

Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química - Departamento de Química Analítica

TESE DE DOUTORADO

MATERIAIS SORVENTES IMPRESSOS MOLECULARMENTE PREPARADOS POR PROCESSOS SOL-GEL

Raquel Gomes da Costa Silva

Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

Campinas - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si38m	Silva, Raquel Gomes da Costa. Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processos sol-gel / Raquel Gomes da Costa Silva Campinas, SP: [s.n], 2009.	
	Orientador: Fabio Augusto.	
	Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.	
	 Sol-gel. 2. Impressão molecular. 3. Ormosil. MISPE. I. Augusto, Fabio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título. 	

Título em inglês: Molecularly imprinted sorbents prepared by sol-gel process

Palavras-chaves em inglês: Sol-gel, Molecular imprinting, Ormosil, MISPE

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Fabio Augusto (orientador), Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley (UNIFAL), Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira (UNIFAL), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 27/08/2009

A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério.

É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados. (*Albert Einstein*)

Agradeço primeiramente a Deus, por mais uma conquista, Ao meu marido por partilhar as alegrias e tristezas, A minha mãe, pelo amor, amizade e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao prof. Dr. Fabio Augusto, o qual admiro muito como profissional, pela orientação, apoio, confiança e principalmente pela amizade;
- ✓ À professora Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli pela convivência, incentivo e amizade;
- ✓ À minha querida mãe, pela confiança;
- ✓ Aos amigos do Laboratório de Cromatografia Gasosa: Marcio, Eduardo, Adriano, André, Carlos, Sandra e Maria pela amizade e convivência;
- ✓ À todos do LABCROM, com os quais convivi todos esses anos, em especial a Camila, Milena, Laís e Liane pelo acolhimento e amizade;
- ✓ A professora Dra. Carol Hollingworth Collins pela participação em alguns trabalhos, pela cooperação e disponibilização de seu laboratório para a realização de algumas das etapas deste trabalho;
- ✓ À Lucília e Ana Lúcia, pela convivência e amizade;
- ✓ À Unicamp;
- ✓ À Capes, pelo auxílio financeiro.
- \checkmark À minha família, que sempre me incentivou nos meus estudos.

SÚMULA CURRICULAR

Formação Acadêmica

2005 – 2009 :	Doutorado em Química Analítica
2003 - 2005:	Mestrado em Química Analítica
	Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
1998 - 2002 :	Graduação em Bacharelado e Licenciatura em Química,
	Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. Pilau, E.J. ; SILVA, R.G.C. ; Jardim, I.C.F.S. ; Augusto, F. Molecularly imprinted sol-gel silica for solid phase extraction of phenobarbital. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 19, p. 1136-1143, 2008.

2. SILVA, R.G.C. ; Augusto, F. . Sol-gel molecularly imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines. Journal of Chromatography A, v. 1114, p. 216-223, 2006.

3. SILVA, R.G.C. ; Augusto, F. . Highly porous solid-phase Microextraction fiber coating based on poly(ethylene glycol)-modified ormosils synthesized by sol-gel technology. Journal of Chromatography - A, v. 1072, p. 7-12, 2004.

Capítulos de livros publicados

3.1. Oliveira, A.M. ; Biajoli, A.F.P. ; Fidelis, A.H.V ; SILVA, R. G. C. . Extraction and Pre-Concentration Techniques for Chromatrographic Analysis. Trends in Sample Preparation. Editor: Marco Aurelio Zezzi Arruda. Nova Iorque: Nova Publishers, 2006, p. 191-225.

Prêmios e títulos

2008: Melhor Painel da Seção de Química Analítica - XXXI Reunião Anual da SBQ, Sociedade Brasileira de Química.

2005: Melhor Trabalho de Área Química Analítica aplicada a Fármacos e Drogas de Abuso, XII Encontro de Química Analítica, ENQA.

Experiência acadêmica

 Programa de Estágio Docente de Estudantes de Pós Graduação (PED B). *Período:* 15/07/2008 a 15/12/2008. *Disciplina:* Química Analítica IV, período diurno.
 Programa de Estágio Docente de Estudantes de Pós Graduação (PED C). *Período:* 01/03/2008 a 14/07/2008. *Disciplina:* Química Clássica, período noturno.
 Programa de Estágio Docente de Estudantes de Pós Graduação (PED C). *Período:* 01/03/2007 a 14/07/2007. *Disciplina:* Química Analítica III, período diurno.
 Participação docente em curso de extensão na Unicamp. *Período:* 2° semestre 2007

RESUMO

MATERIAIS SORVENTES IMPRESSOS MOLECULARMENTE PREPARADOS POR PROCESSOS SOL-GEL

Autor: Raquel Gomes da Costa Silva Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

Esse trabalho apresenta o desenvolvimento de materiais sorventes com impressão molecular, para utilização na Extração em Fase Sólida (SPE) a partir da tecnologia sol-gel. No capítulo 1 foi preparado um material com impressão molecular seletivo para metilxantinas, utilizando-se o processo sol-gel. Posteriormente, esse material foi aplicado na extração de cafeína em águas e urina humana, seguido de análise cromatográfica. No capítulo 2, foi sintetizado um ormosil (sílica organicamente modificada) seletivo para fenobarbital. Nessa etapa, como molécula molde foi utilizado um análogo estrutural (ácido barbitúrico) ao analito alvo. O material foi aplicado na determinação de fenobarbital em plasma humano, demonstrando ser seletivo para esse composto. No capítulo 3 foi relatado o preparo de um ormosil impresso molecularmente seletivo para compostos triazínicos. Esse material foi aplicado com sucesso na determinação de simazina, propazina e atrazina em amostras de caldo de cana. Paralelamente, o material preparado em laboratório foi comparado ao material comercial seletivo para triazinas. Ambos materiais demonstraram ser seletivo para esses compostos. Os materiais preparados a partir do processo sol-gel apresentaram potencialidade na determinação de diferentes analitos alvo.

ABSTRACT

MOLECULARLY IMPRINTED SORBENTS PREPARED BY SOL-GEL PROCESS

Author: Raquel Gomes da Costa Silva Supervisor: Prof. Dr. Fabio Augusto

This work presents the development of sorbent materials with molecular imprinting for use in Solid Phase Extraction (SPE) through sol-gel technology. In chapter 1, a molecularly imprinted material selective for methylxanthines was prepared, using the sol-gel process. Subsequently, this material was used in the extraction of caffeine from water and human urine, followed by chromatographic analysis. In Chapter 2, an ormosil (organically modified silica) selective for phenobarbital was synthesized. For this, a analogue structural was used as template (barbituric acid) for the target analyte. The material was applied to the determination of phenobarbital in human plasma, proving to be selective for this compound. In Chapter 3 the preparation of a imprinted ormosil selective for triazine is reported. This material has been successfully applied for the determination of simazine, atrazine and propazine in samples of sugar cane juice. In addition, the material prepared in the laboratory was compared to commercial material selective for triazines. Both materials were shown to be selective for these compounds. The materials prepared by the sol-gel process showed potential for the determination of different target analytes.

Índice de figuras	xxi
Índice de tabelas	XXV
Lista de abreviaturas	xxvii
Introdução	1
Referências bibliográficas	4
Síntese da bibliografia	7
1. Extração em fase sólida (SPE)	9
1.1.1 Mecanismos de separação	13
1.2 Polímeros de impressão molecular	15
1.2.1 Fundamentos	15
1.2.2 Um breve histórico sobre impressão molecular1.2.3 Estratégias de síntese dos polímeros com impressão	16
molecular	17
1.2.4 Impressão molecular covalente	19
1.2.4.1 Impressão através de ligações covalentes reversíveis	20
1.2.4.2 Impressão com ligações covalentes fortes	24
1.2.4.3 Impressão semi-covalente	24
1.2.4.4 Impressão com espaço sacrificial	25
1.2.5 Impressão molecular não-covalente	26
1.2.5.1 Natureza do complexo formado entre monômero e	
template	28
1.2.5.2 Impressão não covalente com um monômero	
funcional	29
1.2.5.3 Impressão não covalente com uma combinação de	
monômeros	31
1.2.6 Vantagens e desvantagens da impressão covalente e não	
covalente	32
1.2.7 A escolha do analito alvo	34
1.2.8 Reagentes reticulantes	35
1.2.9 Solventes	36
1.2.10 A matriz de impressão	37
1.3. O Processo sol-gel	38
1.3.1 Impressão molecular em matrizes sol-gel	43 47
1.4.1 Polímeros de impressão molecular aplicada a SPE (MISPE)	+/

