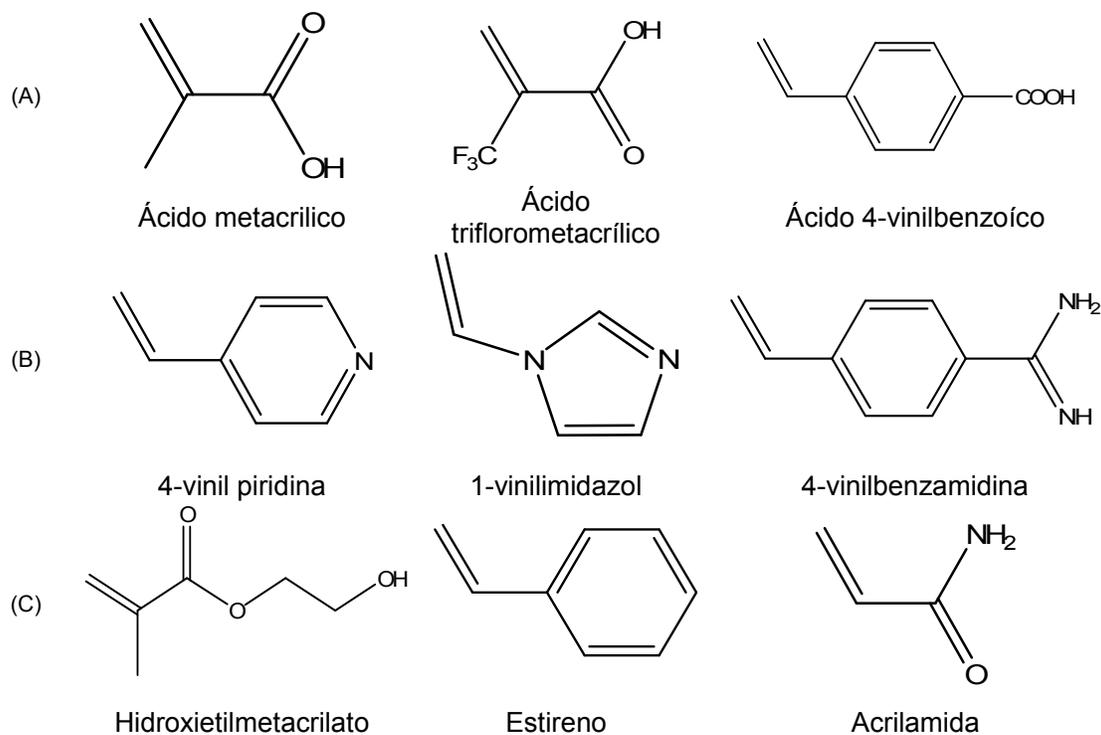


Figura 8: Estruturas moleculares de monômeros funcionais (A) ácidos, (B) básicos e (C) neutros

1.1.2.2. Seleção do solvente

O solvente porogênico é outro fator importante que afeta o desempenho do MIP, devido às suas interações com a molécula modelo e com o monômero. Estas interações têm um impacto forte sobre a impressão da molécula modelo na matriz polimérica. Na maioria dos casos, os MIPs são sintetizados a partir de um solvente orgânico, em que as interações polares, tais como ligações de hidrogênio, são mais fortes do que as interações hidrofóbicas. No caso do meio aquoso, as interações hidrofóbicas são mais fortes do que as interações polares (ANDERSSON, 2000). Alguns dos solventes porogênicos comumente usados são: 1,4-dioxano, acetonitrila, THF, acetona, etc.

Song e colaboradores (2009), estudaram o efeito de quatro destes solventes em relação à seletividade do MIP para quercetina: 1,4-dioxano, THF, acetona e acetonitrila, que possuem constantes dielétricas 2,25, 7,58, 20,7 e 37,5, respectivamente. Todos os MIPs sintetizados foram avaliados quanto à sua eficiência através da determinação do fator de impressão, definido pela relação

entre a quantidade de quercetina adsorvida no MIP (Q_{MIP}) e a quantidade de quercetina adsorvida no polímero não impresso – NIP (Q_{NIP}). Os resultados apontaram que THF gerou o maior fator de impressão.

O estudo da relação entre a constante dielétrica do solvente e do seu efeito sobre a seletividade do polímero também fornece informações úteis para a seleção do solvente apropriado para ser utilizado como porogênico. No trabalho de Song *et al.* (2009), o uso do solvente polar THF resultou no maior fator de impressão para MIP. A quantidade de solvente porogênico usada é um fator importante que afeta a morfologia do polímero e, conseqüentemente, o seu desempenho. Por isso, Song *et al.* (2009) também otimizaram o volume de solvente, tendo sido notado que acima da quantidade ótima, passa a ocorrer um decréscimo na capacidade de adsorção de MIP, enquanto que abaixo desse valor otimizado ocorria precipitação precoce do polímero.

1.2. Géis híbridos

Quando uma suspensão coloidal (sol) é transformada em gel e posteriormente seca sob condições ambiente, obtém-se um xerogel. Trata-se do processo sol-gel que envolve a evolução de redes inorgânicas através da formação de um sol e sua posterior gelificação para formar uma rede em uma fase líquida contínua (gel). Os precursores para a síntese destes colóides são geralmente alcoxissilanos, como tetraetoxissilano (TEOS) e tetrametoxissilano (TMOS) que, em água, sofrem reações de hidrólise e condensação. Isso resulta na formação de ligações Si-O-Si-O-que têm habilidade de envolver a molécula modelo. Em seguida, a extração da molécula modelo resulta na formação das cavidades, sendo o gel resultante chamado de xerogel de impressão molecular – MIX (DONATO,2008). Pode-se representar o processo de hidrólise de alcoxissilanos pela Equação1:



Em 1946, Dickey, pela primeira vez, utilizou sílica para criar materiais 4 a 20 vezes mais efetivos para fazer ligações com a molécula modelo em comparação com o composto não impresso (NIX, *nonimprinted xerogel*), também considerado como controle para os estudos comparativos (HOLTFF e BRIGHT, 2007).

Atualmente, há vários estudos nesta área, incluindo a preparação de polímeros híbridos, também chamados de sílicas organicamente modificadas (do inglês, *organically modified silicates* - *ORMOSILs*). Nesta versão, o polímero é inicialmente sintetizado empregando-se polimerização por radical livre. Em seguida, o polímero contendo grupo alcoxissilanos e a molécula modelo passam por processo sol-gel para então produzir o xerogel monolítico híbrido.

Lin e colaboradores (2003) sintetizaram um polímero híbrido orgânico-inorgânico para a determinação de cafeína. O processo consistiu de duas etapas, iniciando-se pela co-polimerização dos derivados de vinil-silano com um monômero funcional como ácido metacrílico ou acrilamida. Na segunda etapa, realizou-se a hidrólise dos grupos alcoxí, na presença da molécula modelo, seguida da co-condensação com tetraetoxissilano (TEOS) ou trimetoxissilano (TMOS), o que resultou na formação de um monolito sólido. A remoção da molécula modelo levou à formação de uma cavidade complementar à molécula modelo em tamanho e forma. O material obtido apresentou elevada estabilidade e boas propriedades mecânicas.

Silva *et al.* (2006) prepararam um material com impressão molecular seletivo para metilxantinas utilizando o processo sol-gel. Esse material foi aplicado na extração da cafeína de águas, seguido de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV). Os pesquisadores utilizaram 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) como monômero funcional e TEOS como agente reticulador. O material foi empacotado em cartuchos para extração em fase sólida (SPE), sendo relatada sua potencialidade para determinação do analito alvo.

Atualmente, pode-se considerar que o foco de investigação nos estudos de MIT é a melhoria do desempenho dos MIMs em termos de seletividade. Com esse propósito, muitas pesquisas estão sendo conduzidas para explorar novas moléculas como modelo e modificar o MIX, a fim de aumentar a seletividade em função das necessidades e exigências, especialmente no caso de matrizes que usam sílica como precursor. Um dos exemplos é a dopagem de sílica com alumínio. Este procedimento foi utilizado por Li e colaboradores (2012) na preparação de receptores artificiais para a creatina. O MIX foi sintetizado na presença de $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fonte de íons Al^{3+}) e da molécula modelo (creatina). Neste caso, o íon Al^{3+} foi utilizado para gerar sítios ácidos de Lewis na matriz de sílica. O MIX foi lavado para remover a molécula modelo e, em seguida, aplicado na análise de creatina, apresentando uma seletividade marcante.

1.3. Caracterização

MIMs podem ser caracterizados usando técnicas de micro-análise elementar, ressonância magnética nuclear no estado sólido, adsorção/dessorção de nitrogênio, porosimetria por intrusão de mercúrio, microscopia eletrônica, *etc.*

1.3.1. Análise elementar

Pode ser usada para determinar a porcentagem em massa de carbono, hidrogênio, nitrogênio, *etc.* Em caso de copolímeros, essa técnica é especialmente importante para calcular a composição de co-monômero do polímero. Infelizmente, esse método não é suficientemente sensível para detectar traços da molécula modelo remanescente no polímero impresso (SELLERGREN e SHEA, 1993).

1.3.2. Ressonância magnética nuclear (NMR)

A técnica de NMR, permite a obtenção de espectros de espécies, possibilitando sua aplicação tanto em fase líquida quanto sólida. Para polímeros impressos, essa técnica ajuda a entender diferentes ambientes químicos presentes na amostra (CORMACK e ELORZA, 2004). Assim, para este propósito, as técnicas de ^{29}Si , ^{13}C e ^1H NMR são comumente utilizadas.

Esta técnica também pode ser útil no estudo da interação dos monômeros com a molécula modelo durante a etapa de pré-polimerização em solução. Farrington e colaboradores (2006) utilizaram-na para investigar a interação entre a cafeína (molécula modelo) e o ácido metacrílico (monômero funcional). Uma solução foi preparada pela adição de ácido metacrílico (ou substituído por ácido acético deuterado) em solução equimolar de cafeína dissolvida em acetonitrila ou clorofórmio deuterado para obtenção do espectro de ^1H NMR da solução, sendo que o deslocamento do pico de 7,504 ppm no espectro da cafeína (Figura 9a) para 7,362 ppm (Figura 9b) na solução do complexo apontou a existência de uma ligação hidrogênio ou uma interação eletrostática. Como os deslocamentos químicos do NMR podem ser afetados pelo campo elétrico local proveniente dos grupos carregados próximos, por exemplo -OH, a blindagem observada pelo próton vizinho do nitrogênio (em verde nas Figuras 9a e 9b) pode ser afetada devido à interação da molécula modelo com o monômero, resultando em um efeito de deslocalização eletrônica, forçando uma blindagem do próton. (Farrington *et al.*, 2006).

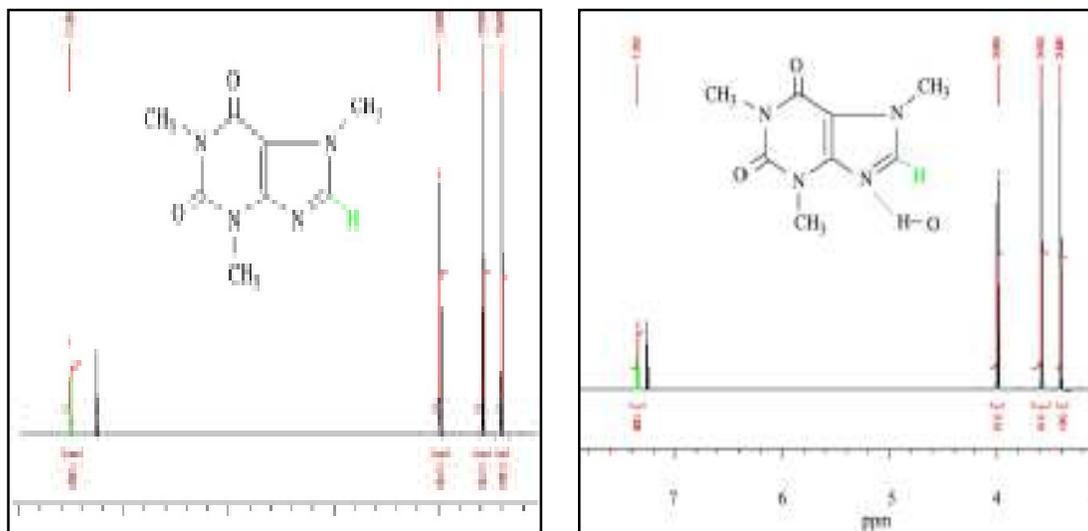


Figura 9: (a) Espectro de ^1H NMR de solução de cafeína em acetonitrila deuterada, (b) o complexo de pré-polimerização de cafeína apresentando a blindagem do pico em 7,5 ppm para 7,3. Adaptado de FARRINGTON *et al.* 2006

1.3.3. Adsorção/dessorção de nitrogênio

A adsorção/dessorção de nitrogênio envolve uma massa fixa de polímero seco sendo exposta a um gás (usualmente nitrogênio) em uma série de pressões fixas. A partir da medida de quantidade de gás adsorvido em função da pressão, isotermas de adsorção podem ser construídas e trazem informações como área superficial específica (m^2/g), volume de poro (mL/g), diâmetro médio de poro e distribuição de tamanho dos poros (PINEDA *et al.*, 2011). Esta técnica é particularmente útil para analisar meso e macroporos em detalhes. Por convenção internacional (IUPAC¹ microporos <2 nm; 2 nm $<$ mesoporos <50 nm; macroporos >50 nm (IUPAC apud CORMACK e ELORZA, 2004; ZDRAVKOV, *et al.*, 2007).

1.3.4. Técnicas de microscopia

A microscopia pode ser usada de várias maneiras para analisar polímeros impressos. Por exemplo, microscopia ótica pode ser usada para verificar a integridade estrutural de polímeros em esferas, enquanto microscopia eletrônica de varredura (SEM) pode ser usada para visualizar macroporos (SONG *et al.*, 2009).

¹ IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

Também é uma técnica bastante útil para o estudo comparativo da morfologia da superfície de MIPs obtidos em diferentes condições. Gongaléz *et al.*, 2009 estudaram os efeitos de diferentes parâmetros sobre a morfologia de MIPs para digoxina. Vários tipos de MIPs foram sintetizados a partir da variação de monômeros, solventes porogênicos e do volume dos últimos. A SEM foi utilizada a fim de analisar a morfologia dos produtos obtidos, o que ajudou a relacionar as características estruturais com as condições sintéticas.

1.4. Aplicações de MIM

O baixo custo, a estabilidade, a facilidade de preparação e a alta seletividade dos MIMs os tornam altamente úteis para diversas aplicações em vários campos diferentes, tais como sensores (LIANG *et al.*, 2009) separações enantioméricas e aplicativos analíticos, extração em fase sólida, indústria farmacêutica, (LIN *et al.*, 2006; SCORRANO *et al.*, 2010) etc.

1.4.1. Sensores

O reconhecimento seletivo da molécula modelo em uma mistura pelos MIP tem inspirado novas aplicações em Química Analítica, levando à criação de novos sensores químicos com seletividade elevada (CHEN *et al.*, 2010). A combinação de capacidade de reconhecimento molecular com estabilidade e robustez são atrativos importantes para sensores, pois estas qualidades facilitam aplicações em ambientes extremos, como na presença de ácidos ou bases (HOLTHOFF e BRIGHT, 2007).

Sensores de MIP vem sendo utilizados com sucesso em diagnósticos clínicos, análise de alimentos, sistemas de detecção de fármacos, etc. Há interesse no uso de sensores de MIP em biosensoriamento devido a estabilidade e ao baixo custo em comparação aos bio-sensores, baseados em receptores biológicos (por exemplo, enzimas, DNA, anticorpos). Estes bio-receptores são imobilizados na superfície do transdutor que interage com o elemento de reconhecimento, que ao se ligar ao analito gera um sinal que é detectado pelo transdutor convertido num sinal de saída, que pode ser medido e correlacionado com a concentração do analito na amostra. A Figura 10 traz um esquema ilustrativo de funcionamento desse tipo de sensor.

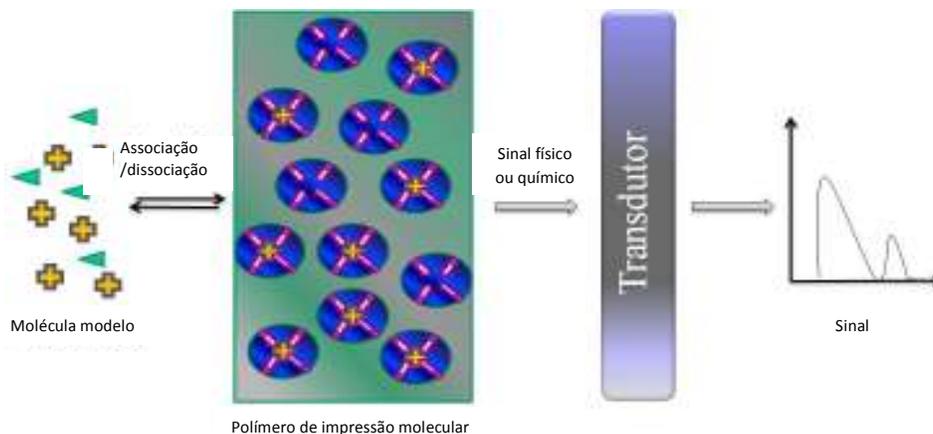


Figura 10: Ilustração esquemática da utilização de MIP como sensor.

É importante notar que estes sensores são sensíveis ao pH e à temperatura e têm utilização dentro de um intervalo limitado. Além disso, são difíceis de manusear e armazenar durante um longo período de tempo. Portanto, as pesquisas estão mais voltadas para a utilização da técnica de impressão molecular para desenvolver receptores sintéticos biomiméticos que possam a capacidade de ser implementados como elementos de reconhecimento em bio-sensores, como substituto de receptores naturais. Outros tipos de sensores que existem hoje em dias são sensores electroquímicos, capazes de converter reações eletroquímicas em sinal elétrico (FUCHS *et al.*, 2012).

Embora sensores recobertos com MIP sejam altamente seletivos para um determinado analito em comparação com moléculas estruturalmente similares, eles ainda sofrem a reatividade cruzada. Neste caso, o MIP preparado com uma molécula modelo não é muito seletivo e pode interagir com outras moléculas com arranjo similar de grupos funcionais, aumentando a interação com elas, o que impede seu uso como material de reconhecimento específico.

Algumas aplicações de sensores cobertos de MIP para análises de certos compostos foram descritas por González e colaboradores (2009), que usaram membranas de MIP como sensor para a determinação de digoxina, efetuando a análise por fluorescência. Para determinar a propriedade de reconhecimento da membrana de MIP para a molécula modelo, vários ensaios foram realizados usando teste de adsorção. As quantidades de digoxina ativa fluorescente adsorvida na membrana de MIP e na membrana não-impressa (NIP – *non impressed polymer*) foram calculadas em 70 % e 28 %, respectivamente.

Outro grupo de pesquisadores (CHANG *et al.*, 2010) utilizou MIT para análise de detecção de prolina com um sensor de arranjo quimioluminescente. O MIP foi preparado usando hidroxiprolina como molécula modelo e as partículas obtidas foram utilizadas para recobrir o fundo de uma placa de microtitulação, utilizada para a detecção de prolina. Para aplicação do método, o analito (prolina) não fluorescente foi marcado com um pigmento fluorescente (cloreto de dansila), resultando em dansila-prolina, que é a espécie efetivamente detectada. A validação do método foi feita mediante ensaios de recuperação de quantidades conhecidas de prolina em folhas de milho e amostras de mel. A porcentagem de recuperação para amostra de folhas de milho esteve na faixa de 97,5 a 104,5 %, com desvio padrão relativo RSD de 1,5 a 3,9 % e, para amostras de mel, de 96 a 97,0 % com RSD de 1,7 a 2,8 % (Chang *et al.*, 2010).

1.4.2. Cromatografia

Embora as aplicações de MIP como sensores estejam em crescimento, é na área de separações que esses materiais realmente se destacam. Isso pode ser comprovado pelo grande número de trabalhos publicados sobre o assunto, decorrentes da boa adaptação desses polímeros como fase estacionária em cromatografia.

Cromatografia e MIT estão bastante associadas, sendo que a demanda por MIMs aumenta, devido a facilidade de manuseio, estabilidade e custos mais baixos quando comparados a outros sorventes. Mesmo após estocagem por períodos de alguns anos, MIMs permanecem operacionais e funcionais sem perda de sítios ativos de ligação; além disso, ajustes de condições como pH servem para controlar a seletividade (VASAPOLLO *et al.*;2011, BARROS *et al.*, 2010). Os MIPs, quando comparados a colunas C18 disponíveis comercialmente, chegam a apresentar desempenho superior em termos de seletividade, sensibilidade e porcentagem de recuperação. Um dos problemas associado a estes sorventes é o resíduo de molécula que permanece ligada ao polímero após a extração. Isto afeta o desempenho dos MIPs especificamente quando o material é usado para preparação prévia de amostra e quantificação analítica de baixos níveis de analito, o que

depende da quantidade de molécula modelo retida no MIP produzido ou da quantidade de analito em questão (TAMAYO *et al.*, 2007).

MIPs podem ser diretamente utilizados para preparar as colunas cromatográficas *on-line* para determinação de analitos. Cacho *et al.* (2009) utilizaram esferas de polímeros (obtidos mediante polimerização por precipitação) para a extração seletiva em fase sólida de derivados de benzimidazol em amostras de água. O MIP foi usado como fase estacionária em uma coluna de HPLC para o enriquecimento *on-line* da substância. A capacidade de interação do MIP com a molécula modelo foi estudada, comparando-se a percolação de uma solução 0,1 mg/L de tiabendazol por uma coluna de fase estacionária de MIP e outra coluna empacotada com polímero não impresso (NIP). A Figura 11 A ilustra os cromatogramas obtidos para MIP e NIP com solução padrão de tiabendazol. A Figura 11 B mostra o cromatograma de amostra de água de rio, fortificada com benzimidazol (0,1 µg/L) percolada em coluna de MIP em SPE *on-line* (CACHO *et al.*, 2009).

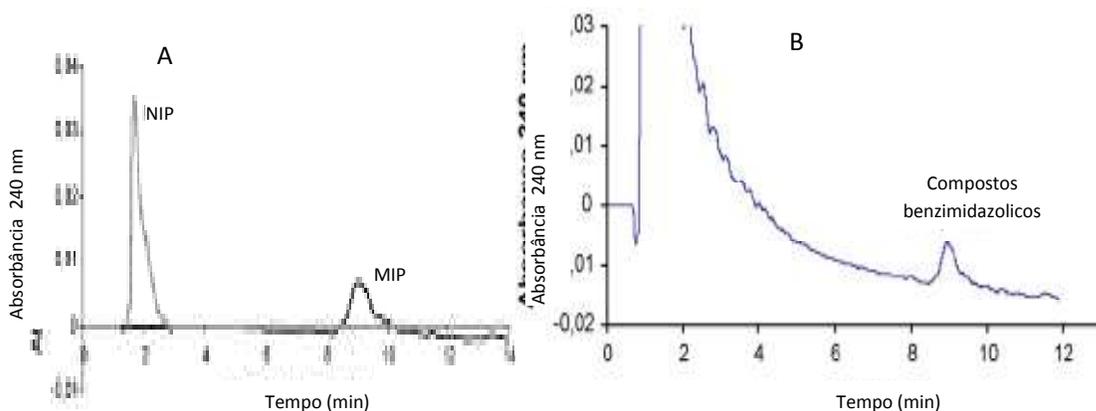


Figura 11: A) Cromatogramas de HPLC da solução aquosa de tiabendazol (0,1 mg/L) percolada em coluna de MIP (preto) e de NIP (cinza). B) Cromatograma de amostra de água de rio fortificada com benzimidazol (0,1 µg/L), pelo procedimento *on-line* MIM/SPE. Condições cromatográficas: vazão: 1 mL/min; fase móvel: metanol por 3 min, seguindo-se metanol/ácido acético 80:20 v/v); detecção ultravioleta. Adaptado de CACHO *et al.*(2009)

A obtenção do polímero na forma de esferas facilitou sua aplicação direta como fase estacionária em colunas HPLC, eliminando os problemas decorrentes de tamanhos irregulares de partículas. A presença de sítios de ligação e a capacidade do polímero para a retenção das moléculas modelo podem ser observadas na Figura 11A. O maior tempo de retenção de moléculas modelo no MIP em comparação com o NIP indica a alta capacidade de ligação do MIP com a mesma.

O polímero apresentou alta detectabilidade e seletividade para compostos tipo benzimidazol. Isto reforça o desempenho do MIP como uma importante ferramenta analítica, dado que o material não passou por nenhum tratamento mecânico que gerasse perda de sítios de ligação ativos (Cacho *et al.*, 2009). O método apresenta boa detectabilidade, mesmo para quantidades pequenas de molécula modelo, e os resultados têm boa reprodutibilidade.

1.4.3. Extração em fase sólida

Alcançar um limite de detecção baixo, no caso de amostras líquidas contendo matrizes complexas, é um grande desafio que envolve o emprego de várias estratégias, como, por exemplo a extração em fase sólida (SPE), que é muito utilizada em diversas áreas de aplicação. Com SPE, é possível realizar a extração do analito de sua matriz, no entanto, outros compostos além do analito podem ser também co-eluídos, o que pode comprometer a seletividade do método que se desenvolve. Uma opção para superar esse problema é o uso de um sorvente que promova a extração seletiva do composto de interesse (BELTRAN *et al.*, 2010).

A síntese de MIMs para aplicação como sorventes de cartuchos de SPE – MIM/SPE (extração em fase sólida com material de impressão molecular) vem se mostrando uma estratégia eficaz para melhorar a seletividade das extrações, num estágio anterior à análise em um sistema cromatográfico. Sorventes comumente utilizados em cartuchos de SPE (C18, por exemplo) carecem de seletividade, portanto, cartuchos de MIM/SPE são importantes especialmente quando extração seletiva é necessária. O uso de cartuchos MIM/SPE segue os mesmos procedimentos de SPE convencionais, portanto, também exigem condicionamento, percolação, lavagem e eluição (CARO *et al.*, 2006).

O uso de MIM/SPE vem sendo relatado em trabalhos com várias matrizes que incluem amostras ambientais, biológicas, separações enantioméricas, *etc.* Destaca-se sua importância para a análise de fármacos nos últimos anos, devido à vantagem inerente da elevada seletividade para o analito dos materiais sintetizados. Vários exemplos podem ser encontrados na literatura sobre o uso dos cartuchos de MIM/SPE para a análise de diversos fármacos em produtos farmacêuticos e seus metabólitos em diversas matrizes, como amostras biológicas, formulações, reservatórios de água, *etc* (HUNG *et al.*, 2006, TURIAL e ESTEBAN, 2010).