1.4.2. Sílica impressa molecularmente aplicada a SPE (MISS Referências bibliográficas	SPE)
Objetivos	
Capítulo I: Sílica organicamente modificada impressa	
molecularmente com cafeína	•••••
1. Introdução	
2. Experimental	
2.1. Reagentes	•••••
2.2. Materiais	
2.3. Amostras	•••••
2.4. Preparo da sílica impressa molecularmente (MIS)	•••••
2.5. Caracterização dos materiais	•••••
2.6. Determinações cromatográficas	
2.7. Procedimento de extração	••••••••
2.8. Avaliação do desempenho analítico do MIS	•••••
3. Resultados e Discussão	•••••••
3.1. Caracterização química e estrutural do MIS e NIS	•••••
3.2. Otimização do método de MISPE-HPLC-UV	
3.3. Desempenho analítico do MIS	
4. Conclusões	•••••
Referências bibliográficas	•••••
Capítulo II: Sílica organicamente modificada impressa	
molecularmente com ácido barbitúrico	•••••
1. Introdução	•••••
2. Experimental	
2.1. Reagentes	•••••
2.2. Materiais	•••••
2.3. Amostras	•••••
2.4. Preparo dos materiais impressos preparados pelo PSG	•••••
2.5. Determinações cromatográficas	
2.6. Caracterização química do MIS e NIS	•••••
2.7. Otimização do método de MISPE-HPLC-UV	•••••
2.8. Aplicações a amostras de plasma humano	••••••
3. Resultados e Discussão	•••••
3.1. Caracterização química e estrutural do MIS e NIS	•••••
3.2. Método de MISPE-HPLC-UV	
3.3. Aplicação ao plasma humano	•••••
4. Conclusões	•••••

Referências bibliográficas	108
Capítulo III: Sílica organicamente modificada impressa	
molecularmente com atrazina	109
1. Introdução	111
2. Experimental	112
2.1. Reagentes	112
2.2. Materiais	112
2.3. Amostras	113
2.4. Preparo dos materiais impresso e não impresso seletivo para	
triazinas	114
2.5. Determinações cromatográficas	114
2.6. Caracterização dos materiais	114
2.7. Procedimento de extração	115
2.8. Aplicações a amostras de garapa	116
3. Resultados e Discussão	116
3.1. Caracterização química e morfológica dos materiais	116
3.2.Otimização do método de MISPE-HPLC-UV	119
3.3. Aplicação a amostras de garapa	122
4. Conclusões	123
Referências bibliográficas	124
Conclusões gerais	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida, operada no	
modo isolamento do analito. Etapas: 1, ativação do sorvente; 2, adição da	
amostra; 3 , remoção dos interferentes e 4 , dessorção dos analitos	10
Figura 2: Ilustração esquemática do processo de impressão molecular.	
Adaptado de [21]	16
Figura 3: Princípios da Impressão Molecular	18
Figura 4: Sítios de ligação em um polímero impresso com ácido siálico	
utilizando ácido 4-vinilfenil borônico como monômero funcional [39]	22
Figura 5: Impressão molecular usando base de Schiff como monômero	
funcional.	23
Figura 6: Impressão molecular usando cetal como monômero	
funcional	24
Figura 7: Impressão de colesterol pelo método de espaço sacrificial	26
Figura 8: (a) Impressão molecular não covalente e um derivado dipeptídico. (b)	
Impressão de morfina, (c) impressão de fenilalanina, (d) impressão de	
triptofano	28
Figura 9: Monômeros funcionais típicos utilizados na tecnologia de impressão	
molecular	31
Figura 10: Agentes reticulantes típicos utilizados na impressão molecular	36
Figura 11: Reações químicas que ocorrem durante a síntese sol-gel	40
Figura 12: Impressão Molecular através do PSG [101]	44
Figura 13: Formação de um híbrido orgânico-inorgânico impresso não	
covalentemente	45
Figura 14: Formação de um híbrido orgânico-inorgânico por impressão	
covalente	46
Figura 15: Seções de cromatogramas obtidos por HPLC-UV após extração de	
amostras de plasma utilizando cartuchos impresso com estazolam, C18 e	
extração líquido líquido (L-L)	50
Figura I-1: Estruturas químicas dos compostos avaliados neste estudo	68
Figura I-2: Espectro de absorção no infravermelho para MIS e	
NIS	71
Figura I-3: Curvas termogravimétricas (gráfico superior) e 1º derivada	
correspondente (gráfico inferior) para MIS e NIS	73
Figura I-4: Reação sugerida para o preparo do	
MIS	75
Figura I-5: Dependência das massas de cafeína (CF), teobromina (TB) e	
teofilina (TP) extraídos com os diferentes solventes de dessorção, após extração	
com cartucho MIS	77

Figura I-6: Dependência da eficiência de dessorção (em %) com o volume do	
solvente de dessorção (mL) para cafeína (), teobromina (0) e teofilina	
(Δ)	78
Figura I-7: Dependência entre massas recuperadas de cafeína (), teobromina	
(o) e teofilina (Δ) e o pH de amostras aquosas testadas, após extração com	
cartuchos de MIS.	79
Figura I-8: Avaliação da repetibilidade no preparo de materiais com impressão	
molecular preparados pelo processo sol-gel	80
Figura I-9: Seções de cromatogramas de HPLC-UV obtidos após extração de	
água do córrego Anhumas usando cartuchos de NIS (cromatograma abaixo) e	
MIS (cromatograma acima). Identificação dos picos: (1) teobromina, (2)	
teofilina e (3) cafeína	82
Figura I-10: Seções de cromatogramas de HPLC-UV obtidos após extração de	
urina humana com cartuchos comerciais C ₁₈ e cartuchos de MIS	84
Figura II-1: Espectro de absorção no infravermelho para MIS e NIS	86
Figura II-2: Micrografias para o MIS e NIS sol-gel	98
Figura II-3: Proposta de reação para a preparação do MIS	99
Figura II-4: Dependência da quantidade de fenobarbital (expresso em área de	
picos) com a natureza do solvente de sorção e dessorção	101
Figura II-5: Dependência da eficiência de dessorção (em %) com o volume do	
solvente de dessorção (mL) para fenobarbital	102
Figura II-6: Dependência entre massas recuperadas de fenobarbital e o pH de	
amostras aquosas testadas após extração com cartuchos de MIS	103
Figura II-7: Cromatogramas de HPLC-UV correspondente a injeção direta de	
solução estoque metanólica contendo paracetamol (1), cafeína (2), ácido	
acetilsalicílico (3) e fenobarbital (4) e extrato metanólico obtido após eluição de	
amostras teste aquosas	105
Figura II-8: Estruturas moleculares do <i>template</i> (ácido barbitúrico, a) e os	
analitos testados: fenobarbital (b), paracetamol (c), cafeína (d) e ácido	105
acetilsalicílico (\mathbf{e})	105
Figura II-9: Cromatogramas de HPLC-UV de extrato metanólico de plasma	
humano bruto (cromatograma superior) e desproteinado (cromatograma	
inferior) dopados com 30 μ g L ⁻ de fenobarbital usando MIS (linha cheia) e NIS	107
(linha pontilhada). Pico do fenobarbital esta ilustrado com uma seta	10/
Figura III-1: Estruturas dos herbicidas triazinicos avaliados neste estudo	111
Figura III-2: Keação sugerida para o preparo e aplicação do MIS	11/
rigura III-5 Microgranas odudas para ormosii impresso com atrazina, MIS (a)	110
E HAU HIPTESSO, INIS (U)	11ð 110
Figura III-4 Espectito de absolção no initaverimento para MIS (A) e NIS (B) Figura III 5 Dependência de oficiência de descerção (cm 0) com o velvero de	119
Figura III-5 Dependencia da enciencia de dessorção (em %) com o volume do	

solvente de dessorção para simazina (), propazina (0) e atrazina (Δ)	120
Figura III-6 Cromatogramas obtidos após extração de 10 mL de água dopada	
com 300 μ g L ⁻¹ de mistura teste contendo simazina (1), atrazina (2), diuron (3),	
propazina (4) e linuron (5)	121
Figura III-7 Avaliação da repetibilidade no preparo dos materiais impressos	
molecularmente preparados pelo PSG utilizando dois níveis de concentração	122
Figura III-8 Cromatogramas de HPLC-UV obtidos após MISPE com cartucho	
comercial e MIS de 10mL de caldo de cana de açúcar dopado com mistura teste	
contendo simazina (1), atrazina (2), propazina (4), diuron e linuron (não	
extraídos)	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Fases sorventes mais utilizadas em SPE para analitos solúveis em	
solventes orgânicos e água	12
Tabela 2: Exemplos de estruturas de complexos M-T usados na impressão	
covalente reversível	21
Tabela 3: Tipos de ligações que ocorrem no procedimento não-covalente	27
Tabela 4: Grupos doadores e aceptores de ligações de Hidrogênio	27
Tabela 5: Estruturas de monômeros usados no procedimento de impressão não	
covalente	30
Tabela 6: combinação de monômeros usados no procedimento de impressão	
não covalente	32
Tabela 7: Comparação entre MIP via impressão covalente e não covalente	
[24]	33
Tabela 8: Exemplos de compostos utilizados como templates nos	
procedimentos de impressão molecular	35
Tabela 9: Aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais utilizando	
MISPE	49
Tabela I-1: Figuras de mérito quantitativas de metilxantinas obtidas por	.,
HPLC-UV após extração com cartuchos MIS	83
	00

LISTA DE ABREVIATURAS

APTMS: 3-Aminopropiltrimetoxissilano.

BTX: Benzeno, tolueno e xileno.

d_i: Diâmetro interno.

d_p: Diâmetro de partículas

EDMA: Dimetacrilato de etilenoglicol.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid

Chromatography).

IF: Fator de impressão (Imprinting Factor).

IR: Infravermelho (Infrared spectroscopy).

LLE: Extração Líquido-Líquido (Liquid-liquid Extraction).

M-T: Monômero-template.

MIP: Polímero de Impressão Molecular, (Molecularly Imprinted Polymer).