Como exemplo pode ser citado o trabalho de Gholivand e colaboradores (2010) envolvendo MIM/SPE para furosemida, que é um diurético potente, empregado no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. Na proposta dos pesquisadores, o fármaco era extraído de amostras de plasma humano utilizando um cartucho de MIM/SPE. Gholivand *et al.* prepararam o MIP e otimizaram as condições para a extração seletiva do analito a partir da sua matriz correspondente. O eluato foi analisado por HPLC-UV. A seletividade do MIP foi comparada com o cartucho SPE C18 comercial. A Figura 12 mostra três cromatogramas: "A" foi obtido após a purificação com cartucho de MIM/SPE, "B" é o cromatograma do plasma considerado como branco e "C" foi obtido após percolação da amostra pelo cartucho de SPE C18. O cartucho de MIM/SPE mostrou um melhor *clean up* do analito em relação ao cartucho comercial (GHOLIVAND *et al.*, 2010).

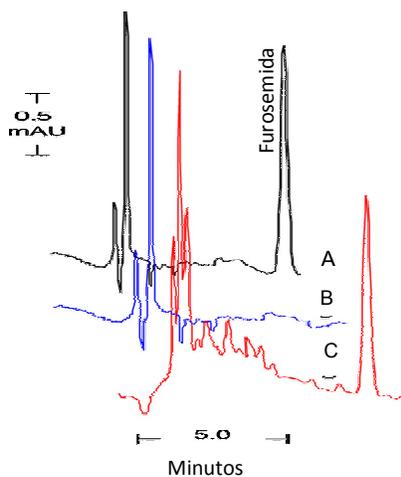


Figura 12: Cromatogramas de furosemida em plasma, (A) após a purificação com cartucho de MIP-SPE, (B) o cromatograma do branco, (C) após extração da amostra pelo cartucho de SPE C18. Adaptado de GHOLIVAND *et al.* (2010).

Os MIPs também são utilizados como materiais de reconhecimento de analitos em ensaios de afinidade. As vantagens dos MIPs, como robustez física, alta resistência a pressões e temperaturas elevadas, ausência de reatividade frente a ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos, têm sido bem exploradas em um grande número de aplicações e isso despertou o interesse da indústria farmacêutica para utilizá-los (KARLSSON *et al.*, 1999).

Os cartuchos de MIM/SPE também possuem um papel imprescindível para separações enantioméricas, que são comumente realizadas com uso de fase

estacionária quiral em coluna cromatográfica para a resolução de misturas racêmicas. Ciclo dextrinas e proteínas imobilizadas são fases estacionárias frequentemente usadas. O rápido desenvolvimento de MIT viabilizou a síntese de novas fases estacionárias para a separação de enantiômeros com seletividade melhorada. Aplicações dos MIPs como meios de separação em cromatografia líquida, eletroforese capilar e electrocromatografia capilar para separação quiral têm sido extensivamente estudadas. Wulff e Vesper (1978) relataram pela primeira vez o uso de MIP preparado por uma abordagem covalente para a separação de enantiômeros. Em seu estudo, a molécula modelo 4-nitrofenil- σ -D-manopiranosídeo foi covalentemente ligada a um monômero para formar 4-nitrofenil- σ -D-manosídeo-2,3,4,6-di-O-(4-vinilfenilboronato), posteriormente co-polimerizado com estirenoedivinilbenzeno. No entanto, a síntese de MIP pela abordagem não covalente vem sendo relatada como mais versátil, podendo ser usada para uma grande variedade de compostos, incluindo moléculas quirais que podem ser impressas (WULFF e VESPER, 1978 *apud* HWANG e LEE, 2001).

O uso das fases estacionárias quirais de impressão molecular para a separação de fármacos quirais é destacado. Como MIPs funcionam a partir do reconhecimento da molécula baseado nas cavidades formadas, a escolha de um tipo de molécula quiral como modelo para a síntese do MIP confere ao produto sintetizado a capacidade de reconhecer somente o analito particular na mistura racêmica.

MIM/SPE também serve para extração de analitos em amostras de alimentos, que envolvem uma grande variedade de matrizes variando de frutas e vegetais a cereais e carne, *etc.* Neste caso, o uso de MIM/SPE relaciona-se mais com a etapa de *clean up* do que para com a pré-concentração do analito, que podem ser pesticidas, herbicidas ou extratos de produtos naturais, *etc.* Um exemplo é a aplicação de MIM/SPE para analisar o herbicida fenurona, com resultados bem sucedidos em várias matrizes de origem vegetal. A Figura 13 mostra cromatogramas obtidas pelo HPLC-UV, de extrato de trigo obtidos antes e após o procedimento MIM/SPE para amostras com e sem fortificação com fenurona (BAGGIANI *et al.*, 2007).

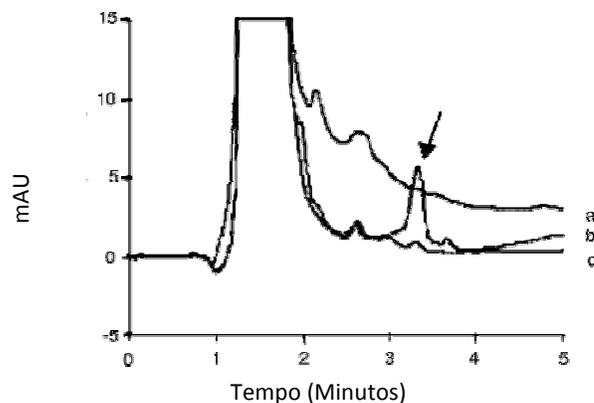


Figura 13: Cromatogramas de amostras de extrato de trigo contendo fenurona: a) obtido diretamente após a injeção da amostra no sistema cromatográfico; b) purificação da amostra fortificada (100ng/g de fenurona) com MIP/SPE com fortificação (e c) purificação com MIP/SPE sem fortificação com HPLC-UV. Adaptado de BAGGIANI *et al.* (2007).

A tecnologia de impressão molecular é uma estratégia amplamente aplicável para obter materiais específicos para um analito ou seletivos para grupo de compostos pré-determinados. A maior parte dos trabalhos envolvendo MIMs trata de suas aplicações em cromatografia, pesquisas estão sendo realizadas para encontrar novos campos de aplicação e resolver os problemas que afetam seu desempenho (TAMAYO *et al.*, 2007). Atualmente, boa parte dos trabalhos que estão sendo descritos na literatura traz comparações entre polímeros e ORMOSILS, provavelmente devido a questões relacionadas com a obtenção de polímeros com partículas de tamanhos regulares (José *et al.*, 2005).

O potencial de utilização de MIM tem sido amplamente demonstrado com a síntese de diversos compostos com funcionalidades distintas. O aumento do interesse em explorar minuciosamente o potencial de MIT pode ser atribuído às demandas recentes da Química Analítica em termos de elevada detectabilidade, seletividade e aplicabilidade com diminuição de custos, que são atributos passíveis de alcançar em métodos empregando MIMs. Este universo de aplicabilidade inspirou o desenvolvimento deste trabalho, originalmente na busca por um procedimento adequado para sintetizar MIM para antocianinas. Peculiaridades dessa classe de compostos tornaram necessário estudar diversas abordagens para síntese de MIMs que foram testadas com diversas moléculas modelo, com resultados descritos nesta tese. Na sequência, são apresentadas informações sobre esses modelos, escolhidos portanto como adequados para os testes das diversas propostas sintéticas estudadas.

1.5. Moléculas modelo estudadas

1.5.1. Fluconazol

Fluconazol é quimicamente conhecido como [2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-propanol] e sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 14 (WALLACE *et al.*, 1992). Este fármaco pertence ao grupo dos triazóis, que também inclui cetoconazol, secnidazol, miconazol, tioconazol, itraconazol, etc.

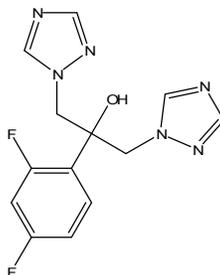


Figura 14: Fórmula estrutural do fluconazol.

Este fungicida sintético é usado para tratar micoses superficiais e sistêmicas que incluem candidíase orofaríngea, esofágica e vulvovaginal (ZIÉMONS *et al.*, 2011). Serve também para o tratamento de meningite criptocócica e coccidioides. Aspectos favoráveis da farmacocinética de fluconazol são, por exemplo, alta biodisponibilidade oral, metabolização mínima, ligação reduzida das proteínas no plasma, *etc.*, que facilita a gestão da sua dosagem (HURTADO *et al.*, 2008). O fluconazol provoca o rompimento do ergosterol, um componente da membrana celular dos fungos, por interferir com o citocromo P-450 dependentes da enzima C-14a-demetilase. A inibição do ergosterol resulta em alterações estruturais e funcionais da membrana, que faz com que o fungo susceptível morra (HOLLIER e COX, 1995; RAMESH *et al.*, 2011; LIEW *et al.*, 2012).

O fluconazol está disponível comercialmente para administração oral, em cápsulas de 50, 150 e 200 mg. Uma solução aquosa contendo cloreto de sódio para administração intravenosa também está disponível (QUEIROZ *et al.*, 2009). O medicamento pode ser administrado por via oral ou parenteral (RIMAWI, 2009) e tem meia vida de 22 horas, sendo excretado principalmente através dos rins. Em geral, o monitoramento do nível do fármaco não é necessário, mas se torna importante para os doentes com alguma ineficácia renal ou que sofrem diálise. (LIMA *et al.*, 2005).

O fluconazol pode existir em três formas polimórficas, conhecidas como Forma I, II e III. Entre estas, a forma II é metastável e tem a capacidade de ser convertida para a forma III durante o armazenamento ou sob compressão (ZIÉMONS *et al.*, 2011). Os ciclos de aquecimento e resfriamento também conduzem as alterações de uma forma para a outra. A existência de diferentes formas foi confirmada através de análise de raios X e calorimetria diferencial (CORREA *et al.*, 2011).

Os métodos frequentemente utilizados para a análise de fluconazol em amostras biológicas e cápsulas incluem a cromatografia gasosa (WATTANANAT e AKARAWUT, 2005), HPLC (SADASIVUDU *et al.*, 2009) e UHPLC (YANAMANDRA *et al.*, 2011). A maioria dos métodos de HPLC utilizam coluna C18 para analisar fluconazol em amostras biológicas e fármacos. Kim e colaboradores (2007) utilizaram o método de extração líquido-líquido para a preparação da amostra antes da análise por HPLC. A extração de fluconazol a partir de amostras de sangue foi realizada usando uma solução de hidróxido de sódio e diclorometano. A fase orgânica foi recolhida, evaporada, dissolvida em fase móvel e posteriormente analisada por HPLC (KIM *et al.*, 2007).

Outros métodos de preparação da amostra incluem a extração em fase sólida, com o empacotamento de um cartucho de SPE com sorvente apropriado. O sorvente C18 foi aplicado para a extração de fluconazol das suas amostras. INAGAKI e colaboradores (1992) utilizaram cartucho de C18 para analisar fluconazol em soro humano. O fluconazol foi extraído do cartucho utilizando metanol para a eluição. A solução obtida foi evaporada, dissolvida em fase móvel constituída por fosfato de tris(hidroximetil)aminometano:acetonitrila 75:25 v/v de HPLC e analisada por HPLC com detecção UV. Figura 15 apresenta o cromatograma obtido para fluconazol com o tempo de retenção de 6,6 minutos (INAGAKI *et al.*, 1992).

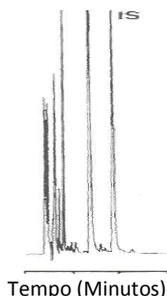


Figura 15. Cromatograma de soro humano apresentando o pico referente a fluconazol em 6,6 minutos. Adaptado de INAGAKI *et al.* (1992). O eixo y expressa unidades arbitrárias de absorvância em 260 nm

1.5.2. Cafeína

A cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) é um alcalóide comum em produtos naturais, como chá, café e cacau, dentre outros. Esta substância foi isolada pela primeira vez em 1820, por Van Runge e Giese. Desde então, tem sido obtida a partir de cerca de 60 plantas. A cafeína foi incluída no vocabulário médico em 1823; no entanto, a sua fórmula estrutural foi descrita apenas em 1875 por Medicus (WATSON, 2003). É um pó branco inodoro e possui um sabor característico amargo.

A cafeína possui capacidade de se auto associar através de interações hidrofóbicas que limitam sua solubilidade em água (MEJR *et al.*, 2009). No entanto, a solubilidade em água pode ser aumentada através da formação de complexos com citrato, benzoato e salicilato. A cafeína é uma base muito fraca e forma sais com ácidos instáveis, podendo ser degradada em soluções fortemente alcalinas (ARNAUD, 2005). Cafeína e compostos similares contêm um anel imidazol fundido com um anel de pirimidina, e sua estrutura é apresentada na Figura 16.

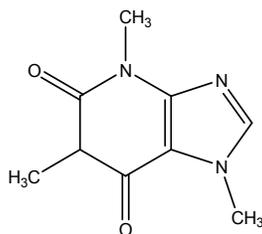


Figura 16. Fórmula estrutural molecular de cafeína.

A cafeína é uma das substâncias mais consumidas no mundo. Possui muitos efeitos farmacológicos que envolvem a estimulação do sistema nervoso central, promove a secreção de ácido gástrico e o alívio da enxaqueca (KAN *et al.*, 2012). Além disso, a cafeína também é amplamente utilizada no tratamento de asma e apnéia em recém-nascido. Geralmente, é absorvida em doses pequenas ou moderadas e funciona como um estimulante leve, útil em alívio temporário da fadiga, com pouco risco de qualquer efeito colateral indesejável (WATSON, 2003). Também é adicionada em formulações com ácido acetilsalicílico para o tratamento de dores de cabeça. No entanto, a ingestão de grandes quantidades de cafeína pode causar vários problemas de saúde que podem incluir nervosismo, irritabilidade, insônia, *etc.* (WANYIKA, 2010).

A cafeína é um composto bem caracterizado e, portanto, é selecionado por diversos pesquisadores para o desenvolvimento das novas técnicas de síntese de MIPs e também para os estudos das propriedades dos produtos sintetizados (LUO *et al.*, 2012). A molécula de cafeína foi escolhida por WANG e colaboradores (2007) para estudar o efeito do monômero, do solvente funcional, do agente reticulador e da concentração do iniciador na síntese de MIP em polimerização por precipitação. A síntese envolveu a utilização de ácido 2-(trifluorometil) acrílico como monômero funcional e divinilbenzeno como agente reticulador. Os resultados mostraram que o polímero obtido possuía uma impressão eficaz da molécula modelo. Além disso, os estudos de seleção do solvente porogênico adequado indicaram o clorofórmio como solvente preferível à acetonitrila para copolimerização, devido às melhores propriedades de reconhecimento molecular alcançadas. A investigação do efeito da concentração de iniciador revelou que o aumento da quantidade de AIBN, mantendo a concentração do monômero constante, resultou num rendimento mais baixo e partículas sem tamanho uniforme (WANG *et al.*, 2007).

MIPs são altamente resistentes às condições estressantes como a pressão mecânica, as variações de temperatura e pH, *etc.* Devido a algumas propriedades exibidas, os MIPs são preferidos em relação aos biopolímeros e têm sido estudados extensivamente. Jin e colaboradores (2008) estudaram os dados de equilíbrio de adsorção de MIP para cafeína e correlacionaram com os três modelos de isotermas. O MIP foi sintetizado utilizando ácido metacrílico como monômero funcional e etilenoglicoldimetacrilato (EGDMA) como agente reticulador. O polímero foi empacotado em cartuchos de SPE e utilizado para a extração de cafeína em soluções de diferentes concentrações. Posteriormente, a quantificação da cafeína no eluato foi feita por HPLC. As quantidades de cafeína adsorvidas no MIP foram calculadas e os dados obtidos foram utilizados para correlacionar a isoterma de adsorção de cafeína para o MIP (Jin *et al.*, 2008). Um MIP para cafeína também foi sintetizado por outros pesquisadores, sob a forma de microgéis pela polimerização por precipitação utilizando acrilamida como monômero funcional, EGDMA como agente reticulador e clorofórmio como solvente porogênico. O MIP foi utilizado para a purificação de cafeína e dos seus análogos estruturais (WANG, 2009).

Farrington e colaboradores (2006) utilizaram cafeína como molécula modelo para preparar o MIP a fim de mostrar a aplicação da espectroscopia de ^1H NMR buscando elucidar a natureza de interações não covalentes presentes na formação do complexo de pré-polimerização. Alguns MIPs para cafeína foram sintetizados, dois deles tendo sido selecionados de acordo com os resultados de desempenho para SPE, um deles com bom desempenho e outros sem religação efetiva. Para avaliar a área superficial, foi aplicada a equação de Brunauer Emmett Teller (BET). Aplicou-se MIM/SPE para amostra de refrigerante energético com o MIP que apresentou a impressão bem sucedida. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 17 e indicam que o MIP extraiu a cafeína na amostra com alta seletividade (FARRINGTON *et al.*, 2006).

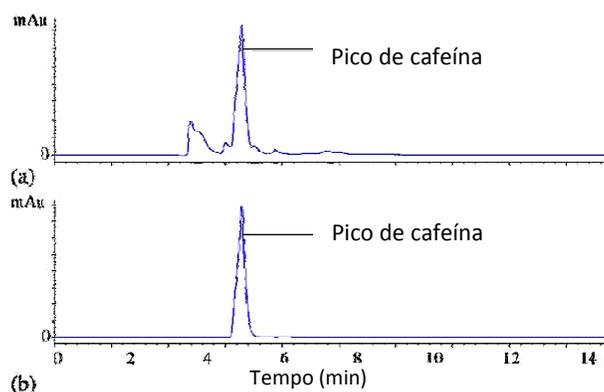


Figura 17: Cromatogramas de amostra de refrigerante energético (a) antes de *clean up* com cartucho MIM/SPE e (b) após *clean up* com cartucho MIM/SPE.

Como a cafeína é uma molécula interessante devido à sua ocorrência em muitos alimentos e seu papel de destaque como matéria-prima na indústria farmacêutica, grandes esforços estão sendo feitos para desenvolver sorventes para sua extração seletiva, que sejam compatíveis com meio aquoso. Luo e colaboradores (2012) sintetizaram um MIP compatível com cafeína para aplicações em meio aquoso, utilizando brometo de 1-(α -acrilato de metila)-3-metilimidazol (1-MA-3MI-Br) e ácido metacrílico, envolvendo interações de ligação π e hidrogênio. O MIP foi sintetizado através do método de polimerização em suspensão aquosa, resultando na formação de partículas esféricas com tamanho uniforme. Como a cafeína possui anel imidazol rico em elétrons π - π e duas carbonilas que podem interagir com o anel imidazol de 1-MA-3MI-Br (π -receptor), que resultam na formação de um complexo estável de pré polimerização, foi possível a obtenção de

um polímero que mostrou uma alta capacidade de adsorção da cafeína em suspensão aquosa, em comparação com os outros solventes testados (metanol, acetonitrila, diclorometano) (LUO *et al.*, 2012).

Outras estratégias interessantes foram adotadas para a síntese de MIP para cafeína e posterior aplicação analítica para diversas matrizes, como a preparação do sensor eletroquímico baseado em MIP, numa proposta inovadora para a detecção de cafeína. O sensor foi construído modificando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro na superfície de um eletrodo de carbono vítreo por deposição potencioestática. Em seguida, *o*-aminotiofenol foi depositado sobre o eletrodo na presença de cafeína e a eletropolimerização foi realizada para obter o sensor eletroquímico de MIP, que foi caracterizado por SEM, voltametria cíclica e de pulso diferencial. O sensor foi utilizado para a detecção de cafeína em amostras comerciais de chá. As amostras foram fortificadas com solução de cafeína padrão e a porcentagem de recuperação foi estimada entre 97 a 105 % (KAN *et al.*, 2012).

Outro sensor modificado para detecção de cafeína envolve quartzo piezoelétrico, que segue um princípio de transdução simples para a detecção de produtos químicos. O sensor de quartzo é geralmente construído utilizando filme de um reagente de detecção depositado sobre a superfície de um cristal de quartzo e utiliza a sensibilidade da frequência de oscilação do cristal para detectar pequenas alterações na massa sobre a sua superfície, resultantes da ligação do analito específico. O sensor para a cafeína foi baseado na imobilização de MIP de ácido polimetacrílico na superfície do cristal. A imobilização foi feita pela dispersão das partículas de MIP em um filme fino de uma matriz inerte polimérica; éster policianoacrilato foi utilizado como agente imobilizante. O sensor exibiu uma seletividade elevada para a cafeína. Também mostrou maior sensibilidade para o analito em comparação com os compostos que possuem estrutura semelhante, como teofilina (EBARVIA e SEVILLA, 2005).

Guo e colaboradores (2012) sintetizaram MIP pela polimerização por precipitação com ácido metacrílico como monômero funcional. Um eletrodo metálico foi revestido com o MIP e aplicado para determinação potenciométrica de cafeína em meio aquoso, atingindo limite de detecção de $5,0 \times 10^{-9}$ mol/L e foi aplicado para o monitoramento de cafeína em amostras de xarope (GUO *et al.*, 2012).

Ainda em trabalhos de MIT (tecnologia de impressão molecular) envolvendo cafeína, derivados da xantina tornaram-se um grupo de grande interesse em estudos de MIP nos últimos anos. Comumente, os MIPs são sintetizados usando apenas uma molécula modelo, no entanto Wang *et al.* (2004) relataram o uso de moléculas modelo isoladas e associadas. Pentoxifilina-cafeína, teofilina-pentoxifilina e cafeína-teofilina foram utilizadas como modelos mistos e os MIPs obtidos foram comparados com os sintetizados usando moléculas modelos individuais. A combinação de compostos estruturalmente semelhantes como modelos resultou em um efeito de soma dos sítios de ligação, ocasionando uma maior seletividade e afinidade. Os resultados mostraram que o MIP de cafeína-teofilina apresentou uma maior afinidade para ambos os analitos e seus análogos do que o MIP de teofilina, que apresentou a maior afinidade entre os MIPs com moléculas modelos individuais. No entanto, o aumento não foi significativamente suficiente em relação ao MIP pentoxifilina-teofilina que mostrou afinidade ainda melhor.

MIPs para cafeína também têm sido aplicados para a extração da cafeína a partir de amostras de chá verde, juntamente com alguns compostos catequina. No trabalho de Jin e colaboradores (2008), a síntese do MIP foi realizada por polimerização em massa, utilizando ácido metacrílico como monômero funcional e EGDMA como agente reticulador. O MIP foi empacotado no cartucho de SPE e o processo de extração envolveu a percolação das amostras de chá verde no cartucho, lavagem com metanol e eluição com metanol e ácido acético (90:10 v / v). A análise do eluato por HPLC mostrou que o MIP possui afinidade para a cafeína, bem como para os compostos de catequinas presentes na amostra. Posteriormente, o analito foi quantificado para se encontrar a quantidade total de cafeína na amostra de chá verde. Como os cartuchos comerciais de SPE C18 também são utilizados para o processo de extração, a comparação dos valores de adsorção de cafeína em cartuchos de C18 e em MIP também foi estudada. Figura 18 traz dados utilizados nessa avaliação. O sorvente de C18 possui afinidade para um certo número de compostos, sendo desta forma menos seletivo, em muitos casos para analito de interesse. O MIP por outro lado, prova ser mais seletivo, devido à sua relação de chave-fechadura com o analito. Os resultados indicaram que o MIP mostrou uma maior afinidade para a cafeína do que C18 e portanto, possui uma capacidade maior de saturação para esse analito (JIN *et al.*, 2008).

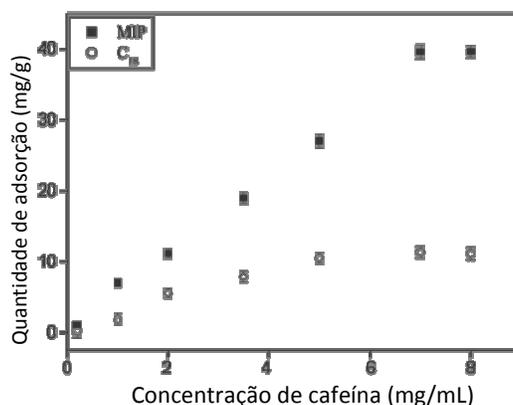


Figura 18: Comparação de quantidade de adsorção de cafeína pelo MIP e por C18.

Entre diversos métodos descritos para a preparação de MIP para cafeína, um envolveu a síntese de um MIP magnético, que foi sintetizado através de polimerização assistida por ultrassom, incorporando pó de óxido de ferro dentro da matriz polimérica contendo o ácido metacrílico como monômero funcional. Foram avaliados os potenciais benefícios da polimerização assistida por ultrassom, como aceleração da taxa de crescimento da cadeia, maior homogeneidade e aumento no rendimento. O MIP foi obtido com alta susceptibilidade magnética e aplicado para a extração da cafeína de extratos de chá verde fortificado com teofilina. A percentagem de recuperação de cafeína ficou entre 65 e 68 %, enquanto que para teofilina a recuperação ficou entre 14 e 51 %. Verificou-se que a cafeína não foi completamente incorporada no polímero e que havia uma reatividade cruzada moderada para a teofilina (PUTTHAWONG e PATTARAWARAPAN, 2012).

1.5.3. Antocianinas

Antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) estão entre os pigmentos mais importantes presentes na casca de frutas, alguns tipos de folhas e flores de muitas plantas. São responsáveis pelas cores laranja, rosa, vermelho, violeta e azul em flores, frutas, folhas e raízes. Antocianinas (ACYs) e carotenóides estão entre os corantes vegetais mais utilizados na indústria de alimentos, são solúveis em água, o que as torna interessante para uso como corantes (OVANDO *et al.*, 2009). Elas pertencem ao maior e mais diversificado grupo de pigmentos derivados de fenilpropanóides e constituem parte significativa dos flavonóides

presentes nas plantas. Estruturalmente ACYs são derivados de antocianidinas, modificadas por substituintes glicosil e acil aromático ou alifático, resultando na formação de um grande número de moléculas de ACYs que diferem em propriedades como estabilidade e cor em solução. A estabilidade de ACYs depende do pH, temperatura, luz, formação de complexos com íons metálicos, *etc.* Na Figura 19 aparecem algumas fórmulas de ACYs.

ACYs podem estar presentes em várias formas protonadas, desprotonadas, hidratadas e isoméricas, sendo que a proporção relativa destas moléculas é fortemente dependente do pH. O cátion flavílico, com estrutura apresentada na Figura 19, gera solução vermelha, e predomina em pH 1 a 3 e pode ser alternativamente transformado em bases quinonoidais através de reações de transferência de prótons e entre valores de pH 6 e 7, são posteriormente convertidos em ânions quinonóides, com solução azul-púrpura e têm um papel importante na ação antioxidante das ACYs. A estrutura conjugada de ACYs permite deslocalização de elétrons e resulta em produtos radicalares estáveis, que são favoráveis para a atividade antioxidante. A estabilidade e reatividade também são afetadas pelo grau e posição de hidroxilação e metoxilação no anel B (KHKENEN e HEINONEN, 2003).