MISPE: SPE usando sorventes molecularmente impressos, (Molecularly Imprinted

Solid Phase Extraction).

MISSPE: Sílica impressa molecularmente aplicada a Extração em Fase Sólida.

NIP: Polímero não impresso (Non-imprinted Polymer).

NP: Fase Normal, (Normal Phase).

NIS: Sílica não impressa molecularmente (non-imprinted silica).

ORMOSIL: Sílica organicamente modificada (*organically modified silica*).

PSG: Processo sol-gel.

SEM: Microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy*)

RP: Fase Reversa (*Reversed Phase*).

SPE: Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction).

TEOS: Tetraetilortossilicato.

TGA: Análise Termogravimétrica.

TMOS: Tetrametilortossilicato.

 t_R : Tempo de retenção .

UV: Ultravioleta

 λ : Comprimento de onda.

INTRODUÇÃO

A constante evolução da ciência e a crescente demanda por novas tecnologias têm despertado o interesse de alguns pesquisadores para o desenvolvimento de metodologias e técnicas analíticas inovadoras. Dentre as técnicas analíticas amplamente empregadas para análise de substâncias químicas nos mais diferentes ambientes, destaca-se a Cromatografia. Em situações do dia-a-dia, geralmente é necessária a introdução de uma etapa pré-cromatográfica na metodologia analítica, com o objetivo de eliminar interferentes que podem comprometer o sistema cromatográfico. Essa etapa é conhecida como Preparo de Amostras, e emprega diferentes procedimentos para converter uma amostra bruta representativa em uma forma apropriada para análise química.

O preparo de amostras é essencial para análise de compostos em amostras não sintéticas, já que é a etapa que mais consome tempo e é a possível fonte de imprecisão e inexatidão de toda a metodologia [1,2]. Devido ao grande número de amostras usualmente manuseadas nas análises, o procedimento de preparo das mesmas deve ser rápido e conveniente, com perdas mínimas dos analitos e baixo custo de análise. Além do mais na maioria dos métodos analíticos, o analito de interesse está presente em baixas concentrações em uma matriz que geralmente é incompatível com a técnica de análise e, consequentemente são necessárias etapas de limpeza da amostra, aumentando a compatibilidade desta com a técnica de interesse. A extração e isolamento dos analitos de interesse são as etapas mais críticas envolvidas na análise de misturas presentes em matrizes complexas [3]. A extração tem o objetivo de remover os analitos da matriz, enquanto que a etapa de limpeza (*clean up*) focaliza-se na eliminação de possíveis interferentes. Após a extração, normalmente se emprega a cromatografia a líquido ou a gás para a separação dos analitos, devido a características como seletividade e sensibilidade dessas técnicas. Para uma análise cromatográfica ideal, é necessário um preparo de amostras mais rigoroso, melhorando a seletividade.

3

Um dos métodos rotineiros mais utilizados tradicionalmente no preparo de amostras foi a extração por intermédio de solventes (extração líquido-líquido, LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*). Esta se baseia na solubilidade dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis [4].

A LLE é tediosa, cara, introduz grandes volumes de solventes orgânicos no ambiente, é de difícil automação, possui seletividade sofrível, existe a necessidade de solventes ultrapuros para análise e apresenta baixa repetibilidade e reprodutibilidade em decorrência das várias etapas [5]. Uma possível alternativa para minimizar esses problemas tem sido a utilização da Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*). Comparado com a LLE, a SPE pode reduzir o tempo de extração, bem como o consumo de solventes. Consequentemente, a SPE é uma das técnicas de preparo de amostras que tem sido muito utilizadas atualmente [6,7].

Os polímeros de impressão molecular têm se destacado como materiais promissores para aplicação em extração em fase sólida (SPE). Eles são obtidos através da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos, o que se deve ao arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor da molécula molde [8-10].

Embora o desenvolvimento dos materiais com impressão molecular tenha iniciado a sete décadas atrás, pesquisas e aplicações envolvendo esse assunto ainda ocupam um lugar proeminente na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

 [1] D.O. Johns, R.L. Dillis, M.S. Morgan, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 817 (2005) 255.
 [2] C.W. Huie, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 23.
 [3] R.E. Majors, LC-GC 14 (1996) 88.

- [4] S.M. Wang, T.C. Wang, Y.S. Giang, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 816 (2005) 131.
- [5] C.W. Huck, G.K. Bonn, J. Chromatogr. A 885 (2000) 51.
- [6] M-C Hennion, J. Chromatogr. A 856 (1999) 3.
- [7] M. Nichkova, M.P. Marco, Anal. Chim. Acta 533 (2005) 67.
- [8] K. Haupt, Analyst 126 (2001) 747.
- [9] X. Xu, L. Zhu, L. Chen, J. Chromatogr. B 804 (2004) 61.
- [10] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrul, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 477.

SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA

1. Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE existe na sua forma atual desde a década de 70; porém, foi a partir de 1994 que ela adquiriu maior popularidade, quando os fabricantes inseriram no mercado 84 produtos, com inúmeras fases extratoras [1]. A SPE é uma técnica de extração líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica. Em sua forma mais simples, emprega um pequeno tubo aberto (cartucho de extração) que contém a fase sólida (fase extratora).

Em uma extração, a matriz contendo o(s) analito(s) é colocada na parte superior do cartucho e aspirada sob vácuo. Ocorre a interação entre analito(s) e fase extratora, com posterior eluição dos compostos de interesse com um solvente adequado, de forma a coletar o(s) analito(s) de interesse em concentração apropriada para análise [2].

Basicamente, existem quatro modos de operação na Extração em Fase Sólida, sendo eles a concentração dos analitos (enriquecimento), o isolamento do analito, o isolamento da matriz e a estocagem da amostra. No modo enriquecimento, o objetivo é passar pelo cartucho um grande volume de amostra, retendo o analito de interesse e deixando eluir o solvente e os interferentes. Em seguida o analito é dessorvido com uma pequena quantidade de solvente, fazendo com que a concentração do analito seja maior do que na amostra original. No modo limpeza, o objetivo é isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. Já no modo isolamento da matriz, os interferentes são retidos no cartucho, em vez do analito de interesse, que passa direto pelo cartucho. Finalmente, o modo estocagem da amostra é utilizado para transportar a amostra do local de coleta para o laboratório de análise. Uma das principais vantagens desse modo de operação é evitar o transporte de grandes volumes de amostra para o laboratório analítico.

9

Em geral, existem quatro etapas no procedimento da SPE: i) ativação do material sorvente, deixando os sítios ativos disponíveis e condicionamento do cartucho, para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; ii) adição da amostra; iii) remoção de interferentes e iv) eluição / dessorção dos analitos com um pequeno volume de solvente. O formato mais popular em SPE é o cartucho de extração, que é composto basicamente de uma seringa plástica (polipropileno), dentro da qual o sorvente fica retido entre dois discos de polietileno. Além desse formato, há também os discos e placas, entre outros [1]. A Figura 1 ilustra as principais etapas envolvidas na SPE, operada no modo isolamento do analito de interesse, utilizando cartuchos de extração.



Figura 1: Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida, operada no modo isolamento do analito. Etapas: 1, ativação e condicionamento do sorvente; 2, adição da amostra; 3, remoção dos interferentes e 4, dessorção dos analitos.

A seleção da fase sólida em SPE é um dos parâmetros mais importantes quando se trabalha com essa técnica e está condicionada à polaridade dos analitos de interesse. Primeiramente, deve-se levar em consideração as informações a respeito dos analitos de interesse, bem como da matriz que se vai analisar. Se o analito for polar, por exemplo, o sorvente escolhido deverá ter característica polar ou moderadamente polar.

Atualmente, existem muitos sorventes disponíveis comercialmente e dentre eles destacam-se os sorventes à base de sílica quimicamente ligada (fase normal, fase reversa e troca iônica) [2]. A Tabela 1 ilustra as fases sólidas (extratoras) mais comuns disponíveis comercialmente.

Os analitos podem ser divididos em dois grupos: a) solúveis em solventes orgânicos e b) os solúveis em água. Os solúveis em solvente orgânico são classificados de acordo com sua polaridade, enquanto que os solúveis em água são classificados como iônicos e não iônicos. Se o analito for polar, a fase sólida escolhida deve ser do tipo fase normal (NP, do inglês *Normal Phase*). Nesse caso, a fase extratora é mais polar do que o solvente. Para amostras solúveis em solventes apolares, deve-se optar por uma fase extratora menos polar. Nesse caso, o solvente de dessorção será mais polar do que a fase extratora. Esse modo de separação é denominado fase reversa (RP, do inglês *Reversed Phase*). As fases sólidas do tipo RP mais populares atualmente são as sílicas quimicamente ligadas a grupos octadecilssilano (C_{18}) e octilssilano (C_8) [3], sendo utilizadas em diversas aplicações [4].

Tabela 1: Fases sorventes mais utilizadas em SPE para analitos solúveis em solventes orgânicos e água.

Polaridade do solvente	Fase extratora	
a) solúvel em solvente orgânico		
	Amino (NH ₂)	
Madaradamanta Dalar	Ciano (CN)	
Moderadamente Polar	Diol (COHCOH)	
	Alumina (Al ₂ O ₃)	
Polar	Sílica Gel (SiO ₂)	
	Florisil (Mg ₂ SiO ₃)	
	Octadecila (C ₁₈)	
Amalan	Octila (C ₈)	
Apolar	Cicloexila (C ₆ H ₁₂)	
	Fenila (C ₆ H ₆)	
b) solúvel em água		
	Ciano (CN)	
Iônico → catiônico	Ácido carboxílico (COOH)	
	Ácido sulfônico (C ₆ H ₆ -SO ₃ H)	
Iônico → aniônico	Amino (NH ₂)	
Não jônico	Idem analito solúvel em solvente	
INAU IUIIICU	orgânico	

1.1.1 Mecanismos de separação

Os mecanismos de separação utilizados em SPE são os mesmos utilizados na cromatografia líquida clássica, sendo que a escolha da fase extratora vai depender da natureza do(s) analito(s) de interesse e da matriz. Os mecanismos de separação mais empregados em SPE são troca iônica, partição, adsorção e exclusão por tamanho [5]. A seguir, serão descritas as principais forças químicas que atuam entre analito e sorvente, que estão associadas aos mecanismos de separação.

As ligações de hidrogênio são interações que ocorrem entre átomos de hidrogênio e átomos com elevada eletronegatividade, como oxigênio, nitrogênio e enxofre, por exemplo. As forças de dispersão de van der Waals ocorrem entre moléculas de baixa polaridade. Essas moléculas têm suas nuvens eletrônicas deformadas, gerando um dipolo induzido. Esse dipolo não é permanente, só ocorrendo enquanto a ligação entre as moléculas permanece. As forças dipolo-dipolo ocorrem com moléculas polares e são resultado das interações entre dipolos permanentes, que surgem da diferença de eletronegatividade entre as moléculas. As interações iônicas possuem caráter eletrostático, e são muito utilizadas para o isolamento de compostos com caráter ácido ou básico, presentes em solução aquosa.

Na partição, as fases extratoras utilizadas são quimicamente ligadas, onde um filme líquido (fase extratora) recobre um suporte sólido. Um dos suportes mais utilizados é a sílica. As interações são baseadas nas diferentes solubilidades dos analitos e os grupos orgânicos que podem ser simplesmente cadeias de hidrocarbonetos, cadeias de hidrocarbonetos ligadas a compostos polares até troca iônica [6].

Outro mecanismo envolvido na SPE é a adsorção. Quando se utiliza um adsorvente sólido, como sílica ou alumina, a adsorção do analito ocorre na interface entre o sólido e o solvente, já que o sólido possui grupos ativos na sua superfície.

Nas últimas décadas, a SPE tem sido empregada em laboratórios analíticos como um recurso excelente para extração de diversos compostos em diferentes matrizes. Várias classes de substâncias têm sido extraídas e separadas de acordo com suas propriedades físico-químicas através desta técnica [7-9]. Apesar da grande disponibilidade de sorventes disponíveis comercialmente para SPE, um problema ainda persiste. Com os sorventes clássicos como as n-alquil-sílicas ou copolímeros altamente entrecruzados, a retenção é baseada em interações hidrofóbicas. Isso implica que a seletividade é baixa para análise de traços em amostras complexas, quando interferentes estão presentes altas concentrações [10]. OS em Consequentemente, com baixa seletividade, os interferentes presentes na matriz são coextraídos, juntamente com os analitos alvo. Vários estudos foram realizados na tentativa de desenvolver novos sorventes, que apresentem aplicações mais específicas [11-16]. A técnica de SPE tem sido empregada em associação com o princípio antígeno-anticorpo para separação de diversos compostos [17-19]. Essa separação é baseada no reconhecimento molecular. Anticorpos são produzidos pelo sistema imunológico de vertebrados, quando estão presentes no organismo moléculas estranhas (antígeno). Esses anticorpos são ligados a um material sorvente apropriado, que são alocados em cartuchos de extração para SPE (imunossorventes). Esses sorventes permitem isolar as espécies de interesse de forma seletiva, evitando a coeluição de espécies interferentes.

Em uma síntese de um imunossorvente, a primeira etapa é desenvolver anticorpos com habilidade em reconhecer um analito específico ou grupo de analitos. Os anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imunológico em resposta à presença do antígeno. Posteriormente os anticorpos são imobilizados em suportes sólidos inertes (geralmente sílica). Apesar da elevada seletividade, esses materiais apresentam desvantagens como custo elevado, instabilidade dos sorventes, dificuldade na obtenção dos materiais, entre outros [20]. Além disso, a aplicação

14

desses materiais em análises ambientais é relativamente recente devido às dificuldades em sintetizar anticorpos seletivos para pequenas moléculas [10]. Para minimizar essas limitações, os materiais biológicos podem ser substituídos por materiais sintéticos.

1.2 Polímeros de impressão iolecular

1.2.1 Fundamentos

O fenômeno do reconhecimento molecular pode ser definido como a ligação preferencial de um composto a um receptor com alta seletividade sobre outros analitos. Os exemplos de reconhecimento molecular encontrados na natureza têm inspirado alguns pesquisadores em desenvolver receptores sintéticos com alta seletividade ou especificidade para analitos alvo. Esses materiais sintéticos com sítios de reconhecimento produzidos artificialmente são conhecidos como Polímeros de Impressão Molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*). Os MIP apresentam algumas vantagens quando comparados com os imunossorventes, como maior estabilidade e robustez.

O processo de impressão molecular é composto de três etapas [21]:

i) Preparação de um complexo entre monômeros funcionais e analito alvo (também conhecido como *template*) através de ligações covalentes ou não covalentes.

ii) Polimerização do conjugado monômero-template.

iii) Remoção do template do material polimérico.

O processo de impressão molecular está ilustrado na Figura 2. Na primeira etapa, os monômeros funcionais e a molécula de *template* interagem, formando um complexo estável monômero-*template* (M-T). Posteriormente ocorre a polimerização, juntamente com um monômero reticulante ao redor do complexo M-T, produzindo

um polímero mecanicamente estável. Na terceira etapa, as moléculas de *template* são removidas do polímero, deixando neste microcavidades com tamanho, forma e estrutura complementar ao *template*. Sob condições próprias, o analito alvo ou análogos estruturais a ele são extraídos seletivamente.



Figura 2: Ilustração esquemática do processo de impressão molecular. Adaptado de [21].

1.2.2 <u>Um breve histórico sobre impressão molecular</u>

A ideia em utilizar uma molécula alvo como *template* para se ligar seletivamente a um sítio de reconhecimento foi sugerida primeiramente por Mudd em 1932 [22] e Pauling em 1940 [23] para explicar como funcionava o sistema imunológico [24].

O primeiro procedimento de síntese de materiais com impressão molecular foi baseado em sílica-gel. Em um estudo, Polyakov [25] descreveu que a estrutura porosa da sílica era influenciada pela presença de benzeno, tolueno e xileno (BTX) em um processo de secagem. A adsorção da sílica gel em diferentes solventes era dependente da estrutura do solvente presente durante o processo de secagem. Consequentemente, uma maior seletividade era alcançada com mudança na estrutura da sílica, que era induzida por um determinado solvente.

Em 1942 Pauling e Campbell [26] descreveram o preparo de anticorpos artificiais usando moléculas de antígeno como *template*. Em 1949, Dickey [27] publicou o primeiro trabalho demonstrando a afinidade de algumas moléculas por sílica gel. Nesse trabalho, foi preparada sílica gel através de impressão com sílica com alaranjado de metila. Após algumas extrações, foi comprovado que este material adsorvia maior quantidade de alaranjado de metila, quando comparado com um gel em branco.

1.2.3 Estratégias de síntese dos polímeros com impressão molecular

Durante o processo de impressão molecular são formados polímeros altamente entrecruzados ao redor da molécula de *template*, que são posteriormente removidas. Na mistura de pré-polimerização, o analito interage com os monômeros funcionais através de ligações covalentes, não covalentes ou interações com metais coordenados, formando um complexo estável. Consequentemente, a impressão molecular pode ser classificada de acordo com o tipo de interações entre monômeros funcionais e analito alvo na mistura pré-polimerização. Os procedimentos de impressão são: (i) impressão covalente, (ii) impressão não-covalente e (iii) impressão semi-covalente (Figura 3).



Figura 3: Princípios da Impressão Molecular. **A**: impressão não covalente. B: impressão covalente / semi-covalente.

A associação entre as moléculas do *template* e monômeros funcionais é baseada em dois tipos de interações: covalentes ou não covalentes. O procedimento covalente foi introduzido por Wullf e Sarchan [28], e envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre *template* e monômeros funcionais antes da polimerização. O *template* é removido do polímero por clivagem das ligações covalentes. A alta estabilidade das ligações formadas entre *template* e monômeros leva a formação de uma grande quantidade de sítios de ligação homogêneos, minimizando a existência de sítios de ligação não específicos. Entretanto, esta abordagem é bastante restritiva, já que não é fácil preparar um complexo M-T no qual a formação e clivagem das ligações covalentes são facilmente reversíveis em condições brandas. Uma alternativa seria utilizar o procedimento semi-covalente [29,30]. Nesse caso, o *template* é covalentemente ligado ao monômero funcional, mas o religamento do mesmo em uma eventual extração é baseado em interações não covalentes.