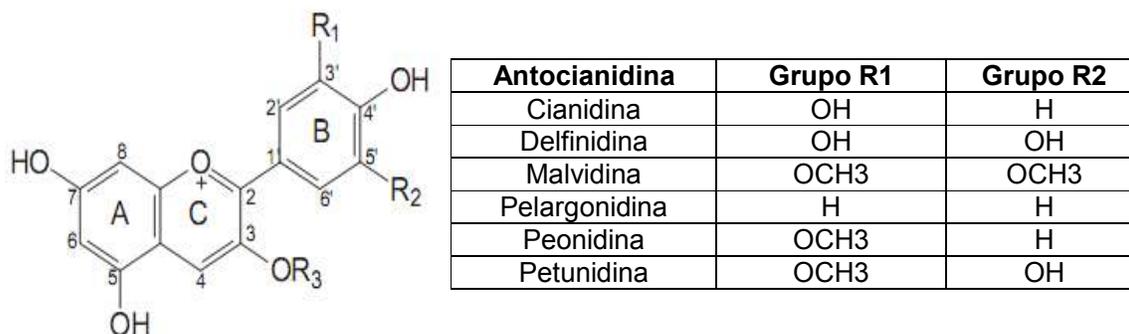


Figura 19: Estrutura do cátion flavílico, onde R₃ é uma unidade glicosídica (COELHO, 2011).

A ação antioxidante de ACYs é destacada devido aos efeitos benéficos à saúde, principalmente na redução de doenças coronárias, na inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e de lipossomas, evitando o risco de várias doenças crônicas, além de poder de atuar na redução do risco de câncer, artrite e diabetes (BAO *et al.*, 2005, WANG e STONER, 2008).

A importância das ACYs levou os cientistas a procurar métodos novos e acessíveis para sua extração e purificação a partir de plantas naturais. A extração por ultrassom é um dos métodos utilizados para a extração de ACYs de plantas. Neste procedimento, partes da planta são expostas a ultrassom na presença de um solvente adequado, como o etanol, seguindo-se decantação (GHASSEMPOUR *et al.*, 2008). As ACYs obtidas por extração alcoólica não são seletivamente separadas e vários componentes das plantas, tais como açúcares, aminoácidos, proteínas e ácidos orgânicos podem ser coextraídos. Portanto, a purificação é uma etapa de grande importância, pois produtos farmacêuticos e alguns aditivos alimentares coloríficos demandam um grau de pureza definido. A purificação por extração em fase sólida é um método relativamente simples, que permite a eliminação de muitas impurezas não fenólicas. Diferentes tipos de sorventes empacotados em cartuchos de SPE podem ser usados com a finalidade de extração. Schafhalter e colaboradores (1998) testaram 16 diferentes materiais quanto à capacidade para purificar antocianinas, incluindo materiais não polares de fase reversa; materiais não iônicos, sorventes poliméricos e resinas de troca iônica fraca e forte. Alguns deles foram Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-7, Serdolit PAD IV, Sephadex G-25, sílica gel RP C18, Fractogel TSK CM 650, Dowex. Os melhores resultados foram alcançados com géis de sílica de fase reversa RP-C18, seguido de Amberlite XAD-7, Serdolit PAD IV e Fractogel TSK CM 650. Com gel de sílica RP-C18, ACYs foram eluídas adequadamente, resultando numa solução altamente concentrada de antocianina; no entanto, com a Amberlite XAD-7 e PAD serdolit IV, a separação e a recuperação foram excelentes, mas as frações obtidas não foram tão concentradas quanto as obtidas com RP-C18 (SCHAFHALTER *et al.*, 1998).

HPLC é uma técnica analítica amplamente aplicada na separação de compostos fenólicos. Colunas selecionadas para este fim são geralmente colunas de fase reversa, que possuem em C18 como fase estacionária e a fase móvel pode ser constituída por uma fase orgânica ligeiramente acidificada por ácido acético ou ácido fórmico. O meio ácido permite o deslocamento completo do equilíbrio para o cátion flavílico e, portanto, resulta em uma melhor resolução e maior absorvância entre 515 e 540 nm. Embora este método funcione bem para a separação de antocianinas monoglicosídicas, apresenta algumas limitações quando usado para a separação de antocianinas diglicosiladas que eluem como componentes misturadas,

resultando em cromatogramas com combinação de picos das antocianinas monoglicosídicas, o que complica o estudo destes compostos.

Nos últimos anos, a utilização da técnica de electroforese capilar (CE) para separação de polifenóis também se tornou uma alternativa atraente frente HPLC, devido à sua elevada eficiência de separação, velocidade e baixo consumo de solventes. Além disso, CE é pode ser adequada para a análise de amostras em matrizes complexas e a literatura traz várias propostas de separação de ACYs utilizando CE (VALLS *et al.*, 2009).

Este contexto deve indicar que a extração e a purificação de componentes ativos de fontes naturais é uma tarefa difícil, principalmente devido à coexistência de macromoléculas, interferência de moléculas pequenas, isômeros e análogos. Assim, MIT pode ser promissora, sendo que seu intenso desenvolvimento nos últimos anos representa grande potencial para aplicação analítica (TURIEL e ESTEBAN, 2010).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi explorar diversas técnicas de impressão molecular utilizando diferente moléculas modelo e avaliar a aplicabilidade analítica dos materiais sintetizados e devidamente caracterizados.

Os objetivos específicos foram:

- Sintetizar materiais sorventes através da técnica de impressão molecular, usando fluconazol, cafeína e antocianina.
- Caracterizar os materiais sintetizados.
- Aplicar os materiais sorventes sintetizados em cartuchos de SPE e posterior aplicação para análises por HPLC.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.1. Reagentes

3-(Trimetoxissilil)propilmetacrilato 97 %, *Aldrich*;

Acetato de vinila 99 %, *Aldrich*;

Acetonitrila (ACN) 99,5 %, *Vetec*;

Ácido Metacrílico (MAA) 99 %, *Aldrich*;

Acrilamida (AA) 99 %, *Aldrich*;

Água Deionizada, deionizador *Millipore Milli-Q Plus*;

2,2'-Azobis(2-metilpropionitrila) (AIBN) 98 %, *Aldrich*;

Cafeína (CAF) 98,5 %, *Acros*;

Dimetilsulfóxido (DMSO) 99 %, *Merck*;

Divinilbenzeno (DVB) 55 %, *Aldrich*;

Etilenoglicoldimetacrilato (EGDMA) 98 %, *Aldrich*;

Fluconazol (FLU) 98,5 %, *Deg*;

Fosfato de sódio bibásico 99,7 %, *Nuclear*;

Fosfato de sódio monobásico 98-102 %, *Nuclear*;

Metanol (MeOH) 99,8 %, *Synth*;

Miconazol 99,6 %, *Deg*;

Rutina 94 %, *Sigma*;

Secnidazol 98,8 % *Galena*;

Teobromina 99 %, *Acros*;

Teofilina 99 %, *Acros*;

Tetraetoxissilano (TEOS) 98 %, *Strem*;

Tetraidrofurano (THF) 99,5 %, *Merck*;

Tioconazol 99,8 %, *Deg*;

Viniltrimetoxissilano (VTMOS) 98 %, *Aldrich*.

3.2. Materiais e Equipamentos

Modulos termogravimétricos *SDT Q600* e *TGA 2050 TA Instruments*;

Banho termostaticado *Templette TE8D ESRB-11 Techne*;

Cartuchos de SPE sorvente C18 e diâmetro de partícula 47-60 µm, *Varian*;

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência *Alliance Waters*, com coluna *Novapak C18* (150 x 3,9 mm e diâmetro de partícula 4,0 µm) e *Microsorb-mv C18* (250 x 4,6 mm e diâmetro de partícula 5µm);

Cromatógrafo a líquido de ultra alta eficiência UHPLC *Acquity-Waters* com coluna *Acquity BEH C18* (comprimento 5,0 x 2,1 mm e diâmetro de partícula 1,7 µm) *Waters* acoplado a detector de massas (UPLC-MS) *Quattro Micro API Waters*;

Cubetas de quartzo com 0,5 cm de caminho óptico

Microscópio de varredura eletrônica *JEOL SEM 6360-LV*;

Equipamento para adsorção/dessorção de nitrogênio *Nova 4200*;

Espectrofotômetro no infravermelho *FT IR BOMEM NB*;

Espectrofotômetro UV-VIS *Femto 600S*;

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido *Bruker 400*;

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si no estado sólido *Bruker Advance II+ 400*;

Filtro millipore, 0,45 µm *Millex-HV*;

Peneira 120 mesh;

pHmetro *Analyser 300* e eletrodo de vidro *Analion V620*;

Pistilo e almofariz de porcelana;

3.3. Amostras

Pó de café *Melitta Tradicional*;

Cápsula de Fluconazol *Flutec*[®] (Excipientes: amido de milho, estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal, lactose, laurilsulfato de sódio);

Extratos das ACYs de Uva Brasil (*Vitis vinifera* L. Cv. "Brasil").

CAPÍTULO 4: FLUCONAZOL

4.1. Parte Experimental

4.1.1. Síntese

O MIP foi sintetizado pela abordagem não covalente utilizando a técnica de polimerização por precipitação. A molécula modelo (1,00 mmol), o monômero MAA (4,00 mmol), o agente reticulador EGDMA (20,0 mmol) e o iniciador AIBN (0,0214 g) foram dissolvidos em 25 mL de acetonitrila em um balão de fundo redondo de 50 mL. A solução foi purgada com argônio por 5 minutos e o frasco foi selado com um septo. A polimerização foi realizada a 60°C por 24 horas sob termostatização. O polímero obtido sob a forma de precipitado foi lavado com metanol em um aparelho de soxhlet durante 24 horas para remover o fluconazol e os monômeros que não reagiram.

Da mesma forma, o polímero não impresso (NIP) foi preparado sem o uso da molécula modelo.

4.1.2. Caracterização

Os polímeros foram caracterizados utilizando-se as seguintes técnicas:

- Microscopia eletrônica de varredura: com amostra em pó, em porta amostras de cobre, metalizada com ouro.
- Adsorção/dessorção de nitrogênio

As amostras foram pré-aquecidas a 120 °C sob vácuo e as isotermas de adsorção de nitrogênio foram determinadas a -196 °C.

As isotermas de Brunauer-Emmet-Teller (BET) e o método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) foram usados para determinar a área superficial, volume de poros e sua distribuição de tamanho.

- Termogravimetria:

As amostras com cerca de 5 mg foram aquecidas em razão de 5 °C min⁻¹ em atmosfera de N₂, para registro de curva TG.

- Espectroscopia no infravermelho:

Espectros das amostras em pastilha de KBr foram obtidos na faixa de 4000 a 700 cm⁻¹, com 16 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹.

4.1.3. Procedimento de MIM/SPE

4.1.3.1. Condições de MIM/SPE

Um cartucho de extração contendo fase sólida molecularmente impressa com fluconazol (FLUMIP/SPE) foi preparado utilizando-se 50 mg de MIP empacotado em um cartucho de SPE vazio entre dois discos de Teflon®, um na parte inferior e outro na parte superior. Um cartucho SPE com FLUNIP/SPE (polímero não impresso) também foi preparado do mesmo modo. Em seguida, os cartuchos foram condicionados com 2,00 mL de acetonitrila e 2,00 mL de mistura de acetonitrila e água na proporção 1:15 (v/v).

As condições de lavagem para FLUMIP/SPE foram investigadas e, para isso, ajustou-se o pH da água deionizada entre 4 e 8 pela adição, gota a gota, de soluções de HCl ou NaOH 0,001 mol/L. Testou-se, também, a lavagem utilizando-se 0,500 mL de solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) 2%. Trabalhou-se com 5 replicatas.

A eluição de FLU retido no cartucho foi feita com 1,00 mL de metanol.

4.1.3.2. Análise da amostra

O conteúdo do pó de uma cápsula de fluconazol comercial contendo 0,0060 g foi dissolvido em 3 mL de acetonitrila e, em seguida, diluído com água deionizada em um balão volumétrico de 50 mL. A solução foi filtrada e, em seguida, 2,00 mL desta solução foram diluídos com água deionizada em um balão de 50 mL, sendo que 1,00 mL desta solução foi carregada nos cartuchos de FLUMIP/SPE e FLUNIP/SPE, respectivamente. Os cartuchos foram lavados com 0,500 mL de solução aquosa de DMSO 2% e, em seguida, eluídos com 1,00 mL de metanol. Finalmente, as frações de eluição foram analisadas por UHPLC-MS.

4.1.3.3. Análises por UHPLC-MS

A temperatura do forno da coluna foi mantida a 40 °C. As fases móveis consistiram em 0,1% de ácido fórmico em água (A) e metanol (B). O gradiente de eluição está descrito na Tabela 1:

Tabela 1: Descrição do gradiente de eluição da cromatografia de UHPLC-MS

Tempo (min)	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)
0	97	3
4,0	5	95
4,2	5	95
5,0	97	3

A vazão foi fixada em 0,35 mL/min e usou-se o volume de injeção de 3 μ L de amostra. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, com voltagem de *spray* = 1000 V. A fonte de íons *electrospray* foi aquecida a 150 °C e o íon com razão *m/z* = 307 foi observado.

4.1.4. Figuras de mérito

Para a construção da curva analítica, as soluções de FLU na faixa de $1,31 \times 10^{-5}$ a $1,45 \times 10^{-4}$ mmol/L foram percoladas pelo cartucho de FLUMIP/SPE e os eluatos obtidos foram analisados por UHPLC-MS. A curva analítica foi obtida plotando as concentrações dos eluatos no eixo x e a área dos picos no eixo y.

O limite de detecção foi determinado a partir da razão sinal:ruído com esta finalidade, soluções padrão de FLU na faixa das concentrações $1,63 \times 10^{-8}$ a $1,63 \times 10^{-10}$ mmol/L foram percoladas no cartucho de FLUMIP/SPE. Os eluatos foram analisados por UHPLC-MS e a relação sinal-ruído medida em cada cromatograma.

4.1.5. Estudos de seletividade

A seletividade do FLUMIP foi avaliada comparando-se a percentagem de recuperação de FLU e compostos estruturalmente relacionados: secnidazol, miconazol e tioconazol, usando o cartucho de FLUMIP/SPE e posterior determinação por espectroscopia ultravioleta (UV). Os testes foram realizados com seis replicatas. As soluções desses compostos foram preparadas por dissolução direta de massa adequada dos padrões, seguindo-se diluições análogas às utilizadas no preparo da amostra de FLU. O teste de porcentagem de recuperação para cada composto foi feito em duas concentrações diferentes: 0,240 e 0,168 mmol/L para miconazol, 0,257 e 0,142 mmol/L para tioconazol, 0,648 e 0,432 mmol/L de secnidazol. O procedimento com FLUMIP/SPE para estes compostos foi realizado nas mesmas condições otimizadas para análise de FLU.

4.1.6. Comparação com C18

O método utilizado por Inagaki *et al.* (1992) para a análise de FLU em amostras de plasma empregando SPE com colunas C18 foi adaptado, incluindo algumas modificações. O cartucho foi empacotado com 50 mg do FLUMIP e pré-condicionado com 1 mL de metanol, seguido por 1 mL de tampão de fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH = 6. Para preparar soluções de fluconazol nas concentrações $2,28 \times 10^{-4}$ e $9,79 \times 10^{-5}$ mmol, o padrão foi dissolvido em 3,00 mL de acetonitrila e diluído com o tampão de fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH = 6. O volume de 1,00 mL desta solução foi percolada no cartucho condicionado que em, seguida, foi lavado com 1,00 mL de tampão e 1,00 mL de água deionizada. A eluição foi feita com 1,00 mL de metanol e o eluato foi analisado pela espectroscopia UV. O mesmo procedimento foi aplicado para miconazol, tioconazol e secnidazol, exceto que a etapa de preparação da solução envolveu a dissolução destes fármacos em 7,00 mL de acetonitrila. Testes de recuperação foram feitos com: miconazol 0,240 e 0,168 mmol/L; tioconazol 0,257 e 0,142 mmol/L, secnidazol 0,648 e 0,432 mmol/L.

4.2. Resultados e discussão

A síntese de MIP para fluconazol (FLUMIP) envolveu polimerização por precipitação e, portanto, partículas de tamanho uniforme foram obtidas, não tendo sido necessária etapa de moagem. Uma proposta de estrutura molecular de FLUMIP com esquema de síntese é apresentada na Figura 20.

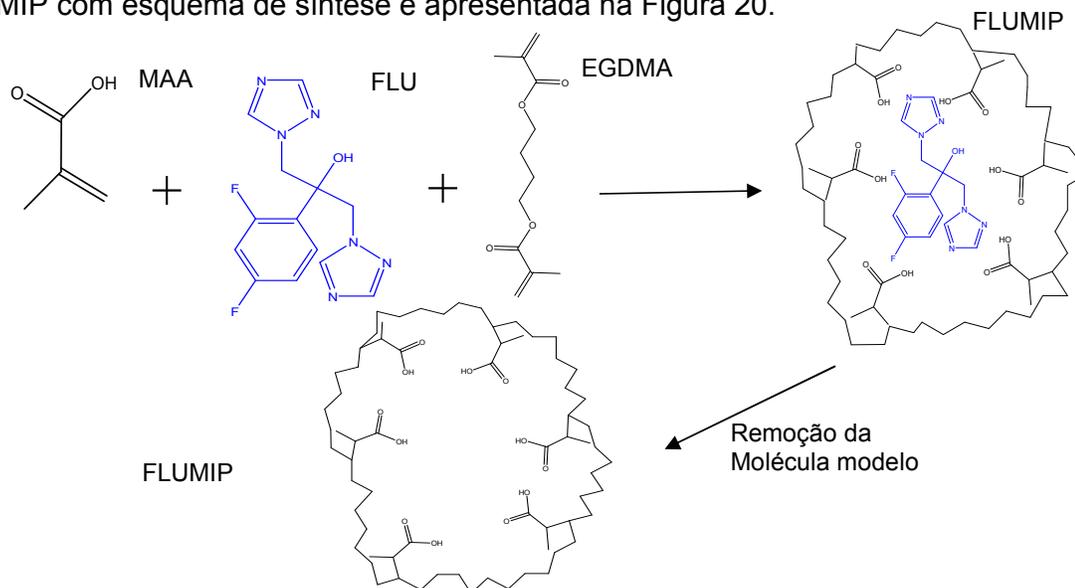


Figura 20: Esquema de síntese de FLUMIP, com proposta de sua estrutura molecular.

O polímero resultante foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, adsorção/dessorção de nitrogênio e termogravimetria.

4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho (IR)

Foram obtidos espectros no infravermelho a fim de comparar algumas características do FLUMIP e FLUNIP. A semelhança dos perfis espectrais como se nota nas Figuras 21a e 21b, indicou estruturas similares em ambos os polímeros. A banda em 3444 cm^{-1} é característica do grupo -OH, enquanto as obtidas em 2948 e 1460 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento e deformação metila assimétrico e simétrico, respectivamente. A absorção em 1727 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo C=O, em éster.

4.2.2. Termogravimetria

Este teste foi realizado a fim de investigar a estabilidade térmica do polímero impresso e do polímero de controle. Perda de massa significativa ocorreu em cerca de $390\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ambos, FLUMIP e FLUNIP, sugerindo uma estabilidade térmica adequada para aplicações analíticas abaixo dessa temperatura. As curvas TG e DTG estão apresentadas na Figura 22.

Os resultados dos espectros IR e TGA indicaram que FLUMIP e FLUNIP não apresentaram estruturas com diferença significativa. A presença da molécula modelo somente afetou suas propriedades físicas, o que foi comprovado pelas isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, com resultados discutidos na sequência.

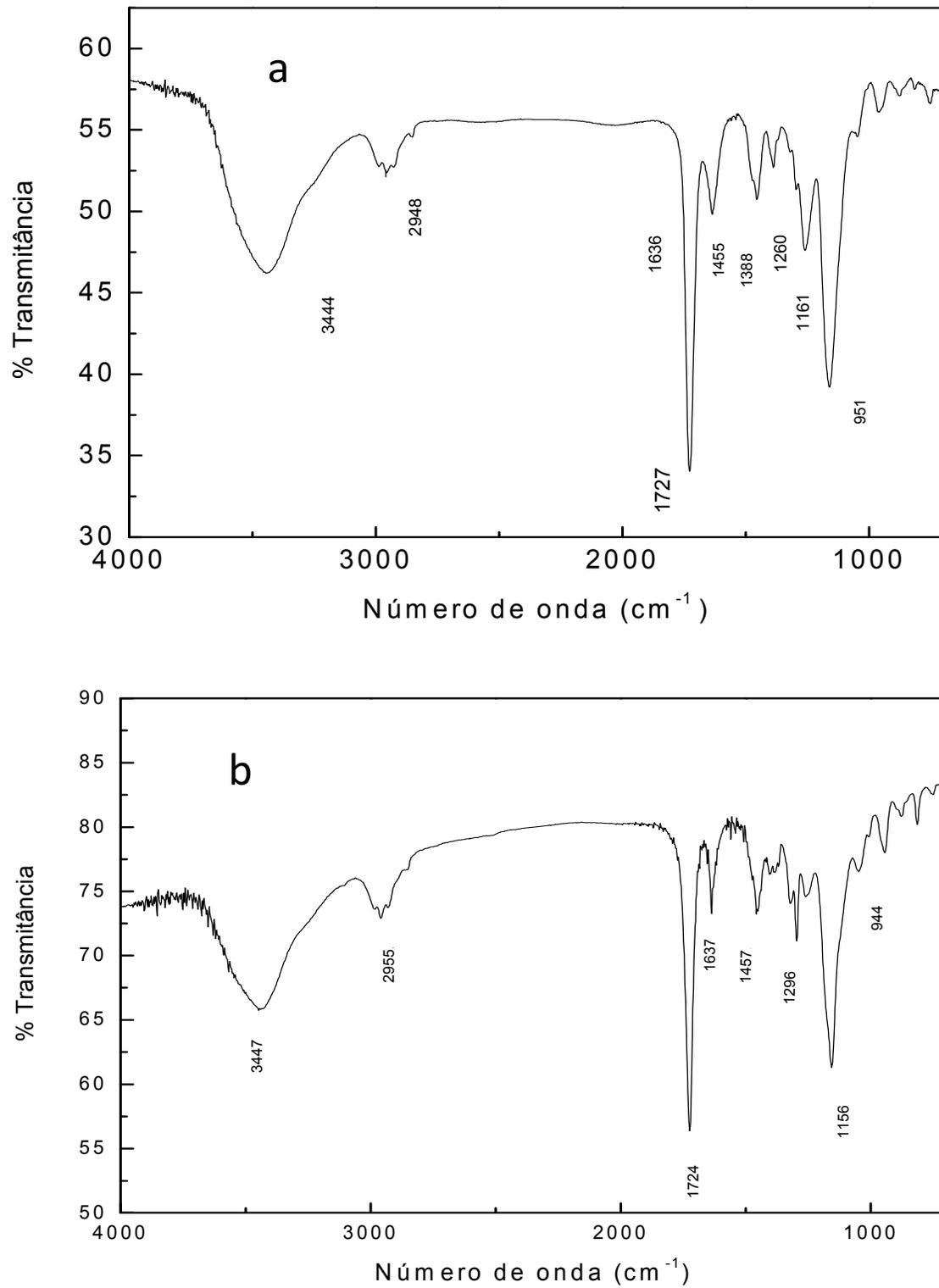


Figura 21: Espectros no infravermelho de a) FLUMIP e b) FLUNIP.

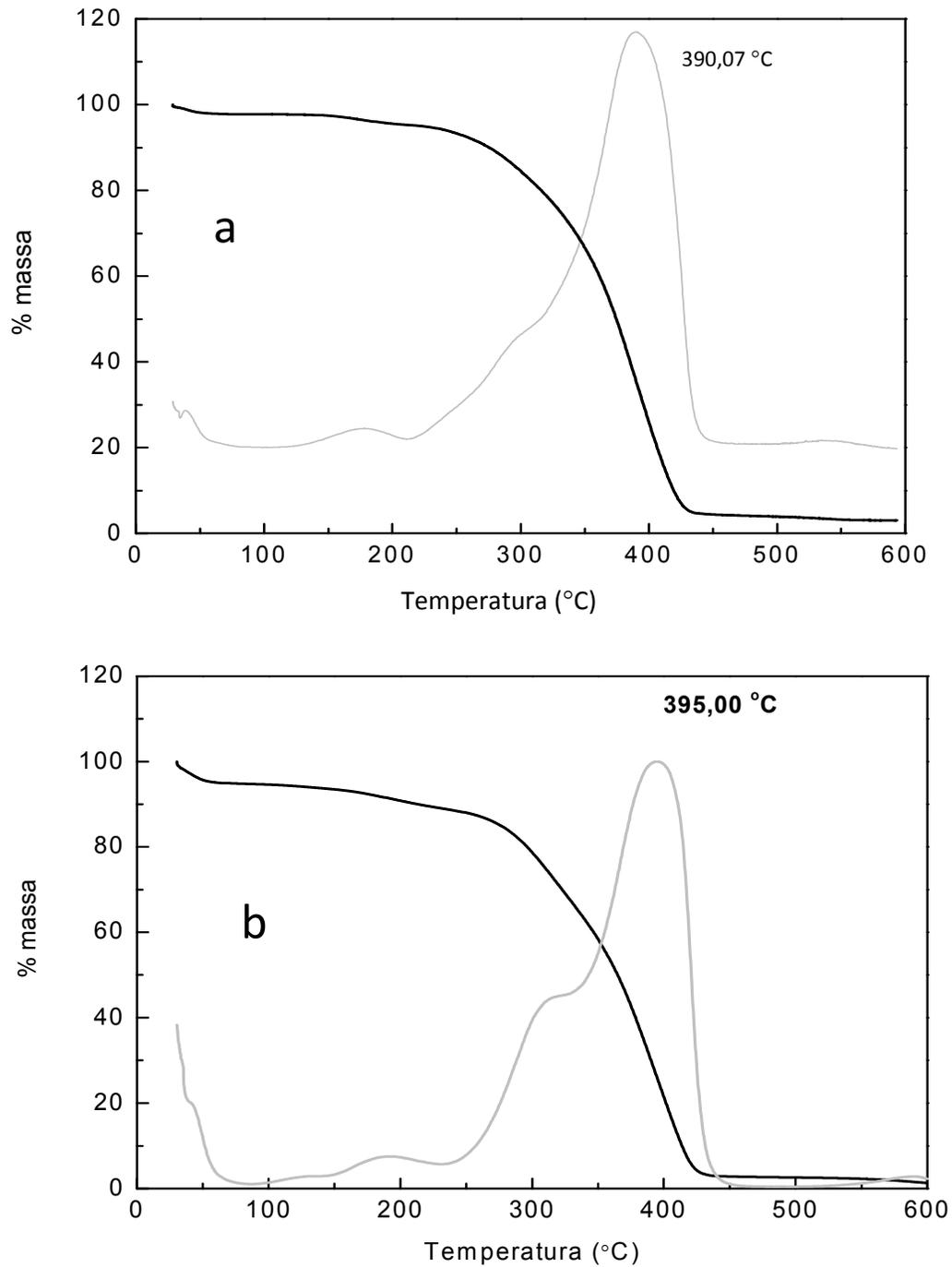


Figura 22: Curvas TG/DTG de a) FLUMIP e b) FLUNIP. A linha clara é corresponde a DTG, a derivada da curva original.

4.2.3. Adsorção/dessorção de nitrogênio

A técnica de adsorção/dessorção de nitrogênio envolve uma massa fixa de polímero seco sendo exposta a um gás (usualmente nitrogênio), sob uma série de pressões fixas. A quantidade de gás adsorvido depende da pressão de equilíbrio do gás, da temperatura de adsorção e da quantidade do adsorvente, serve para determinar a área superficial, o volume total de poros e o diâmetro médio de poro das partículas de polímero. Essa técnica foi utilizada para obter isotermas de adsorção para a caracterização de propriedades texturais de ambos FLUMIP e FLUNIP. Na literatura (IUPAC, 1985) são apontados seis tipos de isotermas de adsorção classificadas como tipos I a VI. As isotermas obtidas para FLUMIP, apresentadas na Figura 23, têm perfil do tipo II. Este tipo de isoterma é indicativo do processo de adsorção em multicamadas, o que sugere a presença de superfícies não porosas ou macroporosas (KANEKO, 1994). Os parâmetros investigados neste estudo estão resumidos na Tabela 2. É evidente que as partículas do FLUMIP são caracterizadas por maior área superficial e maior volume de poros em comparação ao FLUNIP, que são indicativos de maior capacidade de ligação do FLUMIP.

Tabela 2: Resultados da caracterização obtidos por isotermas de adsorção / dessorção de nitrogênio.

Polímero	Área Superficial (m ² g ⁻¹)	Volume total de poro (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro médio de poro (nm)
FLUMIP	72	0,11	66
FLUNIP	28	0,06	87

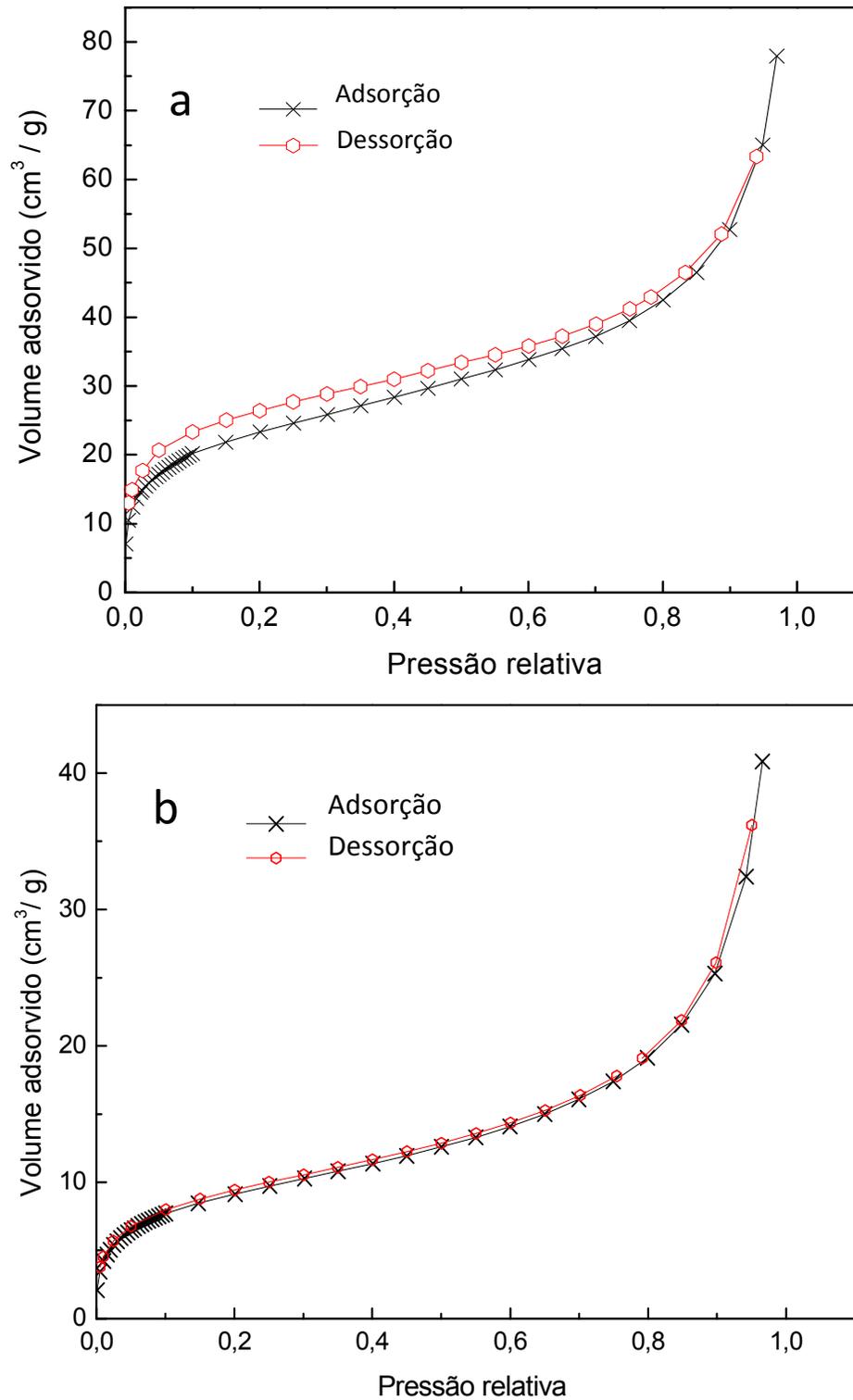


Figura 23: Isothermas de adsorção/dessorção de nitrogênio de (a) FLUMIP e (b) FLUNIP. O volume adsorvido está representado nas condições normais de temperatura e pressão.

4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação morfológica de FLUMIP e FLUNIP foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (SEM). As imagens obtidas com ampliação de 10000 vezes são mostradas na Figura 24. As partículas de FLUMIP apresentaram tamanho menor que as partículas de FLUNIP. Pode se sugerir que a diferença de morfologia dos dois polímeros é devida à presença e à ausência da molécula modelo em MIP e NIP, respectivamente.

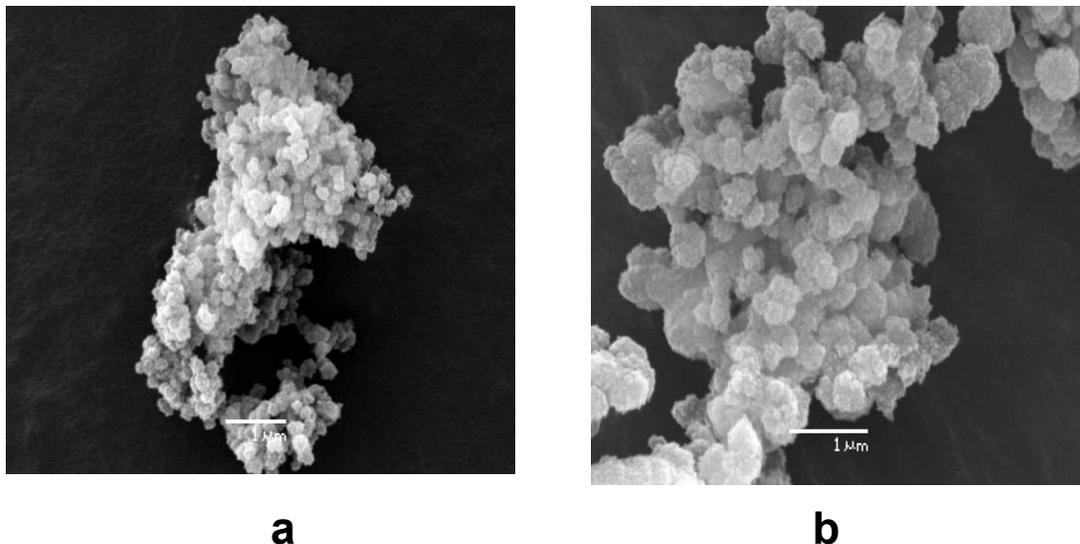


Figura 24: SEM de a) FLUMIP e b) FLUNIP.

4.2.5. Aperfeiçoamento do procedimento do FLUMIP/ SPE

O pH é um fator importante que pode afetar a seletividade de MIPs. O pH da matriz pode alterar a capacidade do MIP interagir com o analito devido à variação de suas propriedades de superfície (DAI *et al*, 2011), portanto, o efeito do pH da solução de lavagem foi estudado. A Figura 25 mostra que entre pH 4 a 8 não foi observado efeito apreciável sobre a recuperação percentual; sendo assim, nos procedimentos posteriores não houve ajuste de pH.

Solventes orgânicos, como acetonitrila, são comumente usados para as etapas de *clean up* em aplicações de MIM/SPE. No entanto, neste caso a amostra escolhida foi uma preparação em cápsula, que não envolve matriz complexa como amostras biológicas, portanto, a utilização de solvente orgânico, DMSO como uma solução aquosa (2% v/v) já seria adequada para fins de diminuir as interações não específicas, além da solubilização.

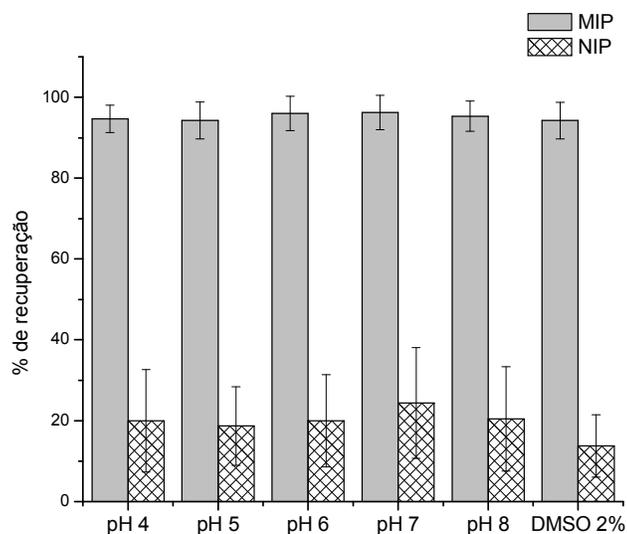


Figura 25: Efeito do pH de lavagem na recuperação de FLU em MIP/SPE (n=5), utilizando-se metanol para eluição.

A partir das condições otimizadas, a aplicabilidade do FLUMIP/SPE foi avaliada para a determinação de FLU em cápsulas de medicamento.

A solução da amostra preparada foi carregada no cartucho de FLUMIP/SPE e, após a lavagem, em condições previamente estabelecidas, foi feita a eluição com metanol e o eluato foi analisado por UHPLC-MS. As Figuras 26a e 26b ilustram os cromatogramas obtidos.

A porcentagem de recuperação foi determinada pela fortificação da amostra da cápsula com o padrão de FLU em diferentes concentrações. O cálculo de porcentagem de recuperação foi realizado a partir da Equação 2 e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

$$\text{Porcentagem de Recuperação} = \frac{\text{quantidade de FLU eluída}}{\text{quantidade de FLU percolada}} \times 100 \quad (2)$$

Tabela 3: Resultados de recuperação das amostras pelo procedimento MIP/SPE.

Concentração adicionada (µg/mL)	recuperação 1 (%)	recuperação 2 (%)	recuperação 3 (%)	Média (%)	Desvio padrão (%)	Desvio padrão relativo (%)
1,00	90,8	72,2	81,9	90,8	9,0	10
2,00	94,6	96,5	99,8			
3,00	95,6	99,0	86,5			

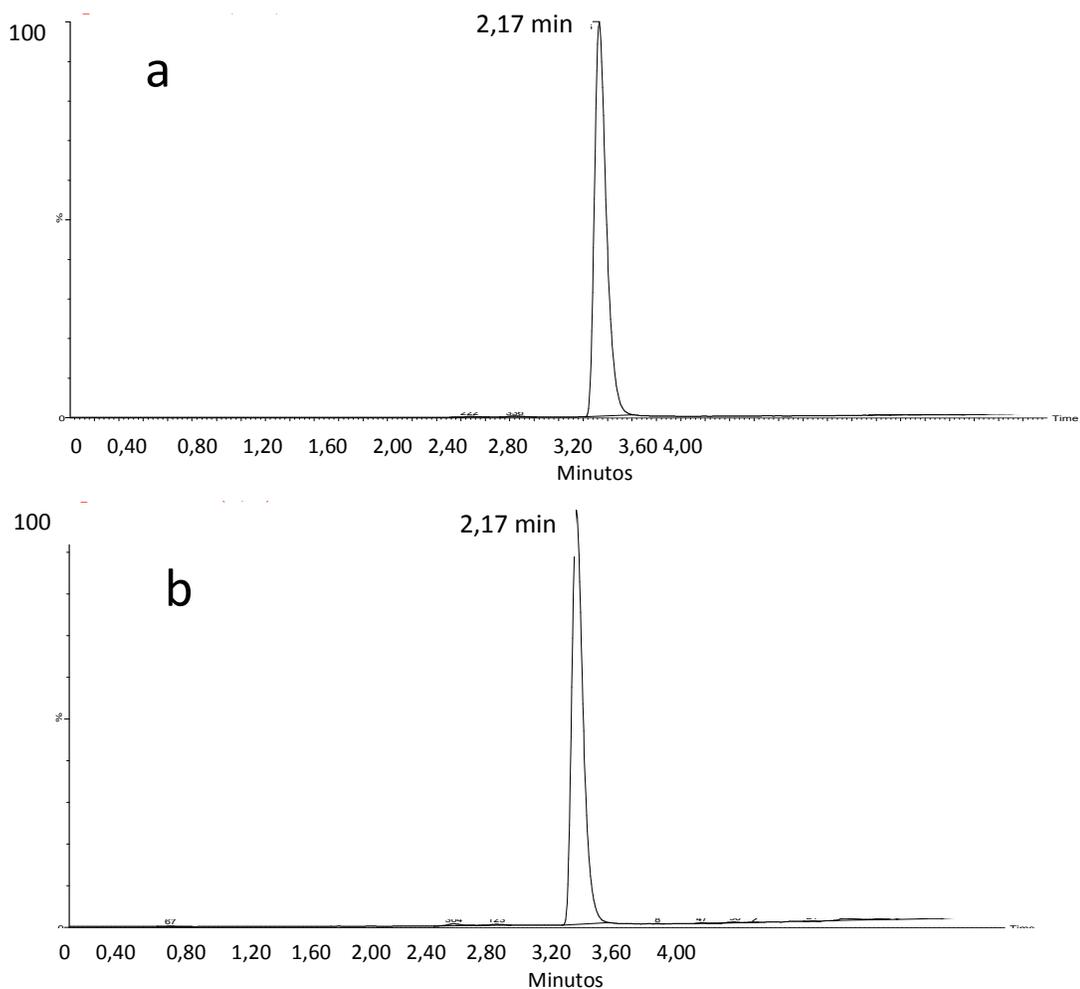


Figura 26: Cromatogramas UHPLC-MS da amostra comercial de fluconazol a) antes e b) após a extração usando FLUMIP/SPE. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (metanol), temperatura do forno da coluna: 40 °C, vazão de fase móvel: 0,35 mL/min, gradiente inicial: 97 % de A e 3 % de B, 4 a 5 minutos: 5 % de A e 95 % de B, Gradiente final: 97% de A e 3 % de B.

4.2.6. Figuras de mérito

Algumas figuras de mérito do método cromatográfico para determinação de FLU após extração com cartucho FLUMIP/SPE foram calculadas. Foi construída uma curva analítica linear (Figura 27) na faixa de $1,17 \times 10^{-5}$ a $1,27 \times 10^{-4}$ mmol/L, com coeficiente de correlação linear = 0,9998, descrita pela Equação 3, que relaciona a área do pico do cromatograma correspondente a FLU com sua concentração (C_{FLU}) em mmol/L.

$$\text{Área} = 1,27 \times 10^4 + 1,02 \times 10^9 \times C_{\text{FLU}} \quad (3)$$

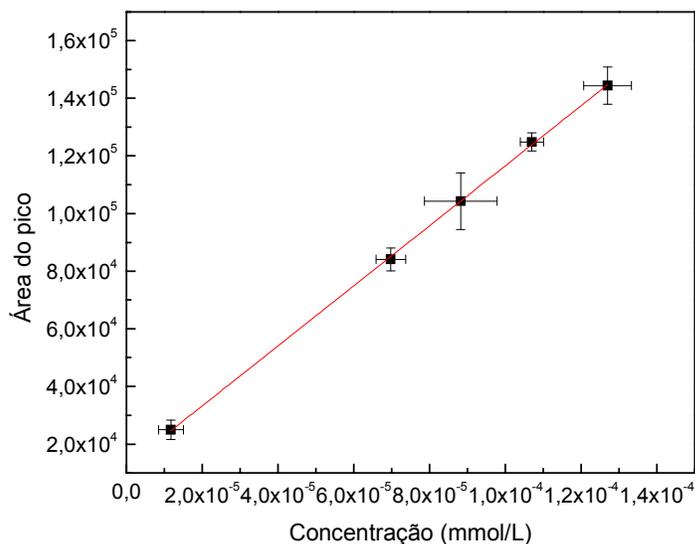


Figura 27: Curva analítica para FLU com dados de UHPLC-MS, com medidas em triplicatas. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (0,1 % de ácido fórmico em água) e B (metanol), temperatura do forno da coluna: 40 °C, vazão de fase móvel: 0,35 mL/min, gradiente inicial: 97 % de A e 3 % de B, 4 a 5 minutos: 5 % de A e 95 % de B, radiente final: 97 % de A e 3 % de B.

O uso de UHPLC-MS para a determinação quantitativa de fluconazol nos extratos resultou em um limite de detecção muito baixo, devido à alta detectabilidade e seletividade da espectrometria de massas, sem comprometer o perfil do pico no cromatograma. A relação de razão sinal:ruído 3:1 (COLLINS *et al.*, 2004) foi aplicada para calcular o limite de detecção. Entretanto, devido à baixíssima intensidade do ruído instrumental, mesmo na concentração de $1,63 \times 10^{-10}$ mmol/L, esta razão não foi alcançada. Sendo assim, não se descarta a possibilidade de que o limite de quantificação tenha essa ordem de grandeza, já que a detectabilidade da espectrometria de massas é muito elevada.

4.2.7. Estudos de seletividade

Estes estudos envolveram a determinação da porcentagem de recuperação do secnidazol, miconazol e tioconazol, que apresentam estrutura molecular similar a FLU, conforme pode ser observado pelos resultados ilustrados na Figura 28.

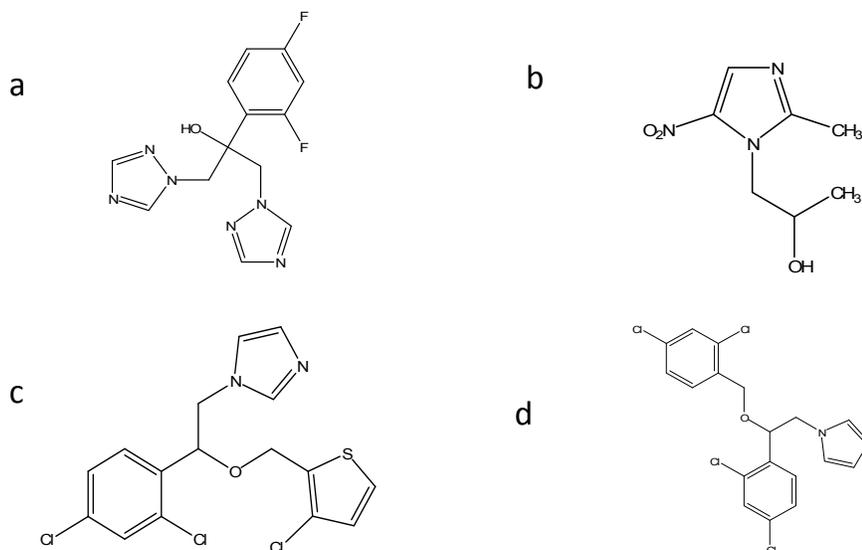


Figura 28: Estruturas moleculares de: a) fluconazol, b) secnidazol, c) tioconazol, d) miconazol.

A Figura 29 ilustra os resultados obtidos em termos das porcentagens de recuperação médias sendo 93,3; 32,2; 51,3 e 35,4 % para FLU, secnidazol, miconazol e tioconazol respectivamente. Isto indica que dentre os análogos testados, miconazol apresentou a maior porcentagem de recuperação e, portanto, alta afinidade com o FLUMIP. Isso sugere a habilidade do MIP de reconhecer outras moléculas do grupo do FLU, sendo, portanto seletivo para essa classe de compostos e não específico para FLU.

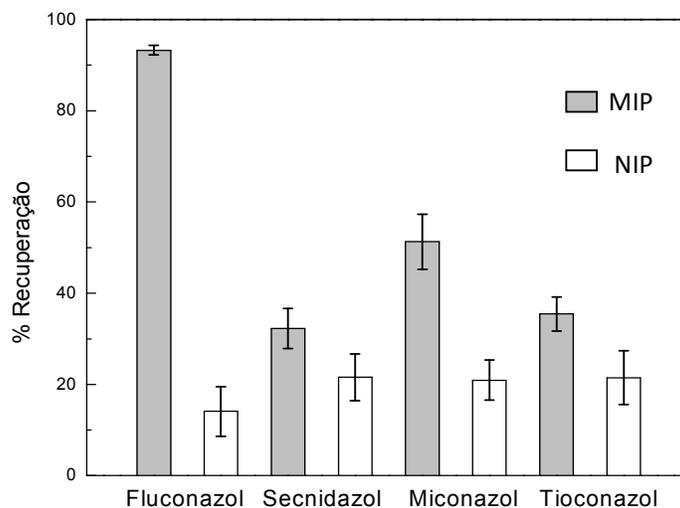


Figura 29: Resultados do estudo de seletividade de FLUMIP comparando dados obtidos pela espectroscopia UV para amostras de fluconazol, secnidazol, miconazol e tioconazol, com seis replicatas.

4.2.8. Comparação com cartucho de SPE com C18

Os cartuchos de SPE comercializados geralmente empregam sorventes convencionais de fase reversa como C18 para a extração de vários analitos a partir de suas respectivas amostras. Por isso, na literatura encontram-se trabalhos de comparação do desempenho de cartuchos de SPE de C18 e de MIPs, como forma indicativa de avaliação, como descrito por GHOLIVAND *et al.* (2010)

Com esse objetivo, massas iguais de FLUMIP e C18 foram empacotadas em cartuchos vazios de SPE. As suas afinidades para o fluconazol foram determinadas, calculando-se a porcentagem de recuperação, obtendo-se os resultados: 51,5; 9,3; 11,0 e 34,5 % para FLU, secnidazol, miconazol e tioconazol foram obtidas respectivamente. Os resultados (ilustrados na Figura 30) mostraram que a porcentagem de recuperação de FLUMIP foi quase duas vezes maior que aquela observada para o cartucho com C18. Esses resultados também indicaram que ambos os sorventes interagiram com os outros análogos em estudo. No entanto, nas condições de SPE aplicadas, ambos foram capazes de interagir de forma seletiva com o analito.

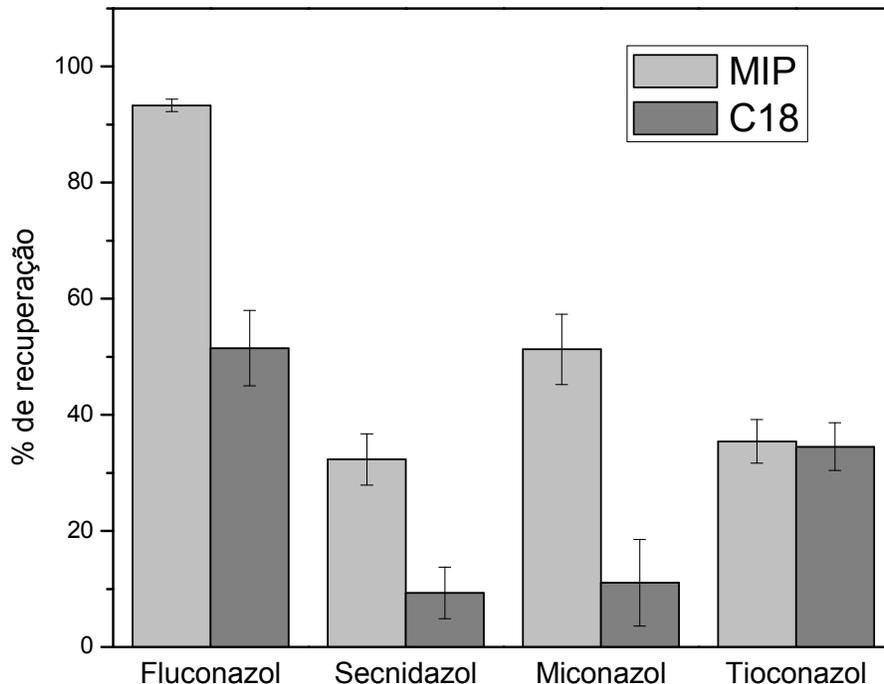


Figura 30: Percentagem de recuperação de FLU, secnidazol, miconazol e tioconazol no cartucho de SPE de C18 e FLUMIP/SPE com seis replicatas, com dados de espectrofotometria com $\lambda = 260$ nm, 310 nm, 235 nm e 204 nm respectivamente.

4.2.9. Conclusão

Foi possível sintetizar FLUMIP por polimerização de precipitação, utilizando ácido metacrílico como monômero funcional e etilenoglicoldimetacrilato como agente reticulador. A estratégia de polimerização, com abordagem não covalente, foi aplicada. O FLUMIP apresentou uma alta capacidade de reter FLU e resultou em uma porcentagem de recuperação 6,6 vezes maior do que o FLUNIP. Essa alta afinidade do FLUMIP pode ser atribuída à impressão molecular eficiente em matriz polimérica, como sugerem as técnicas de SEM e adsorção/dessorção de nitrogênio. O FLUMIP foi aplicado com sucesso para extração de FLU em cápsulas de medicamentos utilizando procedimento MIM/SPE e apresentou a porcentagem de recuperação de 91 % (com desvio padrão relativo = 10 %, em nove replicatas). A quantificação de FLU foi feita por UHPLC-MS, resultando em um limite de detecção muito baixo, menor que $1,63 \times 10^{-10}$ mmol/L.

Também foi observado que o MIP é capaz de interagir não somente com FLU, mas, também, outros compostos de estrutura molecular similar, apresentando porcentagens de recuperação de 32, 51 e 35 % para secnidazol, miconazol e tioconazol respectivamente.

De forma geral, os resultados indicam a potencialidade de aplicação do FLUMIP sintetizado em métodos cromatográficos para identificar e quantificar fluconazol em amostras comerciais de medicamentos.

CAPÍTULO 5: CAFEÍNA

5.1. Parte Experimental

5.1.1. Síntese do polímero híbrido de impressão molecular (HMIP)

Dois tipos de HMIPs foram sintetizados, de acordo com os procedimentos descritos na sequência.

O HMIP1 para a extração de cafeína foi sintetizado em um processo de duas etapas: 1) polimerização e 2) gelificação.