O procedimento não covalente foi introduzido por Arshady e Mosbach [31]. As interações não covalentes ocorrem entre grupos funcionais específicos nos monômeros polimerizáveis e o *template* na mistura de pré-polimerização. Essas

18

interações podem ser do tipo ligações de hidrogênio, iônicas e interações hidrofóbicas, entre outras. A complexação é alcançada misturando-se *template*, monômeros funcionais e reagentes reticulantes em um solvente. Esse procedimento é o mais utilizado para o preparo dos MIP, pois é mais simples e aplicável a uma maior gama de compostos. Os diferentes monômeros disponíveis comercialmente podem interagir com um grande número de analitos alvo através de ligações não covalentes. Contudo, o procedimento não covalente não é isento de alguns inconvenientes pelo fato das interações entre monômero e *template* serem governadas por um processo de equilíbrio. Assim, para deslocar o equilíbrio no sentido de formação do complexo M-T é necessário utilizar uma grande quantidade de monômero funcional. Consequentemente, o excesso de monômeros livres é incorporado à matriz polimérica levando a formação de sítios de ligação não específicos.

1.2.4 Impressão molecular covalente

Como já foi relatado, a impressão molecular covalente refere-se a estratégias de preparo dos materiais com impressão molecular nas quais o *template* e uma ou mais unidades polimerizáveis estão ligados por ligações covalentes formando um complexo através de reações químicas em uma etapa independente da formação do polímero [32]. A copolimerização do complexo M-T com outros componentes reacionais (agentes reticulantes, solventes, etc) resulta em um polímero no qual o *template* está covalentemente ligado à estrutura polimérica. As etapas de remoção e religamento do(s) analito(s) alvo irão envolver reações químicas.

1.2.4.1 Impressão através de ligações covalentes reversíveis

Os métodos clássicos de impressão covalente envolvem reações de condensação reversíveis com ésteres de boronato, cetais ou acetais e formação de Bases de Schiff para o preparo dos complexos M-T. O método de impressão através de ligações covalentes reversíveis envolve condições aquosas suaves para hidrolisar o *template* de um polímero. A Tabela 2 ilustra exemplos típicos de estruturas de complexos M-T usados na impressão covalente reversível. Em (**a**) está ilustrado um complexo M-T derivado de ácido glicérico. Esse *template* foi impresso através da combinação das interações entre éster de boronato com uma amida. Em (**b**) está ilustrado éter bis-boronato de castasterona; em (**c**) base de Schiff de fenilalanina anilida com 4-vinilbenzaldeído e em (**d**) bis-cetal de 1,3-diacetilbenzeno com um diol polimerizável.



Tabela 2: Exemplos de estruturas de complexos M-T usados na impressão covalente reversível
Nesse método de impressão, os sítios de ligação são semelhantes e como não há excesso de monômeros funcionais no meio reacional, o número de sítios de ligações não específicos é reduzido, já que os grupos funcionais que definem os sítios de reconhecimento estão ligados ao *template*.

A impressão covalente com ésteres de ácido borônico é um dos métodos de impressão covalente mais bem sucedido e foi desenvolvido por Wulff e Sarhan. [33]. Os ésteres de ácido borônico são sintetizados a partir de ácido borônico e cis-1,2-compostos diol. Os *templates* impressos utilizando esse procedimento incluem ácido glicérico [33], derivados de manose [37], galactose e frutose [38], ácido siálico [39], entre outros (Figura 4).



Figura 4: Sítios de ligação em um polímero impresso com ácido siálico utilizando ácido 4vinilfenil borônico como monômero funcional [39].

A impressão covalente com bases de Shiff envolve a condensação de uma amina primária com um composto carbonílico (geralmente um aldeído). Compostos derivados de aminoácidos têm sido impressos com sucesso através desse método (Figura 5) [40,41].



Figura 5: Impressão molecular usando base de Schiff como monômero funcional. Adaptado de [41].

A formação de cetais ou acetais entre compostos carbonílicos e dióis tem sido empregada em procedimentos de impressão molecular [42]. Cetonas e aldeídos reagem com compostos 1,3-diol, produzindo cetais e acetais que são utilizados como monômeros funcionais. Shea e Sasaki [43] descreveram a impressão molecular utilizando um diol polimerizável como grupo ligante. Eles sintetizaram um conjugado entre um analito alvo que possuía um grupo carbonila e um monômero funcional que tinha em sua estrutura um grupo 1,3 diol (Figura 6).



Figura 6: Impressão molecular usando cetal como monômero funcional. Adaptado de [43].

1.2.4.2 Impressão com ligações covalentes fortes

Os primeiros trabalhos conduzidos por Damen e Neckers [44,45] e Shea e Thompson [46] empregaram estratégias nas quais foram utilizadas ligações covalentes fortes (ligações com ésteres) para produzir o complexo M-T, seguido da incorporação em matrizes baseadas em divinilbenzeno. O objetivo desse estudo foi descobrir como os sítios de ligação eram formados. O *template* só foi removido com sucesso através do tratamento com reagente para clivagem química ou por reações de hidrólise.

1.2.4.3 Impressão semi-covalente

Nesse tipo de impressão, o *template* é covalentemente ligado aos monômeros funcionais na mistura de pré-polimerização. Porém, em um uma eventual extração, o

analito alvo (ou análogos estruturais a ele) são não covalentemente ligados. Existe um inconveniente relacionados a esse modo de impressão. A remoção do *template* (geralmente por hidrólise) não é simples. Bystrom *et al.* [47] prepararam um polímero com impressão molecular utilizando o modo de impressão semi-covalente. Eles demonstraram ser impossível remover os *templates* das matrizes poliméricas por reações de hidrólise. Os *templates* só puderam ser removidos através de redução com LiAIH₄. Sellergren e Andersson [48] utilizaram um procedimento semelhante com um *template* de diéster para criar um sítio de impressão para éster etílico de *p*-aminofenilalanina. Nesse caso, o *template* foi removido com sucesso através de clivagem.

1.2.4.4 Impressão com espaço sacrificial

O método de impressão com espaço sacrificial foi introduzido por Whitcombe *et al.* em 1995 [49]. O grupo carbonila de um éster de carbonato foi utilizado na impressão de colesterol. Nesse exemplo, carbonato de colesteril(4-vinil)fenil foi o complexo M-T, que foi copolimerizado com dimetacrilato de etilenoglicol (EDMA). A remoção do *template* foi feita através de hidrólise com NaOH em metanol, com perda de CO₂ gerando um sítio de ligação não covalente. A religação do colesterol dissolvido em solventes apolares ocorreu por ligações de hidrogênio entre sítios de ligação presentes no polímero (grupos 4-vinilfenol) e os grupos hidroxila do colesterol (Figura 7). Procedimentos similares podem ser usados para introduzir outros grupos funcionais como amino-, amido-, tiol-, entre outros.



Figura 7: Impressão de colesterol pelo método de espaço sacrificial: (a) complexo M-T carbonato de colesteril (4-vinil)fenil é polimerizado com EDMA em um solvente; (b) template permanece ligado covalentemente a matriz polimérica; (c) remoção do *template* por hidrólise alcalina com perda de CO_2 e formação do grupo fenólico ligado ao polímero e (d) religação não covalente do *template* através de ligações de hidrogênio [49].

1.2.5 Impressão molecular não covalente

O procedimento não covalente é considerado o método de impressão molecular mais popular e tem sido aplicado a uma grande variedade de moléculas de *template*. Essa elevada popularidade pode ser explicada pela alta versatilidade e aplicabilidade desse procedimento. As forças de atração típicas que ocorrem na impressão não covalente são ligações de hidrogênio, interações do tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e forças de dispersão (ver Tabela 3). As ligações de hidrogênio são interações com intensidade mediana e ocorrem naturalmente nas interações não covalentes. Quando analisada individualmente, a ligação de hidrogênio pode ser considerada fraca, comparada a ligações covalentes. Porém, quando existem vários pontos de interações simultâneos, essa aparente labilidade é minimizada. A Tabela 4 mostra exemplos de grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio.

Força relativa	
Média / forte	
Média / fraca	
Fraca	
	Força relativa Média / forte Média / fraca Fraca

Tabela 3: Tipos	de ligações q	jue ocorrem no	procedimento	não-covalente
-----------------	---------------	----------------	--------------	---------------

Tabela 4: Grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio

Doador	Aceptor
O – H	O = P
$N^+ - H$	O = S
N – H	O = C
S – H	N N O
С – Н	s

O uso da impressão molecular não covalente teve sua popularização com os trabalhos do grupo de Mosbach em 1980, que mostrou que esse procedimento era viável para produzir receptores impressos em polímeros sintéticos [50].

Na impressão não covalente, é formado um complexo estável entre *template* e monômeros funcionais, que é posteriormente incorporado à cadeia polimérica. Durante a polimerização, pequenas seções da estrutura polimérica irão desenvolver grupos funcionais múltiplos que terão sua configuração e localização influenciada pela presença do *template* [32].

1.2.5.1. Natureza do complexo formado entre monômero e template

O grande número de sítios de interação entre monômeros funcionais e *template* na mistura de pré-polimerização quando são utilizados *templates* multifuncionais demonstram a complexidade desse procedimento. A Figura 8 mostra alguns exemplos propostos na literatura [51-54]. Em (**a**) está ilustrado a impressão não-covalente de um derivado dipeptídico através de interações não covalentes com ácido metacrílico. Também estão ilustrados complexos formados através de interações não-covalentes para impressão de (**b**) morfina (ácido metacrílico foi usado como monômero), (**c**) fenilalanina (2-vinilpiridina e ácido metacrílico foram usados como combinação de monômeros funcionais) e (**d**) triptofano (acrilamida foi usada como monômero). Na impressão não covalente de morfina (**b**), a formação do complexo M-T se dá através de ligações de hidrogênio e interação com par iônico. Na impressão de triptofano, a acrilamida (monômero) é eletrostaticamente neutra e possui sítios aceptores e doadores de hidrogênio.



Figura 8: (a) Impressão molecular não covalente e um derivado dipeptídico. Formação de complexo entre *template* e ácido metacrílico. (b) Impressão de morfina com ácido metacrílico, (c) impressão de fenilalanina com 2-vinilpiridina e ácido metacrílico e (d) impressão de triptofano com acrilamida [54].

Fatores como a polaridade e força da ligação de hidrogênio do solvente, bem como a temperatura de polimerização irão afetar as interações. Em geral, ligações de hidrogênio são favorecidas por solventes com baixa constante dielétrica e temperaturas baixas. Já interações dipolares fortes são favorecidas por solventes polares. Na prática, é necessário estabelecer um compromisso entre polaridade de solvente e solubilidade do *template* [55].

1.2.5.2 Impressão não covalente com um monômero funcional

O procedimento de impressão não covalente que utiliza apenas um monômero funcional é um dos mais simples e mais utilizados. Entretanto, a natureza do complexo formado na mistura de pré-polimerização não é simples e o número de interações deve ser levado em conta. Assim como é desejável que ocorra interações entre monômero funcional e *template*, também podem ocorrer interações tanto do *template* com o reagente reticulante, quanto do monômero com o reticulante, embora isso não seja desejável.

Durante os últimos 20 anos, têm sido utilizados diferentes monômeros funcionais, utilizando impressão não covalente [56]. Alguns materiais foram utilizados em aplicações específicas, enquanto que outros apresentaram grande utilidade. Alguns exemplos podem ser encontrados na Tabela 5. Mosbach e colaboradores [57] demonstraram que acrilamida forma mais facilmente ligações de hidrogênio do que ácido metacrílico, sob condições de baixa polaridade. Porém, sob condições aquosas, interações hidrofóbicas e eletrostáticas são mais importantes do que ligações de hidrogênio, fazendo com que os polímeros baseados em ácido metacrilico demonstrassem um reconhecimento superior.

29

Monômero	Aplicação / Referência
Acrilamida	Impressão de derivados de aminoácidos [57]
Ácido metacrílico (MAA)	Impressão de morfina [58], derivados de monossacarídeos [59]
Ácido p-vinilbenzóico	Impressão de derivados de aminoácidos [60]
Ácido triflurometilacrílico F F OF $OOOOO$	Impressão de atrazina [61], nicotina [62]
Ácido acrílico	Impressão de derivados de aminoácidos [63]
Ácido itacônico OHOHOH	Impressão de bloqueadores β [64,65]
Metacrilato de dimetilaminoetila $ \begin{array}{c} $	Impressão de templates ácidos [66]

Tabela 5: Estruturas de monômeros usados no procedimento de impressão não covalente.

Muitos sistemas poliméricos têm sido desenvolvidos e usados na impressão molecular. Os monômeros funcionais mais utilizados já foram mencionados na Tabela 5. Outros monômeros funcionais encontrados na literatura encontram-se ilustrados na Figura 9. Os monômeros funcionais mais utilizados são os ácidos carboxílicos (ácido ácido vinilbenzóico) acrílico. ácido metacrílico. e bases heteroaromáticas (vinilpiridina, vinilimidazole).



1-Vinil imidazole

4-Vinil piridina

2-Vinil piridina

Figura 9: Monômeros funcionais típicos utilizados na tecnologia de impressão molecular.

1.2.5.3 Impressão não covalente com uma combinação de monômeros

Uma alternativa atrativa para a síntese dos MIP é utilizar uma combinação de diferentes monômeros funcionais. As interações entre *template* e monômeros funcionais deve ser mais forte do que qualquer interação entre os monômeros funcionais.

Muitos métodos de impressão utilizam misturas de monômeros, sendo que podem ser encontrados muitos exemplos na literatura. Ramstrom et al. [67] utilizaram misturas entre ácido metacrílico e 2-vinilpiridina para impressão de derivados de aminoácidos. Nesse trabalho eles compararam o desempenho seletivo de materiais preparados utilizando somente um dos monômeros (ácido metacrílico ou 2vinilpiridina) e a mistura dos monômeros. O polímero preparado com a mistura de ácido metacrílico e 2-vinilpiridina demonstrou ser mais eficiente e seletivo para os derivados de aminoácidos (Tabela 6). Meng et al. [68] estudaram polímeros de impressão molecular preparados pela mistura dos monômeros acrilamida e 2vinilpiridina. Essa mistura de monômeros foi utilizada para o preparo de vários materiais impressos utilizando diferentes *templates*.

Tabela 6: combinação de monômeros usados no procedimento de impressão não covalente.

Monômero	Aplicação / Referência
Ácido metacrílico + 2-vinilpiridina $\downarrow \downarrow \downarrow 0$ + $\downarrow \downarrow \downarrow 1$	Impressão de derivados de aminoácidos [67]
Acrilamida + 2-vinilpiridina N N N N N N N N	Impressão de derivados de aminoácidos [68]

1.2.6. Vantagens e desvantagens da impressão covalente e não covalente

Petcu *et al.* [69] compararam as metodologias de impressão molecular covalente e não covalente. Nesse trabalho os autores prepararam e caracterizaram polímeros impressos com propofol, utilizando os procedimentos covalente e não covalente. Os resultados obtidos mostraram que com o procedimento covalente houve um número baixo de ligações não especificas, ficando em torno de 2 %.

A Tabela 7 mostra as diferenças entre esses procedimentos de impressão.

Impressão covalente	Impressão não-covalente
Dificuldade em encontrar um sistema para cada <i>template /</i> clivagem do <i>template</i>	Facilidade no preparo e aplicação a uma maior gama de <i>templates</i>
80 a 90 % das cavidades vazias podem	10 a 15 % das cavidades vazias podem
ser reocupadas	ser reocupadas
90 % das moléculas do template	Um excesso de grupos ligantes pode
incorporadas ao MIP podem ser clivadas	ser distribuído não especificamente
O religamento do template pode não ser	Interações não covalente são
rápido ou reversível	rapidamente reversíveis
Grupos ligantes estão localizados nas cavidades	Mais de 75 % dos grupos ligantes estão situados fora das cavidades vazias

Tabela 7: Comparação entre MIP via impressão covalente e não covalente [24].

Em geral, o preparo de materiais via impressão não covalente é mais fácil e aplicável a uma maior variedade de *templates*. Porém, a qualidade da impressão utilizando o procedimento covalente é superior, com um número menor de ligações não seletivas. Na impressão covalente, é necessária uma etapa de síntese química para ligar os moléculas de *template* aos monômeros funcionais. Além disso, ele deve ser removido através da clivagem das ligações com os monômeros funcionais, que geralmente envolve um processo laborioso.

Ao contrário do procedimento covalente, os polímeros impressos pelo modo não covalente possuem sítios de ligação mais heterogêneos, com baixa quantidade de sítios de ligação específicos. Consequentemente, o desempenho do polímero é prejudicado. Porém, devido ao procedimento relativamente simples de preparo comparado ao procedimento covalente e alta aplicabilidade, o procedimento não covalente é o mais utilizado atualmente.

1.2.7 A escolha do analito alvo

Um dos atrativos da impressão molecular é que ela pode ser aplicada a uma enorme variedade de *templates* (Tabela 8). A impressão de moléculas pequenas (fármacos, pesticidas, açúcares, esteróides, entre outros) já é bem estabelecida [70]. Porém a impressão de compostos orgânicos grandes ainda é um desafio (p.ex. impressão de proteínas). Nos procedimentos de impressão convencionais, traços do *template* permanecem ocluídos no material mesmo após procedimentos exaustivos de remoção [71]. Isso pode ocasionar em futuros problemas quando esses materiais são aplicados na quantificação do analito alvo. Para minimizar esse problema, pode ser utilizado como *template* um análogo estrutural ao analito alvo, deixando no polímero sítios de ligação específicos para o analito alvo.

O *template* deve possuir funcionalidades que interagem com os grupos funcionais dos monômeros. Além disso, ele deve ser estável e inerte durante a polimerização e não deve interferir em eventuais quantificações do analito alvo [72,73].

Classe de compostos	Exemplo	Classe de compostos	Exemplo
	Timolol [74]	Pesticidas	Atrazina [80]
Fármacos	Diazempan [75]		Simazina [81]
i amacos	Morfina [76]		Fenilalanina [82]
	Efedrina [77]	Aminoácidos	Triptofano [83]
	Cortisol [78]		Tirosina [84]
Hormônios	Encefalina [79]	Bases	Adenina [85]
		nucleotídicas	

Tabela 8: Exemplos de compostos utilizados como *templates* nos procedimentos de impressão molecular.