1. 5,50 mL (50,6 mmol) de vinil piridina e 8,00 mL (50,0 mmol) de viniltrimetoxissilano (VTMOS) foram misturados com 0,0250 g de AIBN como iniciador. A mistura foi aquecida a 80 °C por 2 horas e o copolímero obtido (solução A) foi resfriado à temperatura ambiente.
2. 8,00 mL (36,0 mmol) de tetraetoxissilano (TEOS) e 0,2532 g (1,30 mmol) de cafeína foram adicionados em 4,00 mL de tetrahidrofurano e 2,50 mL de solução aquosa de HCl 5 % m/v. Esta solução foi então misturada com a solução “A” e aquecida a 50 °C por 72 horas. O produto obtido foi um ORMOSIL contendo cafeína, que foi removida por lavagem com etanol:água:ácido acético 80:10:10 v/v/v. O HNIP1 (polímero híbrido não impresso) foi preparado da mesma forma, sem o uso de cafeína, a fim de comparar com o desempenho do HMIP1.

O HMIP2 também foi sintetizado seguindo um processo de duas etapas: 1) polimerização e 2) gelificação.

1. 4,15 mL (45,0 mmol) de acetato de vinila e 1,20 mL de 3-(trimetoxissilil) propil metacrilato (TMSPM) (5,00 mmol) foram misturados com 10 mL de THF e 0,0252 g de AIBN como iniciador. A mistura foi aquecida a 60 °C por 24 horas e o copolímero obtido (solução A) foi resfriado à temperatura ambiente.
2. 4,00 mL (18,0 mmol) de tetraetoxissilano e 0,1521 g (0,780mmol) de cafeína foram adicionados em 6,00 mL de tetrahidrofurano e 1,00 mL de solução aquosa de HCl 5% m/v. Esta solução foi então misturada com a solução “A” e aquecida a 50 ° C por 96 horas. O produto obtido foi um gel contendo cafeína, que foi removida por lavagem com etanol: água: ácido acético 80:10:10 v/v/v. O HNIP2 foi preparado da mesma forma, sem o uso de cafeína, a fim de comparar com o desempenho do HMIP2. Ambos os

polímeros (HMIP2 e HNIP2) foram “capeados” utilizando 5,00 mL (39,0 mmol) de clorotrimetilsilano à temperatura ambiente por 24 horas.

5.1.2. Caracterização

Os produtos HMIP1 e HMIP2 foram caracterizados utilizando-se as seguintes técnicas:

- Microscopia eletrônica de varredura
Amostra em pó, em porta amostras de cobre, metalizada com ouro.

- Adsorção/dessorção de nitrogênio

As amostras foram pré-aquecidas a 120 °C sob vácuo e as isotermas de adsorção de nitrogênio foram determinadas a -196 °C.

- Espectroscopia no Infravermelho

Espectros em pastilha de KBr foram obtidos na faixa de 4000 a 700 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

- ^{29}Si MAS NMR no estado sólido

Tempo de contato= 5000 μs com intervalos = 5 s, 1024 varreduras.

O HMIP2 também foi caracterizado pelas técnicas de ^{13}C NMR e TGA.

5.1.3. Análise por HPLC

A fase móvel consistiu de metanol e ácido acético (pH 3) 70:30 v/v para análise dos extratos obtidos por HMIP1 e HNIP1 e 80:20 v/v para os extratos obtidos por HMIP2 e HNIP2, com vazão de 1,00 mL/min. A coluna C18 foi lavada com a fase móvel até que uma linha de base fosse obtida e as análises cromatográficas foram feitas com detecção em 274 nm.

5.1.4. Aplicações

Ambos os polímeros (HMIP1 e HMIP2) sintetizados foram testados como sorventes em cartuchos de extração em fase sólida (SPE). O cartucho de HMIP1 foi preparado colocando um disco de Teflon[®] no fundo do cartucho de polipropileno vazio, seguido de empacotamento a seco com 1,0013 g de HMIP1. Depois, outro disco de Teflon[®] foi colocado sobre o sorvente empacotado. Antes do uso, o cartucho foi lavado várias vezes com água deionizada. Analogamente, outro

cartucho contendo 1,0005 g de HNIP1 também foi preparado para referência. Os cartuchos foram condicionados com 5,00 mL de acetonitrila e 5,00 mL de água.

Cartuchos de HMIP2 e HNIP2 foram preparados analogamente com 0,2000 g de sorvente, condicionados com 2,00 mL de metanol e 2,00 mL de água deionizada.

A habilidade dos polímeros híbridos de reter cafeína seletivamente foi determinada percolando-se extrato de café preparado aquecendo 0,0310 g de pó de café em 20,0 mL de água deionizada a 100 °C por 3 minutos, seguindo-se filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo. O procedimento para HMIP1 consistiu em percolar 2,000 mL de cada amostra em cada cartucho (HMIP1 e HNIP1), seguindo-se lavagem com 5 mL de água deionizada. Subsequentemente, o analito foi eluído com 2,000 mL de acetonitrila como solvente de eluição.

O mesmo procedimento foi utilizado para a extração de cafeína no cartucho comercial de SPE C18 para fins de comparação.

Com HMIP2/SPE, percolou-se 1,000 mL da amostra; a lavagem foi feita utilizando 1,000 mL de água e a eluição foi garantida usando 1,000 mL de metanol. A solução obtida foi analisada por HPLC, com detecção UV.

5.1.5. Estudos de seletividade

Também foi investigada a habilidade de HMIP2 de interagir com cafeína na presença da teobromina e teofilina. Uma solução contendo uma mistura equimolar 0,500 mmol/L de cada um dos três compostos foi preparada misturando-as em conjunto. Em seguida, percolou-se essa solução em um cartucho de HMIP2/SPE e o eluato obtido foi analisado por HPLC. Além disso, soluções padrão dos três compostos foram injetadas no HPLC separadamente para determinar o tempo de retenção de cada composto. Trabalhou-se com seis replicatas.

5.1.6. Figuras de mérito

Para a construção da curva analítica, as soluções de cafeína na faixa de 0,128 a 0,640 mmol/L foram percoladas pelo cartucho de HMIP2/SPE e os eluatos obtidos foram analisados por HPLC. A curva analítica foi obtida a partir da construção do gráfico com as áreas dos picos em função da concentração de cafeína nos eluatos.

O limite de detecção foi determinado a partir da razão sinal:ruído. Para isso, soluções padrão de cafeína nas concentrações $5,15 \times 10^{-4}$; $2,57 \times 10^{-3}$ e $5,15 \times 10^{-3}$ mmol/L foram percoladas no cartucho de HMIP2/SPE. Os eluatos foram analisados por HPLC e a relação sinal-ruído foi medida em cada cromatograma.

5.2. Resultados e discussão

O HMIP1 foi obtido na forma de monólito, que foi triturado e tamisado para ser utilizado em cartuchos de SPE. Um esquema de síntese é apresentado na Figura 31, com proposta de estrutura molecular do produto.

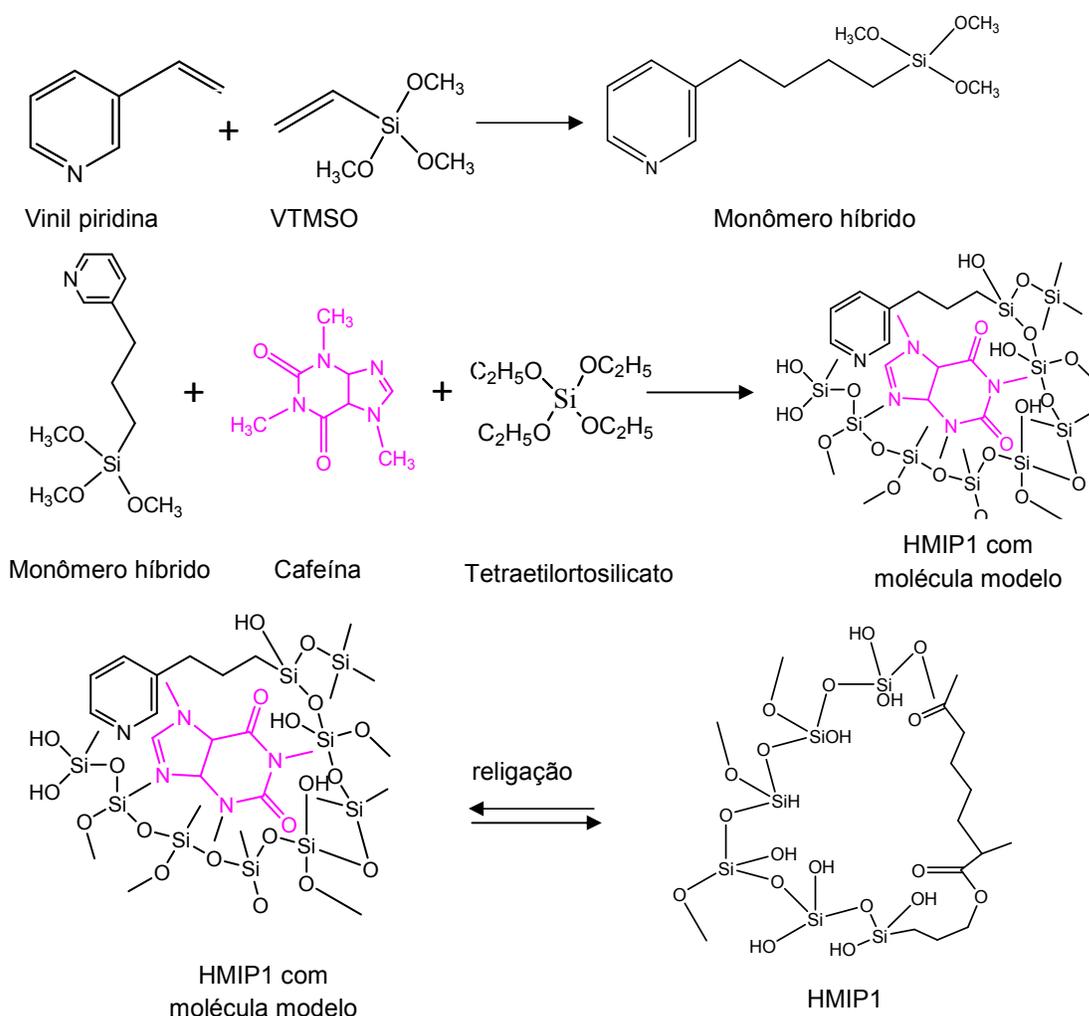
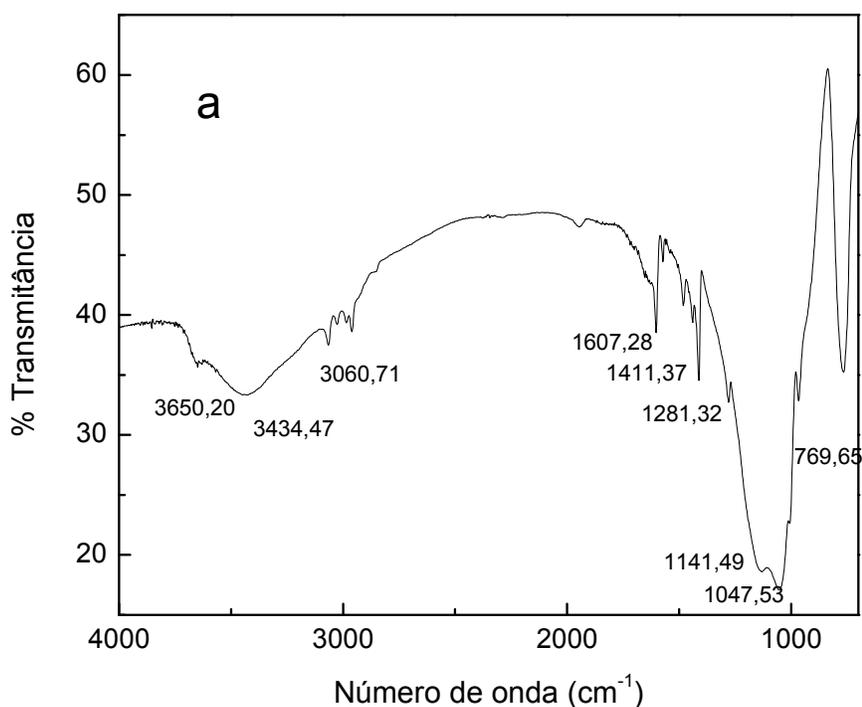


Figura 31: Esquema de síntese de HMIP1, com proposta de estrutura molecular.

5.2.1. Espectroscopia no Infravermelho de HMIP1 e HNIP1

Os espectros (Figura 32) obtidos por HMIP1 e HNIP1 apresentaram o mesmo perfil e, portanto, estrutura química similar. O sinal para -OH foi observado em 3434cm^{-1} . As bandas em 3060 e 3070cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento terminal de CH vinílico e em 1411cm^{-1} para sua deformação, enquanto que a banda em 2958cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da metila. A síntese de polímeros híbridos envolveu o uso de vinil piridina, o que resultou nos sinais de absorção a 1607cm^{-1} e 1281cm^{-1} devido ao estiramento conjugado C=C-C do anel aromático e CN de aminas aromáticas secundárias, respectivamente. Outro sinal proeminente foi observado a 1047cm^{-1} , e é geralmente o resultado de ligações de Si-O-Si.



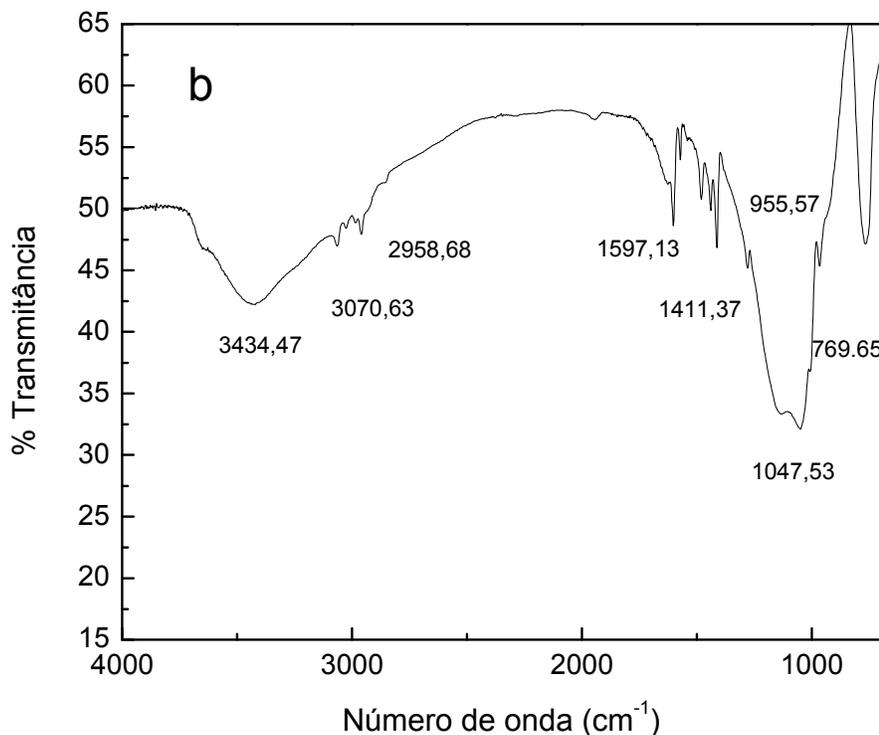


Figura 32: Espectros no infravermelho de a) HMIP1 e b) HNIP1.

5.2.2. Espectros de ²⁹Si NMR para HMIP1 e HNIP1

O uso de vinilpiridina e viniltrimetoxissilano como monômeros resultou na formação de um líquido viscoso que, quando tratado com TEOS, formou o polímero híbrido (HMIP1) altamente reticulado, o que pode ser observado pelos espectros de ²⁹Si NMR apresentados na Figura 33.

Os sinais correspondentes aos picos T2 [$\equiv\text{Si}(\text{OR})\text{R}'$], T3 [$\equiv\text{Si}-\text{R}'$], Q3 [$\equiv\text{Si}-\text{OH}$] e Q4 [$\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$] são observados tanto no espectro de HMIP1 e de HNIP1 indicando que os dois sistemas apresentam graus de reticulação similares. A maior intensidade dos sinais atribuíveis a T² e T³ é compatível com a maior quantidade de VTMOs empregado em relação a TEOS, na proporção 4:3 e, também, com a maior flexibilidade dos grupos aos quais estão associados. A diferença de propriedades químicas de ambos os polímeros e o processo de retenção do analito pelo HMIP devem ser devido a interações físicas.

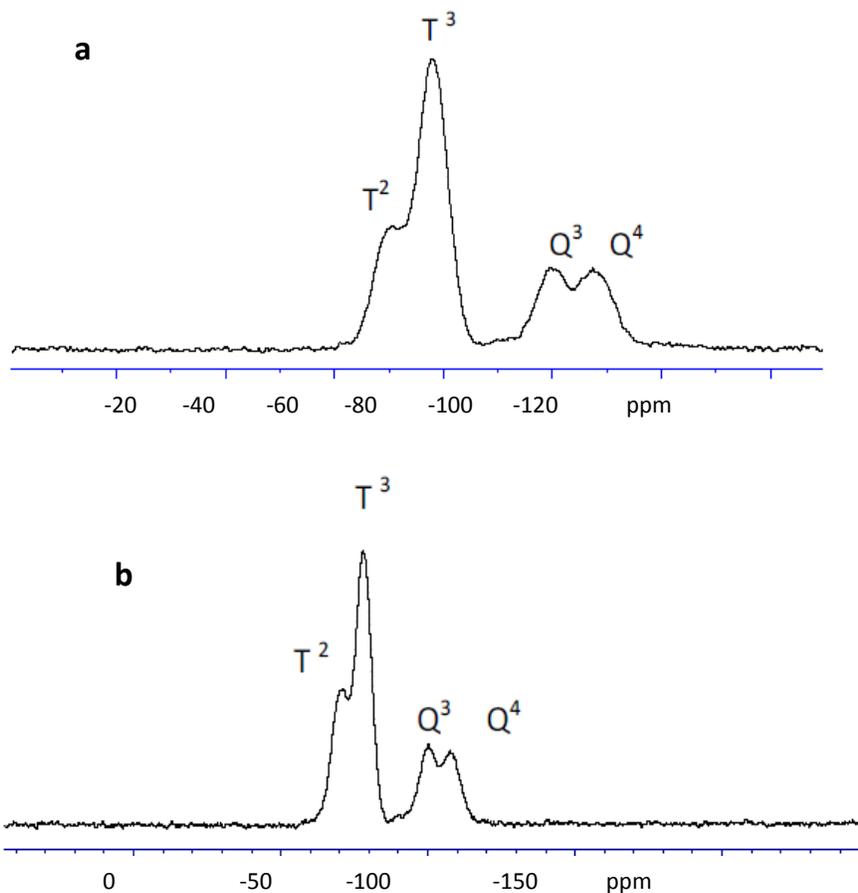


Figura 33: Espectros de ^{29}Si NMR de a) HMIP1 e b) HNIP1

5.2.3. Adsorção/desorção de nitrogênio e SEM de HMIP1 e HNIP1

Foi observado pelos resultados obtidos por ^{29}Si NMR que os polímeros híbridos apresentaram reticulação elevada, portanto, um tamanho de poro muito pequeno era esperado. A fim de determinar as propriedades texturais de polímeros como área superficial, tamanho de poro e volume de poros, o estudo de adsorção/dessorção de nitrogênio foi feito. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 4, confirmando o que era esperado.

Tabela 4: Área superficial, volume e tamanho de poros do HMIP1 e HNIP1.

	HMIP1	HNIP1
Área superficial (m^2/g)	3	3
Volume de poros (cm^3/g)	$\ll 1$	$\ll 1$
Tamanho de poros (Å)	23	18

As imagens de SEM do HMIP1 e HNIP1 são apresentados na Figura 34.

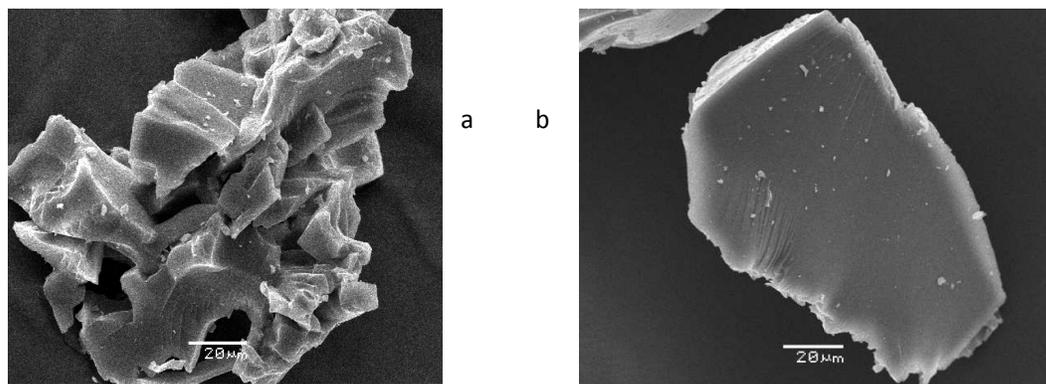


Figura 34: SEM de a) HMIP1 e b) HNIP1.

A comparação visual das imagens aponta diferença significativa na aparência física entre HMIP1 e HNIP1, sugerindo morfologias distintas, provavelmente associadas a diferentes propriedades de interação como sorvente.

Avaliou-se o procedimento de extração em fase sólida com o polímero molecularmente impresso para demonstrar o potencial de HMIP1 em extração seletiva *off-line* de cafeína nas amostras de extrato de café. O cromatograma de uma amostra de extrato de café injetado na coluna de HPLC após filtração com filtro millipore 0,45 μm , sem purificação em cartucho do HMIP1, foi obtido e é apresentado na Figura 35, na qual o pico em 2,9 min indica a presença de cafeína.

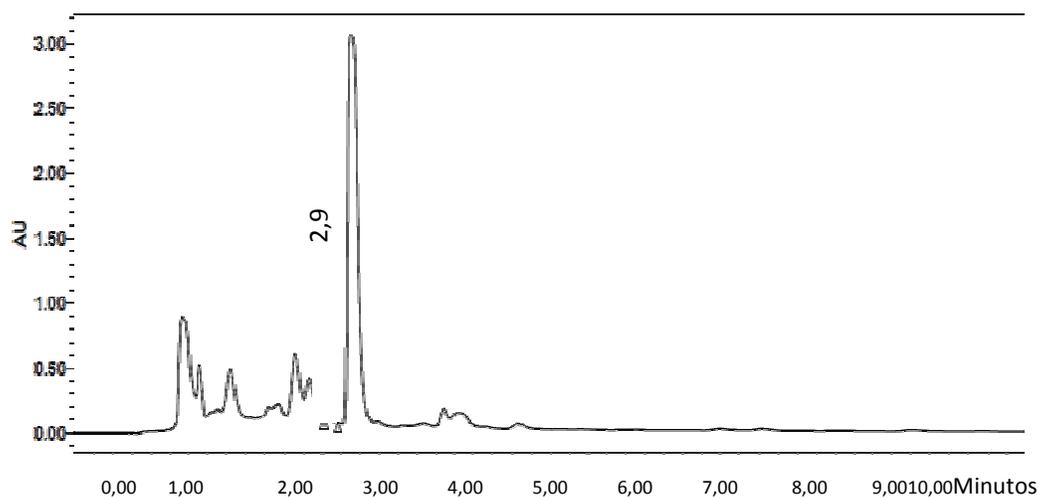


Figura 35: Cromatograma de HPLC de amostra de extrato de café, usando coluna C18 sem procedimento *off-line* HMIP1/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v, detecção em 274 nm.

Após a eluição da amostra no cartucho SPE contendo HMIP1, a cafeína foi retida em maior quantidade em comparação aos outros componentes do café, como pode ser notado pelo cromatograma apresentado na Figura 36. O pico em 2,66 min corresponde à cafeína.

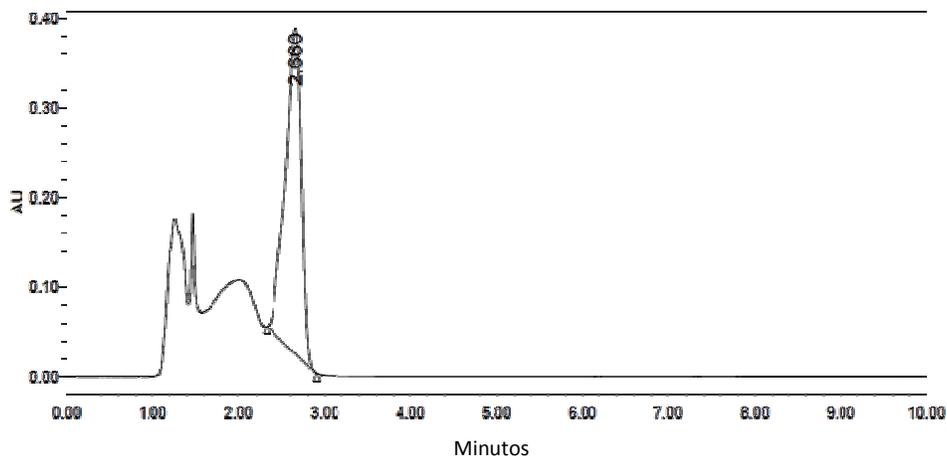


Figura 36: Cromatograma de HPLC de extrato de café eluído em acetonitrila, após procedimento *off-line* com HMIP1/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v, detecção em 274 nm.

O cromatograma do eluato obtido do HMIP1 não indicou retenção significativa de cafeína, como pode ser observado na Figura 37.

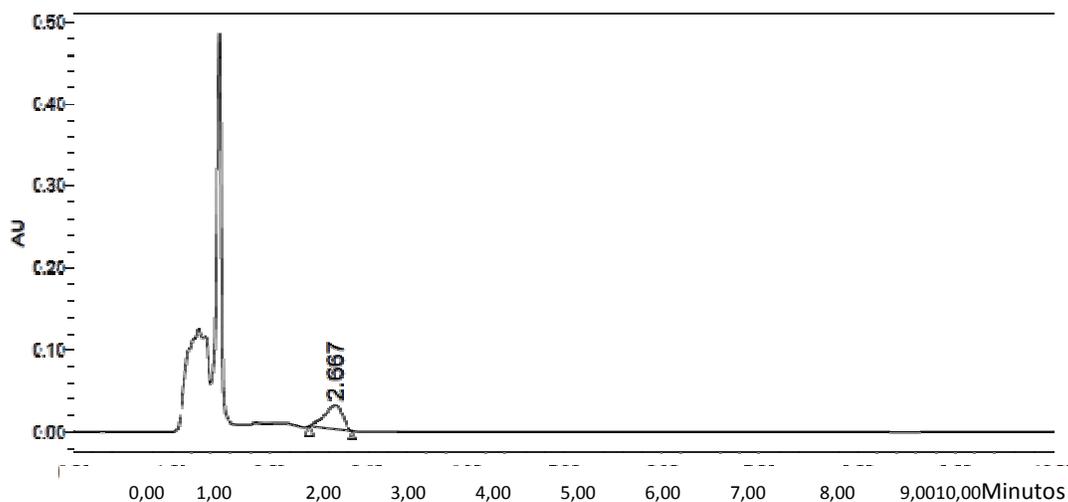


Figura 37: Cromatograma de HPLC de extrato de café eluído em acetonitrila, após procedimento *off-line* com HMIP1/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v, detecção em 274 nm.

5.2.4. Comparação com coluna comercial de C18

O desempenho do HMIP1 também foi comparado com cartucho comercial de C18 em aplicação de SPE. Na Figura 38, são apresentados os cromatogramas de HPLC dos extratos de café após procedimento após SPE pelo cartucho contendo HMIP1 e pelo cartucho comercial de C18, nos quais o perfil dos picos indica a presença de interferentes. Isto sugeriu que não houve diferença em termos de seletividade dos sorventes e indicou que o uso de HMIP1 não representa vantagem com relação ao uso da coluna comercial C18.

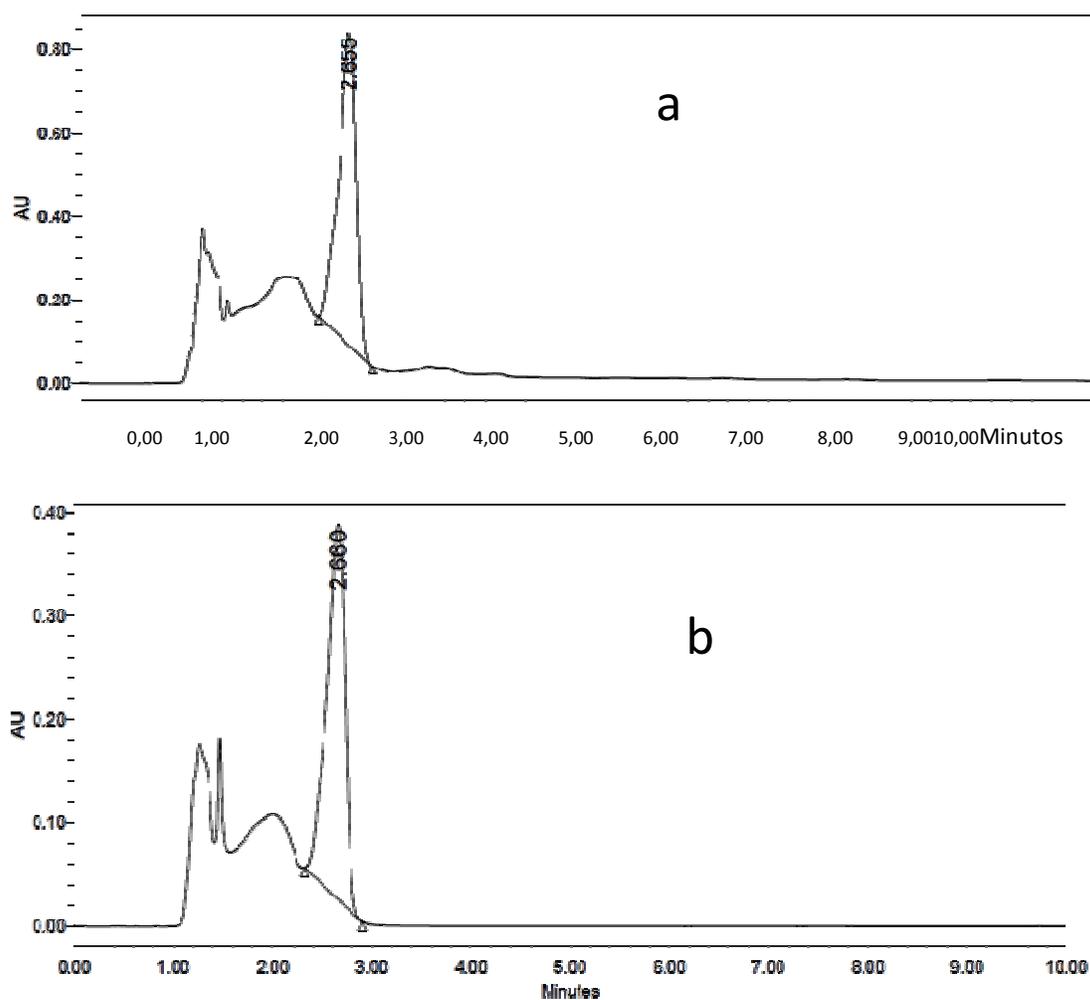


Figura 38: Cromatogramas de HPLC de extrato de café eluído em acetonitrila, após procedimento SPE *off-line* com a) cartucho de C18 e b) de HMIP1. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 70:30 v/v; detecção: 274 nm.

Embora o HMIP1 sintetizado tenha mostrado afinidade para a cafeína, não permitiu extraí-la seletivamente em SPE e, portanto, outros componentes

interferentes também foram retidos, como pode ser observado a partir da Figura 36. Por isso, buscou-se modificar as propriedades do HMIP com alteração dos reagentes de partida, utilizando-se acetato de vinila e 3-(trimetoxisilil) propilmetacrilato (TMSPM) como monômero e TEOS como formador de estrutura. Obteve-se assim um novo polímero identificado como HMIP2. Também foi sintetizado um novo polímero híbrido não impresso, HNIP2.

Foi realizada a síntese de monômero híbrido pela polimerização térmica, seguindo a reação com TEOS na presença da molécula modelo (cafeína) e obteve-se um ORMOSIL monolítico, conforme esquematizado na Figura 39.

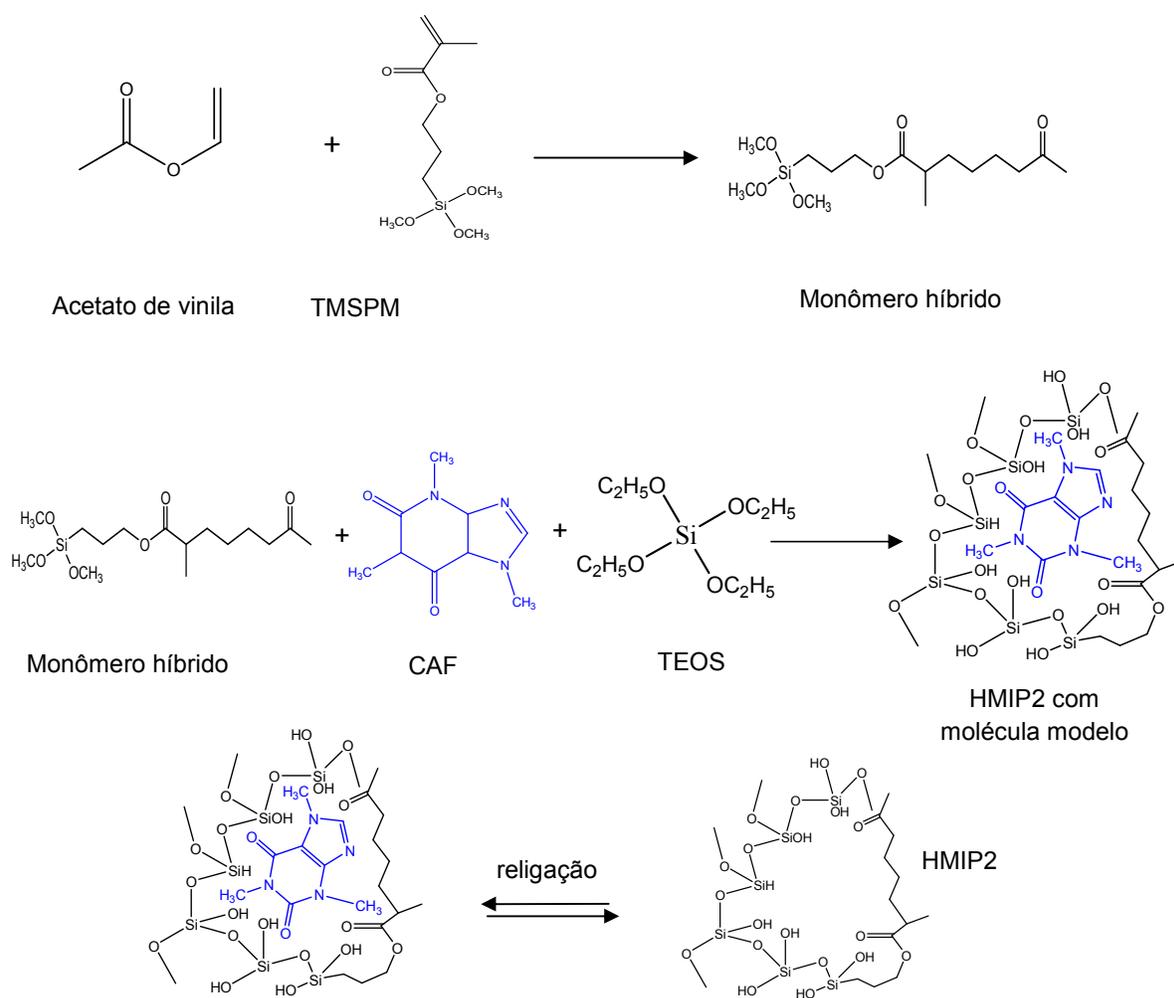


Figura 39 : Esquema de síntese de HMIP2 com proposta de estrutura molecular

5.2.5. Adsorção/dessorção de nitrogênio e SEM de HMIP2 e HNIP2

A análise da superfície dos materiais sintetizados foi feita usando SEM, apresentadas na Figura 40. Nas imagens pode ser notada a diferença morfológica entre os polímeros híbridos. Além disso, o HMIP2 apresentou maior área superficial e volume dos poros em comparação ao HNIP2, conforme indicam os dados da Tabela 5.

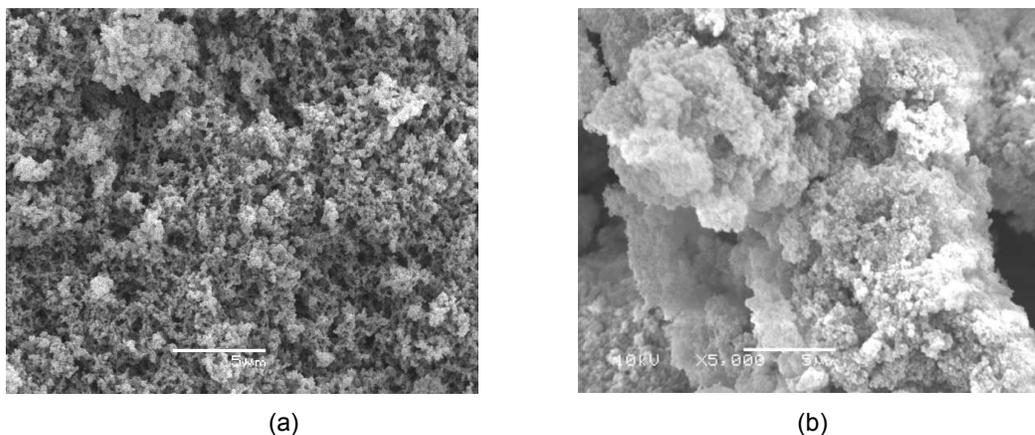


Figura 40: SEM de a) HMIP2 e b) HNIP2.

Tabela 5: Área superficial, volume e tamanho de poros do HMIP2 e HNIP2.

	HMIP2	HNIP2
Área superficial (m²/g)	42,6	22,2
Volume de poros (cm³/g)	0,08	0,05
Tamanho de poros (Å)	8,0	9,6

5.2.6. Espectroscopia no Infravermelho de HMIP2 e HNIP2

Os espectros de IR de HMIP2 e HNIP2 estão apresentados na Figura 41. Uma banda bastante larga pode ser observada em 3414 cm⁻¹, correspondente ao grupo-OH, que pode ser devida a água residual e grupos não condensados de silanol. O estiramento metila assimétrica e simétrica ocorreu em 2958 cm⁻¹, enquanto o sinal de 1737 cm⁻¹ pode ser atribuído a C=O de éster. Outra banda característica observada nos espectros aparece em 1075 cm⁻¹, devido ao estiramento de ligação de Si-O-Si. A semelhança das características espectrais de HMIP2 e HNIP2 sugere que os géis possuem a mesma estrutura química e que a presença da molécula modelo não gerou alterações químicas.

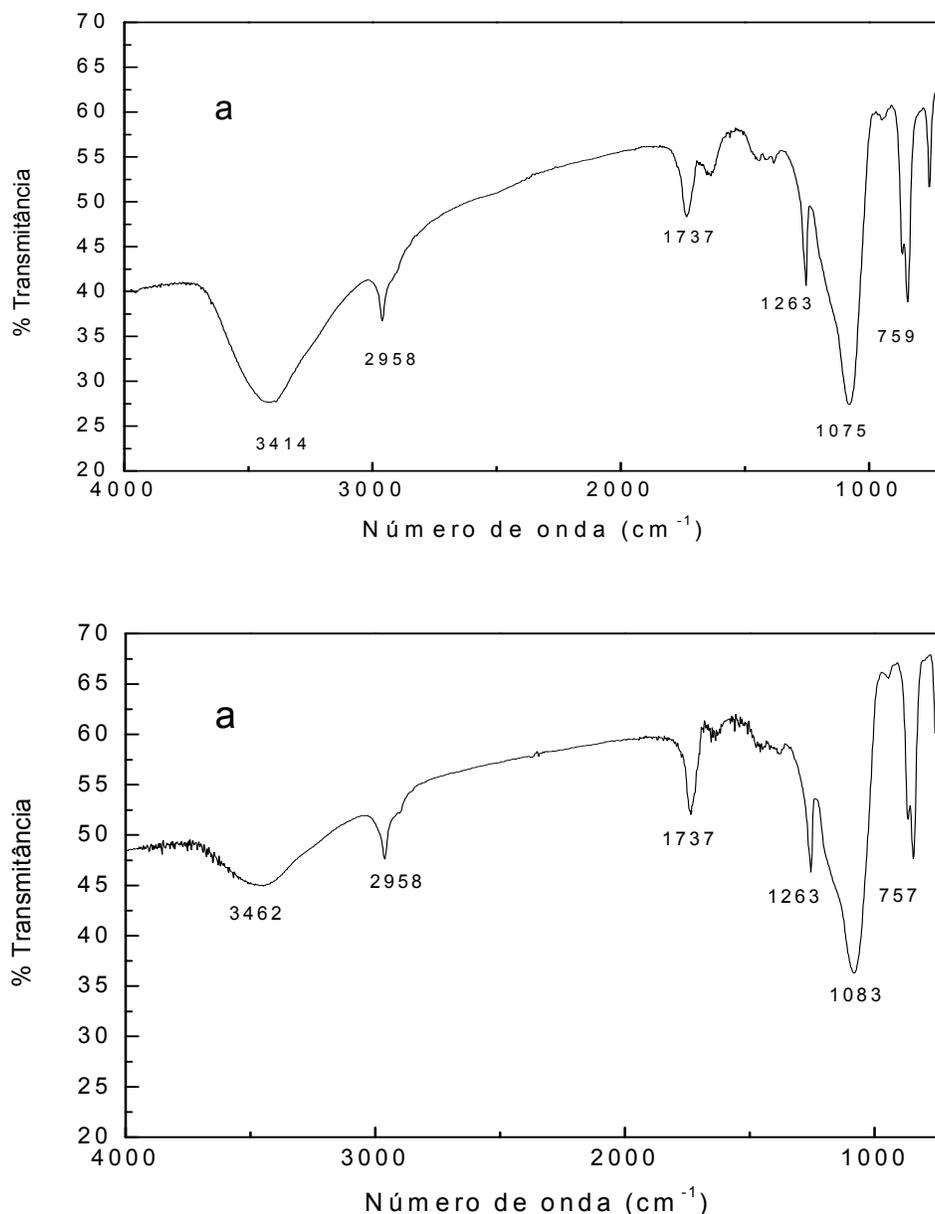


Figura 41: Espectros no infravermelho de a) HMIP2 e b) HNIP2.

5.2.7. Espectros de ^{29}Si NMR de HMIP2 e HNIP2

A espectroscopia de ^{29}Si NMR é uma ferramenta muito útil para a caracterização química dos polímeros híbridos e foi aplicada para obter informação sobre a extensão de condensação durante o processo sol-gel. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 42.

Os sinais observados corresponderam aos picos T1 [$-\text{Si}(\text{OR})_2\text{R}'$], T2 [$=\text{Si}(\text{OR})\text{R}'$], Q3 [$\text{Si}-\text{OH}$] e Q4 [$\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$] tanto no espectro de HMIP e de HNIP,

uma vez que ambos foram sintetizados utilizando as mesmas condições de reação, na presença ou ausência de moléculas modelos. No entanto, pode ser constatado um deslocamento destes em relação aos valores apresentados na literatura, (COSTA, 2012), o que pode ser o resultado de diferentes ambientes químicos das amostras resultantes da inserção de cadeias alquilas na estrutura do silicato.

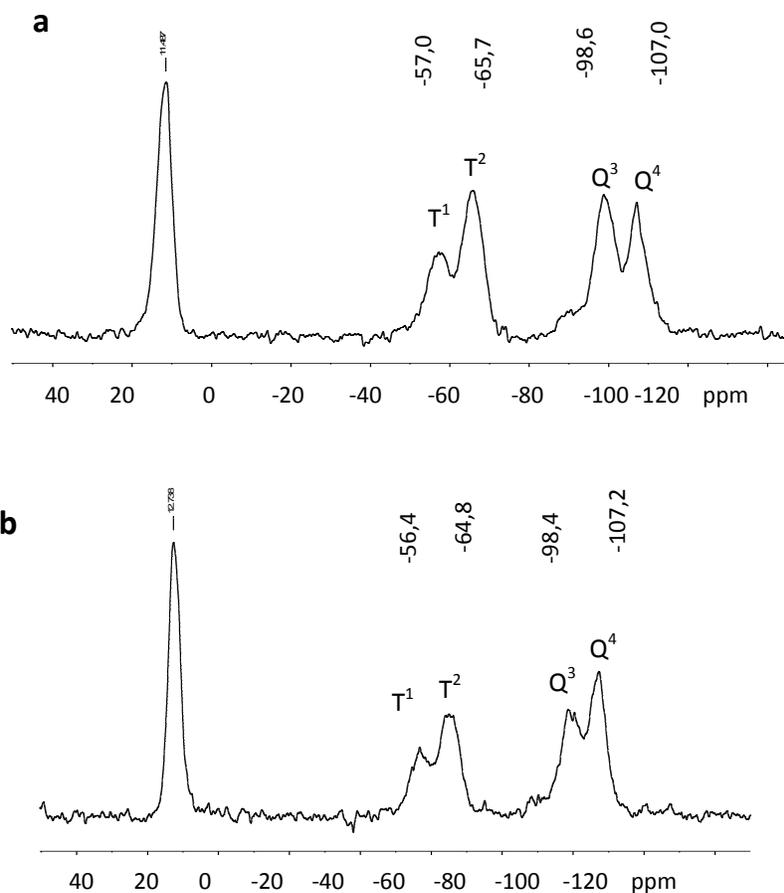


Figura 42: Espectros de ^{29}Si NMR de a) HMIP2 e b) HNIP2.

5.2.8. Espectroscopia de ^{13}C NMR de HMIP2 e HNIP2

Espectros de ^{13}C NMR apresentados na Figura 43 foram utilizados como ferramenta para estudar a estrutura da cadeia carbônica e comparar similaridades estruturais entre HMIP2 e HNIP2.

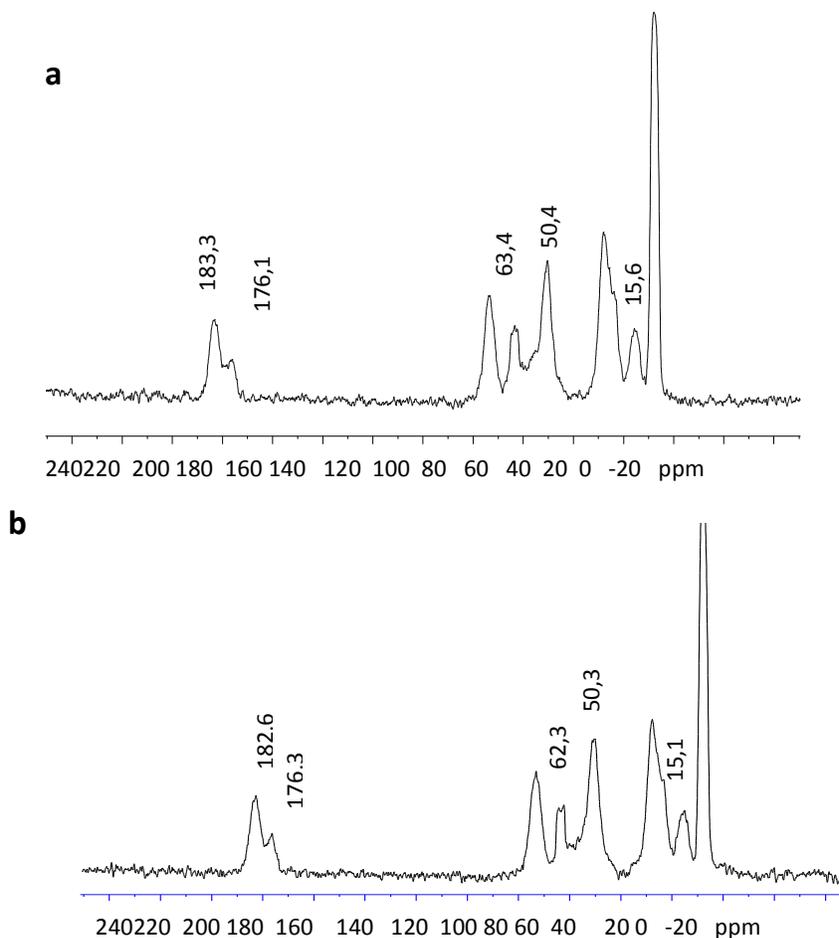


Figura 43: Espectros de ^{13}C NMR de a) HMIP2 e b) HNIP2.

Os sinais observados em 176 e 183 ppm, em ambos os espectros, podem ser atribuídos aos grupos carbonila do polímero híbrido, provavelmente oriundos dos dois monômeros (acetato de vinila e TMSPM). Nestes espectros, os sinais do grupo metoxil foram observados em 51 ppm. Isto sugere que alguns dos grupos metoxi de TMSPM não foram hidrolisados. Os sinais próximos a 16 e 60 ppm podem ser o resultado dos grupos etoxi que permaneceram em polímeros híbridos.

5.2.9. Termogravimetria de HMIP2 e HNIP2

Pode ser observado pelas curvas TG apresentadas na Figura 44 que os polímeros híbridos apresentaram uma boa estabilidade térmica na temperatura menor que a 280 °C.

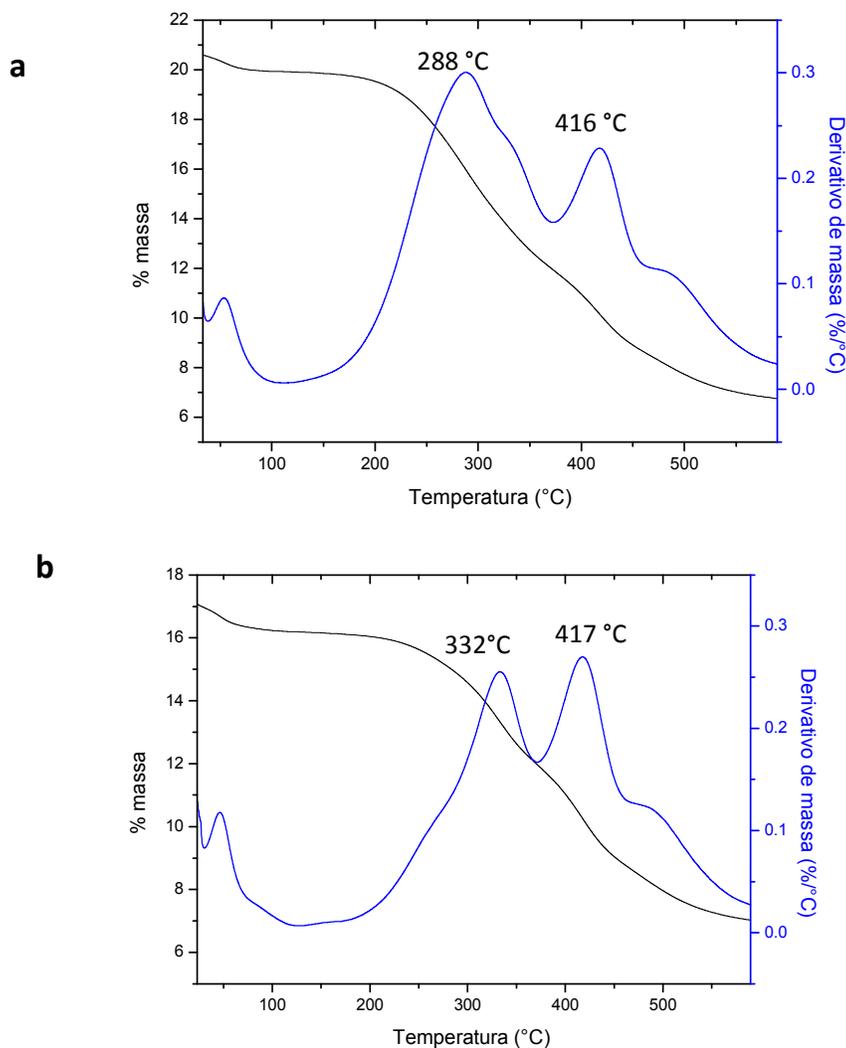


Figura 44: Curvas TG/DTG de a) HMIP2 e b) HNIP2. Em azul: a derivada da curva original.

5.2.10. Aplicação analítica

A habilidade de HMIP2 de extrair cafeína das amostras de extrato de café foi avaliada. O HMIP2 apresentou melhor seletividade em comparação ao HMIP1, conforme indicam os resultados ilustrados nas Figuras 45 a 47.

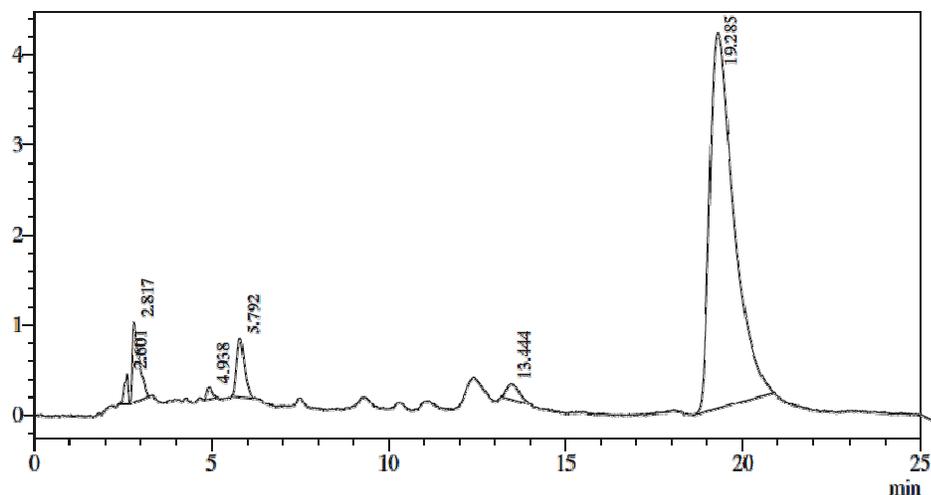


Figura 45: Cromatograma de HPLC de amostra do extrato de café na coluna C18 de HPLC sem procedimento *off-line* HMIP2/SPE. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm.