1.2.8 Reagentes Reticulantes

Para que a impressão molecular seja eficiente, é necessária que a reatividade do reagente capaz de formar ligações cruzadas (reticulante) seja similar a reatividade dos monômeros funcionais. O reagente reticulante é usado para formar uma estrutura rígida tridimensional ao redor da molécula de *template* produzindo cavidades estáveis. O reticulante é o responsável pelo controle da morfologia do MIP além de estabilizar os sítios de ligação e a estrutura mecânica do polímero [87].

A escolha do reticulante apropriado determina o sucesso da impressão molecular. Também é particularmente importante a escolha da razão molar entre reticulante e monômero funcional. Se essa razão molar for baixa, os sítios de ligação podem ficar muito perto uns dos outros, de forma que a impressão molecular possa ser prejudicada. Se a razão molar for alta, os reticulantes podem interagir com o *template* [24].

Nos trabalhos encontrados na literatura, poucos reticulantes têm sido utilizados. Para impressão molecular em solventes orgânicos, etileno glicol dimetacrilato e *p*divinilbenzeno são muito utilizados [88]. Quando a impressão molecular ocorre em meio aquoso, é utilizado N,N-metileno bisacrilamida . Outros reagentes reticulantes estão ilustrados na Figura 10.



Dimetacrilato de etilenoglicol

Figura 10: Agentes reticulantes típicos utilizados na impressão molecular.

1.2.9 Solventes

A escolha do solvente utilizado no procedimento de impressão molecular é muito importante. O solvente deve dissolver os reagentes utilizados na polimerização. Além disso, ele não pode interferir na formação do complexo M-T, o que pode resultar na formação de sítios de ligação pouco seletivos e em pequeno número.

A escolha do solvente irá depender do procedimento de impressão utilizado. No procedimento covalente, podem ser utilizados vários tipos de solvente, desde que dissolva os componentes reacionais. Já para o procedimento não covalente, a escolha do solvente deve ser feita com maior cuidado, já que ele promove a formação de adutos não covalentes entre os monômeros funcionais e o *templat*e, aumentando a eficiência do processo de impressão.

A presença ou ausência do solvente determina as características do polímero de impressão molecular formado. Polímeros preparados na ausência de solventes são densos, enquanto que polímeros preparados na presença de solventes são mais porosos. Na polimerização, as moléculas de solvente são incorporadas no interior do polímero e são removidas posteriormente. Durante a remoção do solvente, o espaço originalmente ocupado pelas moléculas de solvente fica vazio, gerando um polímero poroso.

A impressão em água possui alguns problemas devido ao fato da solubilidade limitada de alguns reticulantes. Alguns reticulantes como metileno-bis-acrilamida e etileno-bis-acrilamida foram utilizados, porém esses compostos possuem solubilidade limitada em água. O reticulante mais utilizado quando se preparam MIP em solução aquosa é o N, N-diacriloilpiperazina, que possui uma maior solubilidade em água [89]. A síntese de um MIP em meio aquoso ainda apresenta um problema, que pode ser atribuído à formação de interações fracas entre os monômeros e *template*, o que diminui a afinidade e a seletividade do polímero [90].

1.2.10. A matriz de Impressão

A maioria dos trabalhos que envolvem impressão molecular descrevem polímeros orgânicos sintetizados via polimerização radicalar de monômeros funcionais e reticulantes contendo grupos vinílicos ou acrílicos. Isso ocorre pois a síntese desses monômeros é relativamente simples e eles são disponíveis comercialmente em grandes quantidades. Esses monômeros podem ser básicos (p.ex. vinilpiridina), ácidos (por exemplo, ácido metacrílico), ou carregados (positivamente ou negativamente). Além disso podem ter ligações de hidrogênio (por exemplo, acrilamida), ligações hidrofóbicas (por exemplo, estireno), etc. [91].

Comparado com os anticorpos, enzimas ou receptores biológicos, os MIP possuem vantagens como robustez, baixo custo e seletividade alta. Apesar dessas vantagens, a tecnologia de impressão molecular ainda precisa superar algumas limitações como efetiva remoção do template, baixa acessibilidade aos sítios de ligação, baixa capacidade de ligação e existência de sítios de ligação não específicos [92]. Como o reconhecimento biológico e a maioria das amostras com interesse ambiental ocorrem em sistemas aquosos, é particularmente importante que o MIP possa operar seletivamente na presença de água. Além disso, as aplicações de MIP estão restritas frente ao uso de solventes orgânicos para dissolução dos monômeros acrílicos ou vinílicos. Moléculas de *template* que são solúveis somente em água não podem ser impressas por esse meio. Outro problema é que a impressão de moléculas grandes, como proteínas por exemplo, ainda é um desafio a ser superado. A natureza hidrofóbica e a estrutura altamente entrecruzada dos polímeros limita o acesso de moléculas grandes aos sítios de ligação. Ainda, o preparo dos MIP em sistemas aquosos é desafiador devido à interferência das moléculas de água, que interage com os monômeros e template [93]. Para superar essas limitações, a tecnologia sol-gel pode ser aplicada na impressão molecular.

1.3. O Processo Sol-gel

O uso do processo sol-gel (PSG) para produzir novos materiais em aplicações analíticas tem atraído considerável interesse dos pesquisadores. A combinação de compostos inorgânicos e orgânicos torna acessível uma nova classe de materiais com diferentes propriedades. A tecnologia sol-gel pode ser utilizada para o preparo desses materiais. Ela foi descoberta em 1800 e citada em 1846 quando Eibemen obteve sílica

gel à partir da interação da sílica e umidade do ar. Essa tecnologia foi utilizada um século depois por uma indústria de vidros alemã que descobriu a viabilidade no preparo de vidros utilizando-se reações controladas de hidrólise e condensação. Vidros com alta pureza e homogeneidade eram preparados a baixas temperaturas, permitindo a incorporação de metais ou polímeros inorgânicos. Posteriormente o PSG passou a ser utilizado em diversas áreas: sensores, condutores, eletroquímica, etc.

O processo sol-gel é uma rota de síntese de materiais onde num determinado momento ocorre uma transição do sistema *sol* para um sistema *gel*. O termo **sol** é definido como uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido, enquanto o termo **gel** pode ser visto como sendo um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios.

O interesse nos materiais obtidos através da rota sol-gel não está somente relacionada às propriedades dos materiais, mas também a facilidade no seu preparo. O PSG pode ser utilizado para o preparo de (i) sistemas híbridos, onde as moléculas são orgânicas ou polímeros de baixa massa molar, etc. e (ii) materiais híbridos orgânicoinorgânicos. Esses últimos podem ser preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais com uma larga faixa de aplicações. Os materiais híbridos são materiais de grande interesse, sendo amplamente empregados devido às suas propriedades mecânicas, óticas e térmicas, que combinam a estabilidade térmica e química dos materiais cerâmicos, com a processabilidade e a flexibilidade dos polímeros orgânicos e apresentam propriedades complementares daquelas que lhe deram origem. Durante as reações que ocorrem no processo sol-gel, podem ser adicionados ao meio reacional compostos orgânicos, que podem atuar como modificadores orgânicos, alterando as propriedades do material. Esses modificadores podem ser distribuídos homogeneamente pela matriz inorgânica. Nas últimas décadas, o crescente interesse no desenvolvimento de novos materiais levou à preparação das sílicas organicamente modificadas (ormosils) [94,95].

O PSG pode ser classificado dependendo da natureza do precursor utilizado em: (i) sais e (ii) alcóxidos. A rota que utiliza precursores do tipo alcóxido é a mais versátil. Nela, ocorre a hidrólise de uma solução de tetra ou trialcoxissilanos em um solvente orgânico, levando à formação de partículas com grupos silanóis reativos, as quais formam um sol via condensação, e a continuação do processo leva a formação de um gel [96].

O processo sol-gel possui duas etapas principais. A primeira delas é a hidrólise de um alcóxido metálico (precursor) seguido de reações de condensação dos grupos hidroxila, a qual leva a formação do sol e, consequentemente a do gel [96]. A Figura 11 ilustra as reações químicas que ocorrem durante a transformação sol-gel.



Figura 11: Reações químicas que ocorrem durante a síntese sol-gel.

Na presença de um catalisador, a hidrólise dos alcoxissilanos se dá de forma mais rápida e eficiente. As reações sol-gel tem início quando o precursor é misturado com água, na presença de um catalisador ácido ou básico. Geralmente as reações de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, assim que a hidrólise é iniciada. A hidrólise leva a formação de grupos silanóis (≡Si–OH), enquanto que as reações de condensação levam a formação de ligações siloxano (≡Si–O–Si≡). Do mecanismo que ocorre no processo sol-gel apenas a hidrólise é bem conhecida, pois as reações de condensação começam antes das reações de hidrólise terminarem, tornando o mecanismo muito complexo [96]. Durante a transformação sol-gel, a viscosidade da solução aumenta gradativamente até que a fase sol se torne interconectada de forma rígida, formando um gel. Durante o processo de secagem a pressão atmosférica, o solvente é removido, produzindo um xerogel (gel seco). O sistema, que é inicialmente fluido (sol) tem a viscosidade aumentada e a medida que as reações de hidrólise e condensação evoluem, o solvente evapora, formando a fase de gel. Esse processo é chamado de policondensação, que aumenta a interconectividade da rede, expulsando o solvente.