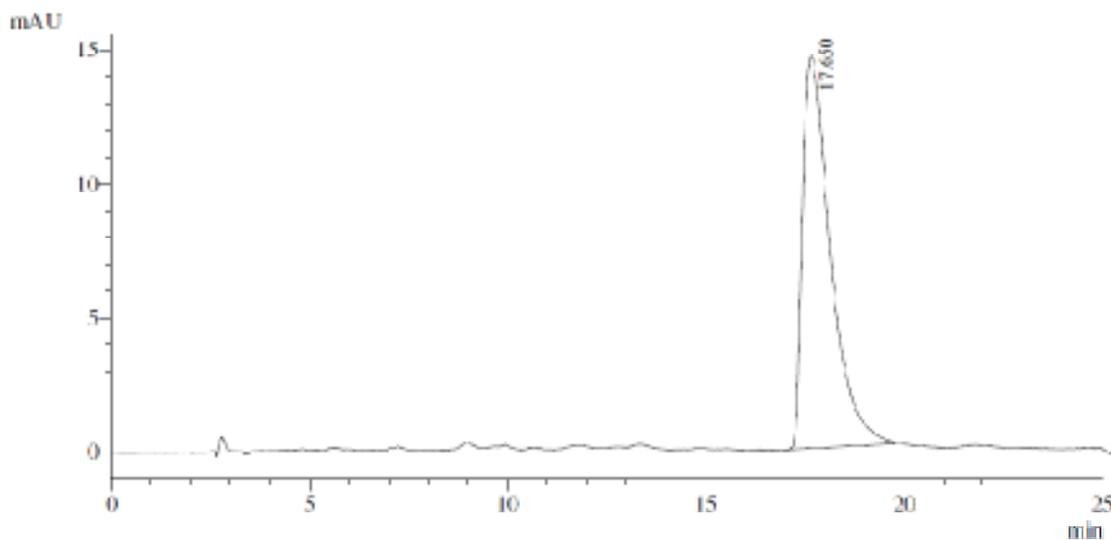


Figura 46: Cromatograma de extrato de café eluído em metanol, após procedimento *off-line* com HMIP2. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm.

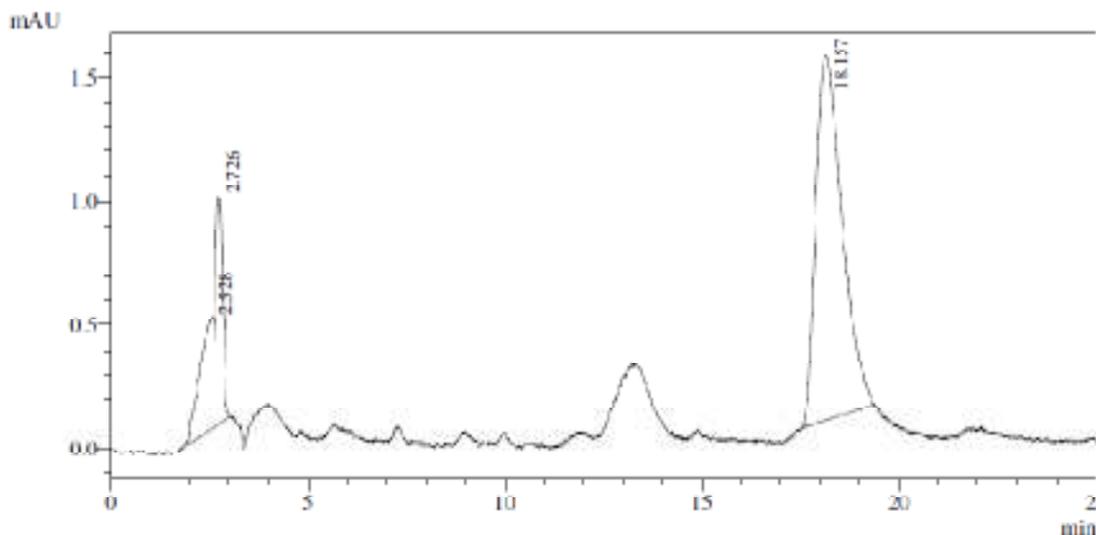


Figura 47: Cromatograma de extrato de café eluído em metanol, após procedimento *off-line* com HMIP2. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm.

A porcentagem de recuperação das amostras foi calculada pela fortificação com padrão de cafeína em três concentrações diferentes. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Porcentagem de recuperação das amostras de café pelo procedimento HMIP2

Concentração adicionada (µg/mL)	recuperação 1 (%)	recuperação 2 (%)	recuperação 3 (%)	Média (%)	Desvio padrão (%)	Desvio padrão relativo (%)
4,0	94,2	85,7	79,7	87,9	4,7	5,4
40	85,5	89,5	85,7			
90	91,2	85,5	94,3			

5.2.11. Estudos de seletividade

Cafeína, teofilina e teobromina têm estruturas moleculares similares como pode ser observado na Figura 48. Portanto, é interessante investigar a capacidade de HMIP2 interagir com cafeína na presença destes compostos.

No teste de competitividade, o eluato da mistura equimolar dos três compostos obtido após o procedimento de SPE com cartucho de HMIP2, foi analisado por HPLC sendo o cromatograma apresentado na Figura 49.

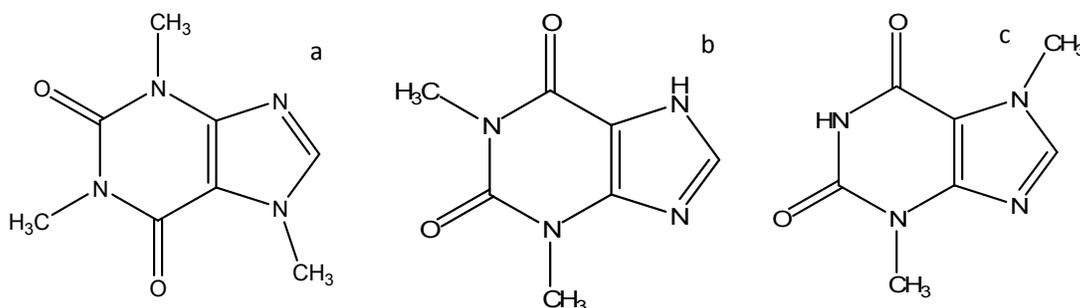


Figura 48: Estruturas moleculares de: a) cafeína, b) teofilina e, c) teobromina

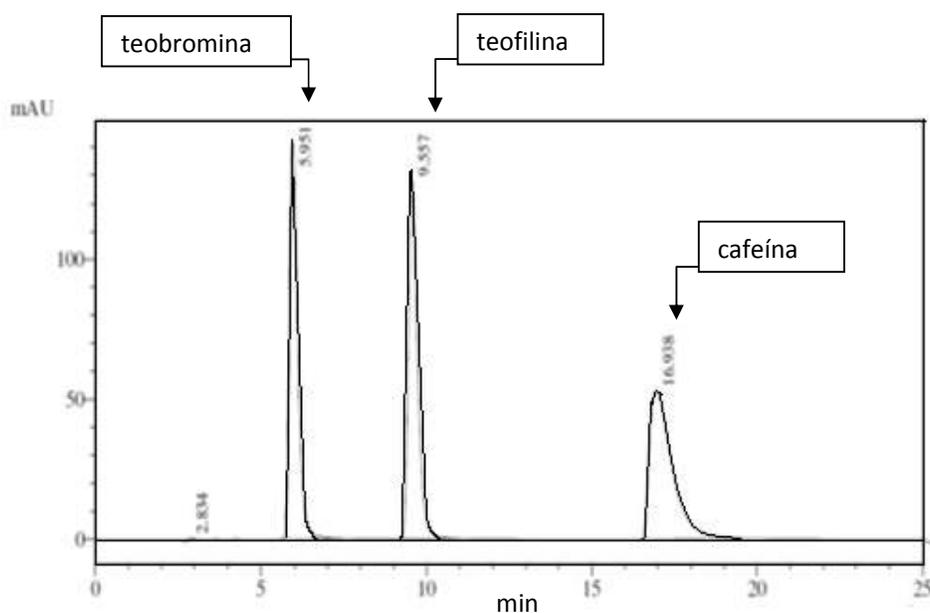


Figura 49: Cromatograma de HPLC do eluato da mistura da teobromina, teofilina e cafeína, após a extração em cartucho HMIP2 para SPE. Os picos em 5,95, 9,55 e 16,93 min representam esses compostos respectivamente. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm.

A partir da área de cada pico do cromatograma apresentado na Figura 49 foram calculadas as quantidades de teobromina, teofilina e cafeína no eluato obtido após procedimento de SPE com HMIP2. Em seguida, a porcentagem de recuperação foi calculada pela relação entre a quantidade eluída e quantidade percolada, de acordo com a Equação 2 (página 66). Foram feitos seis replicatos. Desta maneira, obteve-se a porcentagem de recuperação de $81 \pm 8\%$ para cafeína, $72 \pm 8\%$ para teofilina e $89 \pm 9\%$ para teobromina, o que demonstra a alta afinidade dos três compostos para o HMIP2.

Algumas figuras de mérito do método cromatográfico para determinação de cafeína após extração com cartucho HMIP2/SPE foram calculadas. Foi construída uma curva analítica linear na faixa de 0,118 a 0,610 mmol/L, com coeficiente de regressão linear = 0,997, descrita pela Equação 4, que relaciona a área do pico do cromatograma correspondente à cafeína e a concentração deste analito.

$$\text{Área} = 9,66 \times 10^4 + 2,76 \times 10^6 \times C_{\text{cafeína}} \quad (4)$$

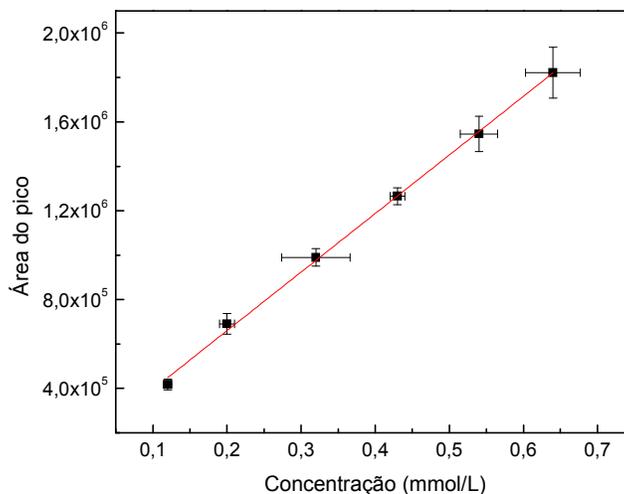


Figura 50: Curva analítica construída na faixa de 0,12 a 0,61 mmol/L (n=3 para cada concentração). Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol e ácido acético (pH= 3) 80:20 v/v, detecção em 274 nm.

O limite de detecção foi calculado de acordo com recomendações de Collins e colaboradores (2004), a partir de relação sinal-ruído 3:1, e resultou em $5,14 \times 10^{-4}$ mmol/L. Considerando a relação sinal-ruído na proporção de 10:1 para estabelecer o limite de quantificação, encontrou-se o valor de $1,71 \times 10^{-3}$ mmol/L.

5.2.12. Conclusão

Como a obtenção de MIMs com alta eficiência e seletividade para aplicações analíticas tornou-se um assunto de intensa pesquisa, sínteses de MIM para cafeína foram estudadas com dois métodos diferentes que resultaram em dois polímeros híbridos distintos: HMIP1 e HMIP2, que foram caracterizados em termos de estrutura e morfologia com resultado de técnicas como ^{13}C NMR, IR, ^{29}Si NMR, TGA, SEM e adsorção / dessorção de nitrogênio.

O uso de diferentes monômeros funcionais na primeira proposta de síntese afetou a seletividade do produto obtido para o analito de interesse. Os resultados indicaram que o uso de acetato de vinila e TMSPM como os monômeros, para obtenção de HMIP2, permitiu sintetizar um produto com desempenho superior em aplicações cromatográficas com amostras de extratos de café. Esta segunda proposta sintética (sol-gel) envolveu condições brandas, indicando sua potencialidade para aplicação com outras moléculas modelos que podem ser degradados durante a polimerização térmica.

Aplicações analíticas de HMIP2 indicaram sua elevada interação com teofilina e teobromina, sugerindo sua adequação para uso como um sorvente grupo seletivo. Numa proposta de quantificação de cafeína por HPLC aplicando MIM/SPE com HMIP2 foi alcançado o limite de detecção = $5,14 \times 10^{-4}$ mmol/L e o limite de quantificação = $1,71 \times 10^{-3}$ mmol/L. A recuperação elevada ($88 \pm 5\%$, $n = 9$) da cafeína de amostras de café analisadas sugerem que HMIP2 pode ser utilizado com sucesso em cartuchos de SPE. Portanto, a proposta de uso de HMIP2 em MIM/SPE pode representar uma importante ferramenta útil para propostas de separação desse analito.

CAPÍTULO 6: ANTOCIANINAS

6.1. Parte Experimental

6.1.1. Síntese de MIP/Rutina

Padrões comerciais de ACYs têm custo muito elevado (da ordem de R\$ 500,00 para cerca de 10 mg) para aquisição em quantidade da ordem necessária para as sínteses de MIPs, em geral pelo menos alguns gramas. Por isso optou-se pela utilização de outro composto como molécula modelo nos estudos para síntese de MIMs para ACYs. A estrutura molecular da rutina (Figura 51) é análoga à de ACYs (estrutura representada na Figura 19, página 32) e a torna adequada como molécula modelo para diversas aplicações (FREITAS *et al.*, 2011) e por isso foi escolhida como molécula modelo para a síntese desses MIMs.

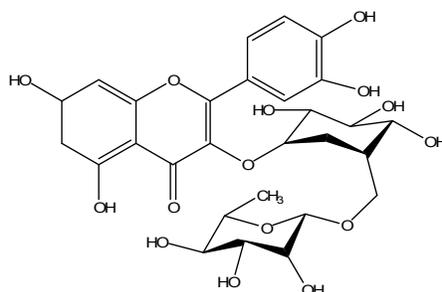


Figura 51: Estrutura molecular de rutina

No artigo de Peng *et al.* (2011) foi descrita a síntese de um MIP utilizando rutina (RUT) como molécula modelo e sua aplicação para a pré-concentração de rutina a partir de amostras de um produto da medicina chinesa tradicional. Partiu-se do procedimento descrito por Peng *et al.* (2011) para sintetizar um polímero impresso com rutina (RUTMIP) a ser testado para extração de ACYs em SPE.

Para preparar o polímero, 0,0120 g de rutina e 0,2031 g de acrilamida foram dissolvidas em 5,000 mL de THF. Em seguida, adicionaram-se 3,500 mL (17,50 mmol) do EGDMA e 0,0100 g de iniciador AIBN. A solução resultante foi purgada com argônio por 5 minutos. A mistura de pré-polimerização foi subsequentemente polimerizada por iniciação térmica a 60 °C por 24 horas. O polímero obtido foi triturado e depois lavado várias vezes com metanol: ácido acético (9:1 v/v) para extração da rutina.

O RUTNIP também foi sintetizado seguindo mesmo procedimento, sem a utilização de molécula modelo. Os polímeros foram obtidos na forma de monolito, então, triturados utilizando pistilo e almofariz. Em seguida, a tamisação foi realizada através de uma peneira de 120 mesh.

6.1.2. Aplicação de RUTMIP para SPE

Testou-se o polímero sintetizado como fase estacionária em cartuchos de SPE. O cartucho contendo RUTMIP foi preparado colocando-se um disco de Teflon® no fundo do cartucho de polipropileno vazio, seguido de empacotamento a seco com 0,2000 g de RUTMIP. Depois, outro disco de Teflon® foi colocado sobre o sorvente. Antes do uso, o cartucho foi condicionado com 5,00 mL de metanol e 5,0 mL de água deionizada. Analogamente, outro cartucho contendo 0,2200 g de RUTNIP também foi preparado e usado como referência.

Inicialmente, os cartuchos foram testados para a capacidade de interação com rutina. Para este propósito, 1,000 mL de 0,08 mmol/L de uma solução de rutina foi percolada através de um cartucho RUTMIP/SPE. Depois, ambos os cartuchos (contendo RUTMIP e RUTNIP) foram lavados com 5,000 mL de metanol e eluídos com 1,000 mL de solução de metanol: ácido acético (9:1 v / v). A quantidade de rutina nos eluatos foi então determinada por HPLC.

Para testar a adequação de RUTMIP para extração de ACYs, foi preparado extrato de ACYs a partir do aquecimento de 30,0 g de cascas de uvas Brasil (*Vitis vinifera L.* 'Brasil') em 90,0 mL de água na temperatura de 50 °C por 30 min, seguindo-se filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo. A habilidade de RUTMIP reter ACYs seletivamente foi determinada percolando-se extrato de ACYs nos cartuchos preparados com RUTMIP e RUTNIP. O procedimento consistiu em percolar 2,000 mL de amostra em cada cartucho, seguindo-se lavagem com 5,000 mL de água deionizada. Posteriormente, o analito foi eluído com 1,000 mL de metanol e levado para análise de HPLC.

6.1.3. Análise por HPLC de Rutina e ACYs

As condições cromatográficas para rutina consistiram em fase móvel de metanol e água (45: 55 v/v), coluna: C18, vazão: 1,00 mL/min. A análise cromatográfica foi feita com detecção em 356 nm.

Para ACYs, a fase móvel consistiu de água: acetonitrila: ácido fórmico (81: 9: 10 v/v/v). A coluna C18 foi lavada com a fase móvel para até que uma linha de base fosse obtida e as medidas foram feitas em 525 nm. A vazão foi fixada em 1,00 mL/min.

6.2. Resultados e discussão

Para avaliar o sucesso de impressão da molécula modelo na matriz polimérica, uma solução padrão de rutina foi utilizada. Os cromatogramas obtidos por HPLC (Figura 52) das amostras dessa solução injetadas após SPE com RUTMIP e RUTNIP, com pico em 8,4 minutos associado à eluição de rutina, foram utilizados para determinar a afinidade de MIP para essa molécula modelo. A comparação das áreas dos dois picos obtidos mostraram que a capacidade de RUTMIP reter rutina foi 12 vezes superior ao RUTNIP, como pode ser notado na Figura 52.

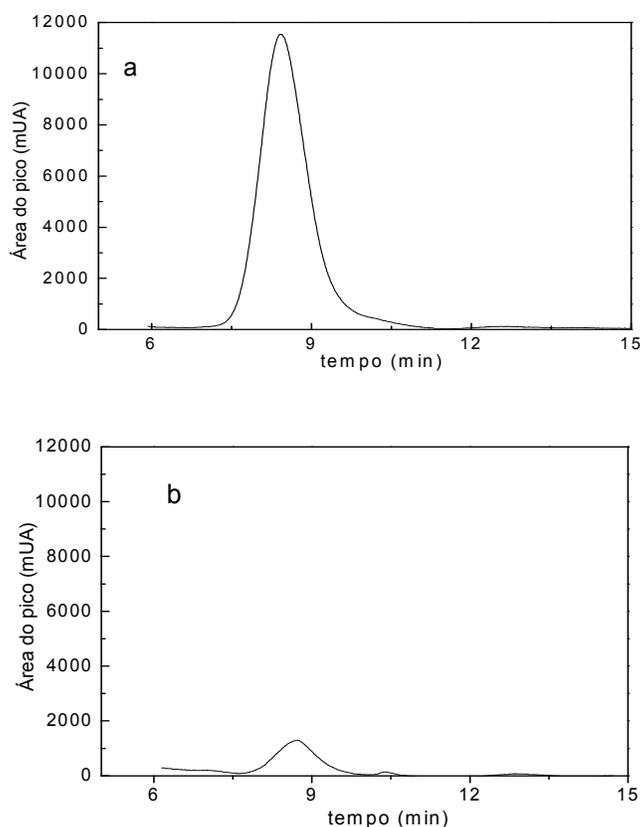


Figura 52: Cromatogramas de solução de rutina 0,08 mmol/L após procedimento *off-line* de SPE com a) RUTMIP e b) RUTNIP. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: metanol: água (45: 55 v/v), detecção em 356 nm.

Na sequência avaliou-se a potencialidade de RUTMIP para SPE de ACYs. Foram utilizados os cartuchos empacotados com RUTMIP e RUTNIP. Inicialmente, uma amostra de extrato de ACYs de uva Brasil foi injetada na coluna de HPLC sem purificação prévia, apenas com filtração em filtro milipore 0,45 μm (após filtração),

sendo o cromatograma obtido apresentado na Figura 53. Depois, amostras do mesmo extrato foram percoladas pelos cartuchos de RUTMIP e RUTNIP, eluídas usando metanol e, então, analisadas em cromatógrafo a líquido, tendo gerado os cromatogramas apresentados nas Figuras 54 e 55. Os resultados obtidos sugerem que o RUTMIP não foi eficiente para separar ACYs seletivamente do extrato. É provável que a retenção tenha decorrido apenas em função de interações não específicas, uma vez que o NIP apresentou mesmo comportamento para ACYs.

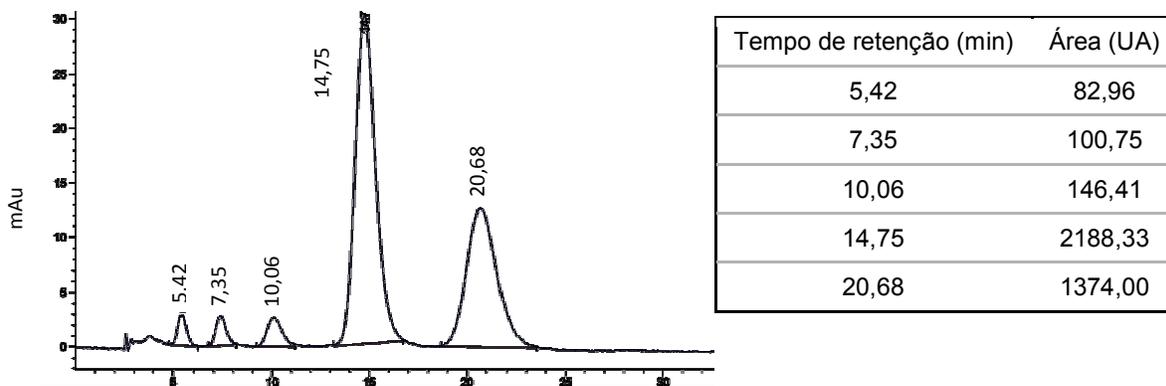


Figura 53: Cromatograma de extrato de ACYs de uva Brasil, injetado diretamente na coluna C18 de HPLC. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água: acetonitrila: ácido fórmico (81: 9: 10 v/v/v), detecção em 525 nm.

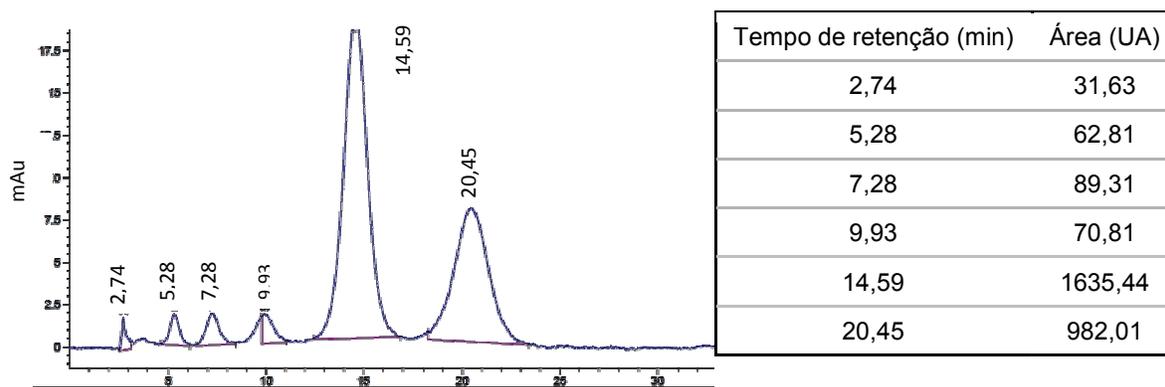


Figura 54: Cromatograma de extrato de ACYs de uva Brasil eluído em metanol após SPE com RUTMIP. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água: acetonitrila: ácido fórmico (81:9:10 v/v/v), detecção em 525 nm.

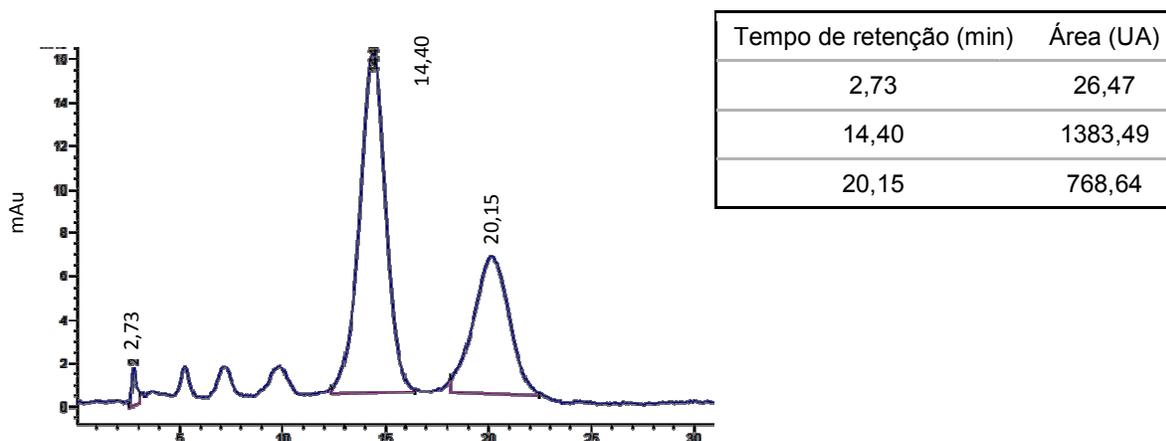


Figura 55: Cromatograma de extrato de ACYs de uva Brasil eluído em metanol após SP com RUTNIP. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água: acetonitrila: ácido fórmico (81: 9: 10 v/v/v), detecção em 525 nm.

6.3. Conclusão

Devido à elevada facilidade de degradação de ACYs e a dificuldade financeira para aquisição de padrões, não foi possível utilizá-las como molécula modelo em procedimento de síntese de MIM. Portanto, a utilização de rutina, tendo estrutura molecular similar às ACYs, como molécula modelo parecia ser uma alternativa interessante. Os resultados iniciais do desempenho de RUTMIP para SPE confirmaram o sucesso da impressão molecular, apresentando retenção de rutina 12 vezes maior para RUTMIP em comparação ao RUTNIP e eram promissores e encorajaram o teste de RUTMIP para a extração seletiva de ACYs em extratos vegetais. Porém a utilização de RUTMIP para SPE de ACYs a partir de extratos de ACYs não indicou seletividade do polímero para esses compostos, apontando sua inadequação em termos de potencial para a aplicação desejada. Isto indica que ainda são necessários estudos com outras moléculas análogas às ACYs para serem utilizadas como moléculas modelo para síntese de MIMs seletivos para ACYs, enquanto não for acessível adquirir padrões comerciais em quantidades suficientes para testes de novas propostas de síntese.

CAPÍTULO 7: CONCLUSÃO

Os métodos propostos para síntese de sorvente e aplicação analítica de MIMSPE para FLU e CAF foram desenvolvidos com sucesso.

Considerando o caso de FLU, o resultado favorável da impressão da molécula modelo foi indicado pela comparação do desempenho do FLUMIP com o FLUNIP. O FLUMIP preparado mostrou alta afinidade e seletividade para o analito, sendo promissor para a sua determinação em formulações farmacêuticas de FLU. A análise de FLU em cápsulas de medicamento apresentou porcentagem de recuperação de 91 ± 10 %, com nove replicatas. O uso de UHPLC-MS com o objetivo de quantificação após a eluição do FLU a partir de cartucho de SPE resultou em um limite de detecção $\leq 1,63 \times 10^{-10}$ mmol/L. O FLUMIP também apresentou uma porcentagem de recuperação mais elevada, 93,0 %, em comparação com cartucho de C18 disponível comercialmente apresentando porcentagem de recuperação de 51,5 %.

A obtenção de MIM para CAF envolveu a síntese de dois tipos de ORMOSILs: HMIP1 e HMIP2. O HMIP2, preparado usando TMSPM apresentou uma melhor seletividade em comparação com o HMIP1 preparado utilizando vinilpiridina. A aplicação da técnica de HPLC resultou em limite de detecção = $5,14 \times 10^{-4}$ mmol/L e limite de quantificação = $1,71 \times 10^{-3}$ mmol/L. O HMIP2 foi compatível para aplicações com amostras de CAF em soluções aquosas e apresentou uma porcentagem de recuperação = 88 ± 5 %, com nove replicatas para CAF nas amostras de café. Os resultados da avaliação de HMIP2 em estudos competitivos mostraram o material como grupo seletivo com uma elevada porcentagem de recuperação de 77, 82 e 85 % para teofilina, teobromina e CAF respectivamente.

Um MIP para extração de ACYs foi sintetizado utilizando rutina como molécula modelo. A impressão da molécula modelo foi observada pela sua habilidade de reter rutina, 12 vezes maior em comparação ao NIP. Tais resultados fomentaram a utilização de cartuchos de RUTMIP para SPE de ACYs nos extratos vegetais devido à similaridade estrutural destes compostos. Entretanto, o RUTMIP não apresentou ação seletiva para ACYs, o que sugere ineficácia da sua aplicação para esta análise.

CAPÍTULO 8: PERSPECTIVAS

MIT é atraente para sintetizar novos sorventes que podem vir a ser úteis em diferentes aplicações de separação para uma gama de compostos e matrizes cada vez maior. Os MIMs sintetizados podem ser explorados para potenciais aplicações de separação e isolamento de diversos compostos a partir de suas amostras em escala comercial.

O MIP sintetizado para FLU foi utilizado como sorvente em cartuchos de MIP-SPE e aplicado de um modo *off-line*. Neste trabalho, o cartucho de MIP-SPE foi utilizado para a determinação de FLU em cápsulas, no entanto, este estudo precede a aplicação futura do cartucho, que poderá ser utilizado em matrizes mais complexas, como por exemplo, amostras biológicas. Além disso, como este MIP foi obtido sob a forma de precipitado uniforme então, também possui o potencial para ser empacotado em colunas cromatográficas e ser utilizado em modo *on-line*, o que pode ser vantajoso para a indústria farmacêutica.

Imprimir com sucesso as macromoléculas neste tipo de polímeros, altamente reticulados, é ainda um desafio. Moléculas como proteínas e polissacarídeos, podem ser encapsuladas permanentemente dentro da matriz polimérica, enquanto moléculas altamente vulneráveis à degradação, como antocianinas, podem sofrer decomposição durante a polimerização. Portanto, o desenvolvimento das técnicas de síntese na ausência de condições severas de polimerização por radicais livres, é de extrema importância. Tendo isso em vista, houve esforços para desenvolvimento de um método para síntese de ORMOSIL, sem a adição da molécula modelo na primeira etapa de polimerização, utilizando-se cafeína como molécula modelo. A expectativa é que a partir dos resultados obtidos, o método venha a ser testado para outras moléculas, com síntese de ORMOSILs eficientes e obtidos em condições que pode resolver os problemas relacionados à separação de moléculas complexas ou delicadas como ACYs.

Em suma, a investigação atual visou não só a compreensão dos métodos existentes para a preparação de MIMs, mas também abriu portas para o desenvolvimento de novas técnicas de síntese para a obtenção dos sorventes com seletividade elevada.

CAPÍTULO 9: TRATAMIENTO DE RESÍDUOS

Todos os resíduos gerados durante os trabalhos experimentais foram descartados e/ou tratados de acordo com as normas da Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP.

O metanol foi armazenado em frascos adequados e submetido à Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP, para enviá-lo para incineração.

A acetonitrila foi entregue para planta Piloto a ser tratada pelos responsáveis indicados pela Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP.

Os resíduos sólidos gerados pelo descarte de MIMs foram armazenados em recipientes adequados e tratados pela Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP seguindo-se as recomendações descritas nas referências:

- ✓ Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, Committee of Hazardous Substances in the Laboratory, Washington D.C., National Academy Press, **1983**.

- ✓ Toxic and Hazardous Industrial Chemicals Safety Manual, Japan, International Technical Information Institute, **1982**.

REFERÊNCIAS

Andersson, L. I.; Molecular imprinting for drug bioanalysis, A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *Journal of Chromatography B*, 739, 163, **2000**.

Arnaud, M. J.; Caffeine – Rev. In: Caballero, B.; Allen, L.; Prentice. A.; Eds., *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2nd ed.; Elsevier, Oxford, 4, 247, **2005**.

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

Bakowska, A.; Kucharska, A. Z.; Oszmianski, J.; The effects of heating, UV irradiation and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex, *Journal of Food Chemistry*, 81, 349, **2003**.

Bao, J.; Cal, Y.; Sun, M.; Wang, G.; Corke, H.; Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2327, **2005**.

Barros, L. A.; Martins, I.; Rath, S.; A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 3971, 1355, **2010**.

Beltran, A.; Borrull, F.; Cormack, P.A.G.; Marce, R. M.; Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1363, **2010**.

Beltran, A.; Marce, R. M.; Cormack, P. A. G.; Borrull, F.; Synthetic approaches to parabens molecularly imprinted polymers and their applications to the solid-phase extraction of river water samples. *Analytica Chimica Acta*, 677, 72, **2010**.

Beltran, A.; Marcé, R. M.; Cormack, P. A. G.; Borrull, F.; Synthesis by precipitation polymerisation of molecularly imprinted polymer microspheres for the selective extraction of carbamazepine and oxcarbazepine from human urine. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2248, **2009**.

Boonpangrak, S.; Prachayasittikul, V.; Bulow, L.; Ye, L.; Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by precipitation polymerization using a sacrificial covalent bond. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 1390, **2006**.

Cacho, C.; Turiel, E.; Conde, C. P.; Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples, *Talanta*, 78, 1029, **2009**.

Cacho, C.; Turiel, E.; Esteban, A. M.; Ayala, D.; Conde, C. P.; Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, 1114, 255, **2006**.

Caro, E.; Marcé, R. M.; Borrul, F.; Cornack, P. A. G.; Sherrington, D. C.; Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 143, **2006**.

Chang, P.; Zhang, Z.; Yang, C.; Molecularly imprinted polymer-based chemiluminescence array sensor for the detection of proline. *Analytica Chimica Acta*, 666, 70, **2010**.

Chen, P.; Vittal, R.; Nien, P.; Liou, G. S.; Ho, C. K.; A novel molecularly imprinted polymer thin film as biosensor for uric acid, *Talanta*, 80, 1145, **2010**.

Coelho, A. G.; Estudo da degradação térmica de Antocianinas de extratos de uva (*Vitis vinifera L. 'Brasil'*) e Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **2011**.

Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Bottoli, C. B. G.; Ribani, M.; Melo, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771, **2004**.

Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z.; Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *Journal of Chromatography B*, 804, 173, **2004**.

Correa, J. C. R.; Salgado, H. R. N.; Review of Fluconazol properties and analytical methods for its determination. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41, 124, **2011**.

Costa, L. S.; Materiais híbridos mesoestruturados funcionalizados via co-condensação aplicados na sorção. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **2012**.

Dai, C. M.; Geissen, S. U.; Zhang, Y. J.; Zhou, X. F.; Selective removal of Diclofenac from contaminated water using molecularly imprinted polymer microspheres. *Environmental Pollution* 159, 1660, **2011**.

Donato, R. K; Líquidos iônicos como compatibilizantes para a preparação de nanocompósitos poliméricos de polioliifenas apolares e sílicas, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2008**.

Ebarvia, B. S.; Sevilla, F.; Piezoelectric quartz sensor for caffeine based on molecularly imprinted polymethacrylic acid. *Sensors and Actuators B*, 107, 782, **2005**.

Ekberg, B.; Mosbach, K; Molecular imprinting: A technique for producing specific separation materials. *Trends in Biotechnology*, 7, 92, **1989**.

Farrington, K.; Magnerb, E.; Regan, F.; Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: Selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction, *Analytica Chimica Acta*, 60, 566, **2006**.

Farrington, K.; Regan, F.; Molecularly imprinted sol gel for ibuprofen: An analytical study of the factors influencing selectivity, *Talanta*, 78, 653, **2009**.

Favaro, M. M. A; Extração, estabilidade e quantificação de frutas típicas Brasileiras para aplicação industrial como corantes. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **2008**.

Freitas, A. A.; Dias, L. G.; Maçanita, A. A. L.; Quina, F. H.; Substituent effects on the pH-dependent multiequilibria of flavylum salt analogs of anthocyanins. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 24, 1201, **2011**.

Fuchs, Y.; Soppera, O.; Haupt, K.; Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications. *Analytica Chimica Acta*, 717, 7, **2012**.

Ghassempour, A.; Heydari, R.; Talebpour, Z.; Fakhari, A. R.; Rassouli, A.; Davies, N.; Enein, H. Y. A.; Study of new extraction methods for separation of Anthocyanins from red grape skins: analysis by HPLC and LC-MS/MS. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31, 2686, **2008**.

Ghiselli, A.; Nardini, M.; Baldi, A.; Scaccini, C.; Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 361, **1998**.

Gholivand, M. B.; Khodadadian, M.; Ahmadi, F.; Computer aided-molecular design and synthesis of a highly selective molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of furosemide from human plasma. *Analytica Chimica Acta*, 658, 225, **2010**.

González, G. P.; Hernando, P. F.; Alegría J. S. D.; An optical sensor for the determination of digoxin in serum samples based on a molecularly imprinted polymer membrane, *Analytica Chimica Acta*, 638, 209, **2009**.

Guo, X. J.; Wei, L.; Liu, Y.; Highly selective caffeine coated-wire electrode based on the molecularly imprinted polymer. *Advanced Materials Research*, 369, 554, **2012**.

Haupt, K.; Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst*, 126, 747, **2001**.

Holland, N.; An investigation into the role of morphology on the performance of molecularly imprinted polymers. Tese de doutorado, Waterford Institute of Technology, Waterford (Ireland), **2008**.

Hollier, L. M.; Cox, S. M.; Fluconazole (Diflucan(R)). *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 3, 222, **1995**.

Holthoff, E. L.; Bright, F. V.; Molecularly Imprinted xerogels as platforms for sensing, *Accounts of Chemical Research*, 40, 756, **2007**.

Holthoff, E. L.; Bright, F. V.; Molecularly templated materials in chemical sensing, *Analytica Chimica Acta*, 594, 147, **2007**.

Hung, C. Y.; Huang, Y. T.; Huang, H. H.; Hwang, C.C.; Synthesis and molecular recognition of molecularly imprinted polymer with ibuprofen as template. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53, 1173, **2006**.

Hurtado, F. K.; Souza, M. J.; Melo, J.; Rolim, C. M. B.; Microbiological assay and hplc method for the determination of fluconazole in pharmaceutical injectable formulations. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 224, **2008**.

Hurtado, F.K.; Souza, M. J.; Melo, J.; Rolim, C. M. B.; Microbiological assay and HPLC method for the determination of fluconazol in pharmaceutical injectable formulations. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 224, **2008**.

Hwang, C.; Lee, W.; Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase, *Journal of ChromatographyB*, 765, 45, **2001**.

Inagaki, K.; Takagi, J.; Lor, E.; Okamoto, M. P.; Gill, M. A.; Determination of Fluconazole in human serum by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*, 14, 306, **1992**.

IUPAC manual of symbols and terminology for physiochemical quantities and units- Appendix II. Prep: Burwell, R. L.; *Pure and Applied Chemistry*, 46, 71, **1976**.

IUPAC, Reporting physisorption data for Gas/Solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. Prep: Sing, K. S. W.; Everett, D. H.; Haul, R. A. W.; Moscou, L.; Pierotti, R. A.; Rouquérol, J.; Siemieniewska, T.; *Pure and Applied Chemistry*, 57, 603, **1985**.

Janeiro, P.; Brett, A. M. O.; Redox behaviour of anthocyanins present in *Vitis vinifera* L. *Electroanalysis*, 19,1779, **2007**.

Jin, Y.; Choi, D. K.; Row, K. H.; Adsorption isotherms of caffeine on molecular imprinted polymer. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25, 816, **2008**.

José, N. M.; Prado, L. A. S. A.; Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. *Quimica Nova*, 28, 281, **2005**.

Kan, X.; Liu, T.; Li, C.; Zhou, H.; Xing, Z.; Zhu, A.; A novel electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymers for caffeine recognition and detection. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16, 3207, **2012**.

Kaneko, K.; Determination of pore size and pore size distribution, adsorbents and catalysts. *Journal of Membrane Science*, 96, 59, **1994**.

Karim, K.; Breton, F.; Rouillon, R.; Piletska, E. V.; Guerreiro, A.; Chianella, I.; Piletsky, S. A.; How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1795, **2005**.

Karlsson, L.; Owens, P. K.; Lutz, E. S. M.; Andersson, L. I.; Molecular imprinting for bio and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 3, **1999**.

Khknen, M. P.; Heinonen, M.; Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 628, **2003**.

Kim, H.; Guiochon, G.; Comparison of the thermodynamic properties of particulate and monolithic columns of molecularly imprinted copolymers, *Analytical Chemistry*, 77, 93, **2005**.

Kim, S. S.; Im, H. T.; Kang, I. M.; Lee, H. S.; Lee, H. W.; Cho, S. H.; Kim, J. B.; Lee, K. T.; An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B*, 852, 174, **2007**.

Lee, S. W.; Yang, D. H.; Kunitake, T.; Regioselective imprinting of anthracenecarboxylic acids onto TiO₂ gel ultrathin films: an approach to thin film sensor. *Sensors and Actuators B*, 104, 35, **2005**.

Li, M. K. Y.; Lei N. Y.; Gong, C.; Yu, Y.; Lam, K. H.; Lam, M. H. W.; Lam, H.; Yu, P. K. S.; An organically modified silicate molecularly imprinted solid-phase microextraction device for the determination of polybrominated diphenyl ethers, *Analytica Chimica Acta*, 633, 197, **2009**.

Li, T. J.; Chen, P. Y.; Nien, P. C.; Lin, C. Y.; Vittal, R.; Ling, T. R.; Ho, K. C.; Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by the sol-gel process for sensing creatinine. *Analytica Chimica Acta*, 711, 83, **2012**.

Liang, R.; Zhang, R.; Qin, W.; Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk, *Sensors and Actuators*, 141, 544, **2009**.

Liew, K.; Loh, G. O. K.; Tan, Y. T.; Development and application of simple hplc-uv method for fluconazole quantification in human plasma. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 107, **2012**.

Lila, M. A; Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach; *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306, **2004**.

Lima, D. M.; Júnior, G. P. N. J.; Ferri, P. H.; Santos, S. C.; Determination of Fluconazole in serum and amniotic fluid of rats by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 223, **2005**.

Lin, C. I.; Joseph, A. K.; Chang, C. K.; Wang, Y. C.; Lee, Y. D.; Synthesis of molecular imprinted organic-inorganic hybrid polymer binding caffeine. *Analytica Chimica Acta*, 481,175, **2003**.

Lin, J. M.; Nakagama, T.; Uchiyama, K.; Hobo, T.; Enantioseparation of D, L-phenylalanine by molecularly imprinted polymer particles filled capillary electrochromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 20, 1489, **1997**.

Lin, L. Q.; Zhang, J.; Fu, Q.; He, L. C.; Li, Y. C.; Concentration and extraction of sinomenine from herb and plasma using a molecularly imprinted polymer as the stationary phase. *Analytica Chimica Acta*, 561, 178, **2006**.

Luo, X.; Dong, R.; Luo, S; Zhan, Y.; Tu, X.; Yang, L.; preparation of water-compatible molecularly imprinted polymers for caffeine with a novel ionic liquid as a functional monomer. *Journal of Applied Polymer Science*, 127, 2884, **2012**.

Maier, N. M.; Lindner, W.; Chiral recognition applications of molecularly imprinted polymers: critical review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 377, **2007**.

Marx, S.; Zaltsman, A.; Turyan, L.; Mandler, D.; Parathion sensor based on molecularly imprinted sol-gel films. *Analytical Chemistry*, 76, 120, **2004**.

Mayes, A. G.; Mosbach, K.; Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase. *Analytical Chemistry*, 68, 3769, **1996**.

Mayes, A. G.; Mosbach, K.; Molecularly imprinted polymers: useful material for analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321, **1997**.

Mejr, M.; BenSouissi, A.; Aroulmoji, V.; Rogé, B.; Hydration and self-association of caffeine molecules in aqueous solution: Comparative effects of sucrose and cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73, 6, **2009**.

Mohajeri, S. A.; Karimi, G.; Aghamohammadian, J.; Khansari, M. R.; Clozapine recognition via molecularly imprinted polymers; bulk polymerization versus precipitation method. *Journal of Applied Polymer Science*, 121, 3590, **2011**.

Mosbach, K.; The promise of molecular imprinting. *Scientific American*, 295, 86, **2006**.

Ou, J. J.; Li, X.; Feng, S.; Dong, J.; Dong, X.; Kong, L.; Ye, M.; Zou, H.; Preparation and evaluation of a molecularly imprinted polymer derivatized silica monolithic column for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 79, 639, **2007**.

Ovando, A. C.; Hernandez, M. L. P.; Hernandez, M. E. P.; Rodriguez, J. A.; Vidal, C. A. G.; Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859, **2009**.

Peng, L.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction of rutin in complicated traditional chinese medicines. *Analyst*, 136, 765, **2011**.

Phutthawong, N.; Pattarawarapan, M.; Facile synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers for caffeine via ultrasound-assisted precipitation polymerization. *Polymer Bulletin*, 2012. DOI 10.1007/s00289-012-0836-5. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00289-012-0836-5/fulltext.html>, acesso em 04/02/2012.

Piletsky, S. A.; Turner, N. W.; Laitenberger, P.; Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics-Future potential and existing problems. *Medical Engineering and Physics*, 28, 971, **2006**.

Pineda, L. E. G; Luis, G. E. P.; Cuán, A.; García, M. E. D.; Physico-chemical characterization of flavonol molecularly imprinted polymers. *Reactive & Functional Polymers*, 71, 402, **2011**.

Queiroz, K. M.; Silva, M. L. M.; Prado, N. D.; Lima, P. M. A.; Diniz, R. D. L.; César, I. C.; Pianetti, G. A.; Santos, D. A.; Comparison of microbiological assay and HPLC-UV for determination of fluconazole in capsules. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, 693, **2009**.

Ramesh, B.; Narayana, P. S.; Reddy, A. S.; Devi, P. S.; Spectrodensitometric Evaluation and Determination of Fluconazole and its impurities in pharmaceutical formulations by high performance thin layer chromatography. *Journal of Pharmacy Research*, 4, 1401, **2011**.

Ramström, O.; Nicholls, I. A.; Mosbach, K.; Synthetic peptide receptor mimics - highly stereoselective recognition in noncovalent molecularly imprinted polymers, *Tetrahedron Asymmetry*, 5, 649, **1994**.

Rimawi, F. A.; Development and validation of analytical method for fluconazole and fluconazole related compounds (a, b, and c) in capsule formulations by HPLC with UV detection. *Jordan Journal of Chemistry*, 4, 357, **2009**.

Sadasivudu, P.; Shastri, N.; Sadanandam, M.; Development and validation of RP-HPLC and UV methods of analysis for fluconazole in pharmaceutical solid dosage forms. *International Journal of ChemTech Research*, 1, 1131, **2009**.

Schafhalter, A. K.; Fuchs, H.; Pfannhauser, W.; Solid-Phase Extraction (SPE) – a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpavar Nero*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 435, **1998**.

Scorrano, S.; Longo, L.; Vasapollo, G.; Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine , *Analytica Chimica Acta*, 659, 167, **2010**.

Sellergen, B.; Allender, C. J.; Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1733, **2005**.

Sellergren, B.; Shea K. J.; Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. *Journal of Chromatography*, 635, 31, **1993**.

Shamir, M.O.; Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science*, 177, 310, **2009**.

Silva, R. G. C.; Augusto, F.; Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines, *Journal of Chromatography A*, 1114, 216, **2006**.

Silva, R. G. C.; Vigna, C. R. M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Augusto, F.; Molecularly imprinted silica as a selective SPE sorbent for triazine herbicides, *Journal of Separation Sciences*, 33, 1319, **2010**.

Song, X.; Jiangtao Wang, J.; Zhu, J.; Effect of porogenic solvent on selective performance of molecularly imprinted polymer for quercetin. *Materials Research*, 12, 299, **2009**.

Song, X.; Li, J.; Wang, J.; Chen, L.; Quercetin molecularly imprinted polymers: preparation, recognition, characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction, *Talanta*, 80, 694, **2009b**.

Spivak, D. A.; Optimization, evaluation and characterization of molecularly imprinted polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1779, **2005**.

Stintzing, F. C.; Stintzing, A. S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R. E.; Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6172, **2002**.

Tamayo, F. G.; Turiel, E.; Esteban, A. M.; Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends, *Journal of Chromatography A*, 1152, 32, **2007**.

Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?; *Quimica Nova* 25, 684, **2002**.

Turiel, E.; Esteban, A. M.; Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. *Analytica Chimica Acta*, 668, 87, **2010**.

Vallano, P.T.; Remcho, V. T.; Highly selective separations by capillary electrochromatography: molecularly imprint polymer sorbents. *Journal of Chromatography A*, 887, 125, **2000**.

Valls, J.; Millán, S.; Matrí, M. P.; Borràs, E.; Arola, L.; Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, Review. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143, **2009**.

Vasapollo, G.; Sole, R.; Mergola, L.; Lazzoi, M. R.; Scardino, S. S.; Mele, G.; Molecularly imprinted polymers: Present and future perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908, **2011**.

Wallace, J. E.; Harris, S. C.; Gallegos, J.; Thomas, G. F.; Chen, J. H.; Rinaldi, M. G.; Assay of fluconazole by high-performance liquid chromatography with a mixed-phase column. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 603, **1992**.

Walsh, R.; Osmani, Q.; Hughes, H.; Duggan, P.; Mcloughlin, P.; Synthesis of imprinted beads by aqueous suspension polymerization for chiral recognition of antihistamines. *Journal of Chromatography B*, 879, 3523, **2011**.

Wang C.G.; Synthesis and properties of caffeine molecularly imprinted polymer. *Guangzhou Chemical Industry*, 37, 138, **2009**.

Wang, D.; Hong, S.P.; Row, K.H.; Chromatographic separation of xanthine derivatives on single and mixed-template imprinted polymers. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 25, 357, **2004**.

Wang, J.; Cormack, P. A. G.; Khoshdel, E.; Sherrington, D. C.; Monodisperse, molecularly imprinted polymer monodisperse prepared by precipitation polymerization for affinity separation applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 533, **2003**.

Wang, J.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C.; Khoshdel, E.; Synthesis and characterization of micrometer-sized molecularly imprinted spherical polymer particulates prepared via precipitation polymerization. *Pure Applied Chemistry*, 79, 1505, **2007**.

Wang, L. S.; Stoner, G. D.; Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269, 281, **2008**.

Wang, J.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C.; Khoshdel, E.; Synthesis and characterization of micrometer-sized molecularly imprinted spherical polymer particulates prepared via precipitation polymerization, *Pure Applied Chemistry*, 79, 1505, **2007**.

Wanyika, H.N.; Gatebe, E. G.; Gitu, L. M.; Ngumba, E. K.; Maritim, C. W.; Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African Journal of Food Science*, 4, 353, **2010**.

Watson, J.; Caffeine. In: Caballero, B.; Trugo, L. C.; Fringas, P. M.; Eds., *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed.; Elsevier, London, 2, 745, **2003**.

Wattananat, T.; Akarawut, W.; Validated HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. *Biomedical Chromatography*, 20, 1, **2006**.

Wulff, G.; Sarhan, A.; The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angewandte Chemie International*, 11, 341, **1972**.

Wulff, G.; Vesper, W.; Preparation of chromatographic sorbents with chiral cavities for racemic resolution. *Journal of Chromatography A*, 167, 171, **1978**.

Yan, H.; Row, K. H.; Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7, 155, **2006**.

Yan, M.; Ramtstrom, O.; Molecularly imprinted materials science and technology. Marcel Dekker, NewYork, **2005**.

Yanamandra, R.; Chaudhary, A.; Bandaru, S. R.; Sastry, C. S. P.; Patro, B.; Murthy, Y. L. N.; Ramaiah, P. A.; Development of a RP-UPLC method for the simultaneous analysis of Secnidazole, Fluconazole, and Azithromycin: Application in pharmaceuticals and human serum. *International Journal of PharmTech Research*, 3, 1198, **2011**.

Yin, J.; Yang, G.; Chen, Y.; Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its L-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, 68, 1090, **2005**.

Yinzhe Jin, Y.; Row, K. H.; Solid-Phase Extraction of caffeine and catechin compounds from green tea by caffeine molecular imprinted polymer. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 28, 276, **2007**.

Zdravkov, B. D.; Cermák, J. J.; Sefara, M.; Janku, J.; Pore classification in the characterization of porous materials: A perspective. *Central European Journal of Chemistry*, 5, 385, **2007**.

Zhang, Z.; Haiping, L.; Li, H.; Nie, L.; Yao, S.; Stereoselective Histidine Sensor Based on Molecularly Imprinted Sol-Gel Films. *Analytical Biochemistry*, 336, 108, **2005**.

Ziemons, E.; Bourichi, H.; Mantanus, J.; Rozet, E.; Lebrun, P.; Essassi, E.; Cherrah, Y.; Bouklouze, A.; Hubert, P.; Determination of binary polymorphic mixtures of fluconazole using near infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction: A comparative study based on the pre-validation stage results. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 1208, **2011**.