Precursores de fórmula geral, $R_{4-x}Si(OR)_x$, onde x=1–4, são obtidos comercialmente ou podem ser preparados via diferentes rotas sintéticas [97]. Os precursores mais utilizados são os trialcoxissilanos e tetraalcoxissilanos. Os trialcoxissilanos são utilizados como modificadores como o objetivo de melhorar as propriedades específicas do material, como a hidrofobicidade e a reatividade. Os tetraortoalcoxissilanos podem ser representados pela fórmula geral Si(OR)₄, sendo mais comuns os compostos formados a partir do metanol (tetrametilortossilicato, TMOS) e etanol (tetraetilortossilicato, TEOS). Ambos têm largo emprego na obtenção de novos materiais a partir do PSG possibilitando formar um composto com cadeias tridimensionais. Os dialcóxissilanos formam espécies cíclicas, não formando

41

cadeias entrecruzadas. Quando estes são combinados com tri ou tetraalcoxissilanos, agem como modificadores, aumentando a flexibilidade da matriz.

As reações de hidrólise e condensação ocorrem através de substituição nucleofílica nos átomos de silício. Como os alcóxidos de silício possuem baixa reatividade, é necessário utilizar catalisadores, que podem ser ácidos ou básicos, para aumentar as taxas de hidrólise e condensação [98]. As reações de hidrólise que ocorrem sob condições ácidas envolvem a protonação do grupo alcóxido seguido de ataque nucleofílico pela água para formar um intermediário pentacoordenado. Sob condições básicas, ocorre ataque nucleofílico nos átomos de silício através do ânion hidróxido para formar um intermediário pentacoordenado negativamente carregado.

O processo sol-gel é relativamente complexo, envolvendo diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, etc. As propriedades físicas do gel seco (como porosidade, área superficial, distribuição de poros) dependem de alguns parâmetros que ocorrem durante o PSG. São eles a razão molar entre água e silano, natureza e concentração do catalisador empregado e tipo de precursor empregado. A natureza do catalisador, ácido ou básico, influencia fortemente a cinética de reação, assim como a estrutura final do gel. Esses parâmetros afetam as taxas das reações de hidrólise e condensação e ditam as propriedades do material. Em geral, o uso de baixo pH e baixa quantidade de água levam a formação de um material denso, com baixa porosidade [99]. Sob catálise ácida, a condensação ocorre preferencialmente entre grupos silanóis localizados nos monômeros. Isso leva a formação de compostos predominantemente de cadeias lineares com baixos volumes de poros. Sob condições básicas, ocorre a formação de géis particulados, com grande porosidade intersticial.

O processo sol-gel possui inúmeras vantagens. Dentre elas destacam-se a alta estabilidade térmica dos materiais produzidos por essa tecnologia, preparo de materiais com porosidade controlada, possibilidade de obtenção de materiais com estrutura e propriedades desejadas através da seleção adequada do precursor, controle do tamanho e forma e propriedades das partículas. Além disso, as condições de preparo são fáceis, com uso de baixas temperaturas e os materiais obtidos são de alta pureza. Os ormosils podem facilmente ser preparados (e modificados) com diversas combinações dos componentes reacionais, alterando as propriedades do material resultante.

1.3.1 Impressão molecular em matrizes sol-gel

A maioria dos trabalhos que envolvem a impressão molecular encontrados na literatura descrevem o preparo de polímeros vinílicos ou acrílicos através de polimerização radicalar e que utiliza interações não covalentes. Existem poucos trabalhos publicados que utilizam materiais impressos preparados pelo PSG.

Em 1949, Dickey [27] publicou o primeiro documento demonstrando a impressão molecular em uma matriz sol-gel. Somente 48 anos depois, Pinel *et al.*[100] usaram a química sol-gel para imprimir um gel com mentol como *template*. Ao contrário dos experimentos realizados por Dickey, não houve diferença significativa entre os géis impresso e não impresso para a adsorção da molécula de *template*.

No procedimento não covalente, o *template* pode ser diretamente adicionado a solução sol-gel antes de ocorrerem as reações de hidrólise e policondensação. Quando se usam solventes polares (como etanol, por exemplo) e um precursor sol-gel apolar, os sítios de impressão são gerados por forças de van der Waals, forças eletrostáticas, entre outras. Conforme o solvente é evaporado, os sítios de impressão podem ser formados pela afinidade do *template* pela matriz sol-gel. O precursor deve ser selecionado rigorosamente para que ele forneça a porosidade adequada para facilitar a difusão do *template* para dentro e fora do gel. Após a formação do gel, este deve ser

43

submetido a lavagem com um solvente adequado para remoção do *template* (Figura 12). A hidrólise dos grupos alcóxidos na presença do *template*, seguida da condensação, resulta na formação de materiais híbridos altamente entrecruzados. Durante os processos de hidrólise, condensação e entrecruzamento, as moléculas de *template* se organizam nas cavidades do material amorfo (Figura 13). Nesse caso, a remoção do *template* leva a formação de sítios de ligação específicos capazes de sorver o analito alvo.



Figura 12: Impressão Molecular através do processo sol-gel [101].



Figura 13: Formação de um híbrido orgânico-inorgânico impresso não covalentemente. Adaptado de [101].

Assim como quando se preparam polímeros acrílicos, o procedimento covalente emprega ligações covalentes e envolve uma etapa de síntese química para ligar o precursor sol-gel a molécula de *template*. Esse conjugado é polimerizado usando um excesso de precursor. Quando o gel é formado, o *template* é clivado quimicamente e

removido, deixando um sítio de ligação que tem habilidade de se ligar a moléculas com formato e tamanho apropriados (Figura 14) [101].



Figura 14: Formação de um híbrido orgânico-inorgânico por impressão covalente. Adaptado de [101].

Para evitar que os sítios de ligação sejam modificados pelo processo de remoção do *template*, reagentes como H_2O_2 podem ser utilizados para destruir o

template. Quando se utilizam esses reagentes, pode ser necessário utilizar etapas de aquecimento e / ou uso de solventes orgânicos. Ainda, a eliminação de grupos reativos residuais nos materiais sol-gel, como os silanóis, por exemplo, pode ser feita utilizando-se reagentes capazes de realizar o capeamento. São eles o clorotrimetilssilano e o hexametildissilazano. O objetivo do capeamento é minimizar as interações não específicas.

1.4. Aplicações

1.4.1 Polímeros de impressão molecular aplicada a SPE (MISPE)

Como já foi mencionado, os sorventes disponíveis comercialmente para SPE possuem baixa seletividade, limitando o uso dessa técnica quando se necessita utilizar extrações seletivas em amostras complexas. Porém, essa limitação pode ser contornada quando se utiliza os polímeros de impressão molecular como materiais sorventes para Extração em Fase Sólida (MISPE, do inglês *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*). O procedimento de extração quando se usa MISPE é idêntico a um procedimento quando se utiliza SPE convencional e compreende etapas de condicionamento do cartucho, percolação da amostra, lavagem e eluição dos analitos. A capacidade de reconhecimento molecular do MIP deve ser avaliada em relação a um polímero não impresso (NIP, do inglês *Non-Imprinted Polymer*). Este material é sintetizado da mesma maneira que o MIP, com exceção da adição do *template*, funcionando como um polímero de controle.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos nos últimos anos demonstrando a utilidade dos procedimentos de MISPE na extração de compostos em diferentes amostras: biológicas, tecidos, água, solo e plantas. Há sete anos atrás, a maioria dos trabalhos sobre impressão molecular focava o preparo dos MIP e otimização dos procedimentos de SPE, enquanto que poucos focavam na aplicação desses materiais. O primeiro estudo empregando MISPE foi realizado por Sellergren [102] em 1994. Nesse trabalho foi preparado um MIP para extração seletiva de pentanamida (droga utilizada no tratamento de pneumonia para pessoas que possuem o vírus HIV) em amostras de urina. O material foi aplicado com sucesso na determinação de pentanamida, encontrada em baixas concentrações. A partir daí, vários grupos de pesquisa prepararam os MIP para extração de diversos compostos empregando SPE como técnica de extração.

Rath e Pereira [103] sintetizaram e caracterizaram um polímero de impressão molecular seletivo para fenitroína e utilizaram um procedimento de MISPE para determinar fenitroína em tomates por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). O polímero foi sintetizado a partir do ácido metacrílico (monômero funcional), dimetacrilato de etileno glicol (reagente de ligação cruzada ou reticulante), azo-bis-iso-butironitrila (iniciador radicalar) em diclorometano (solvente). O material apresentou seletividade e eficiência de extração satisfatórias demonstrando seu potencial para o preparo de amostras de tomate na determinação de resíduos de fenitrotiona por HPLC.

Moreno-Bondi e colaboradores [104] descreveram a síntese de um polímero de impressão molecular impresso com enrofloxacina (antibiótico) usando ácido metacrílico e metacrilato de 2-hidroxietila como combinação de monômeros funcionais e dimetacrilato de etilienoglicol como reticulante. O material foi aplicado na extração de cinco fluoroquinolonas em urina humana. Os autores obtiveram boa reprodutibilidade e recuperação na extração desses compostos. Além disso, os cartuchos de MISPE puderam ser reutilizados por 90 vezes, sem comprometimento das extrações.

Song *et al.* [105] utilizaram o procedimento de MISPE para extração seletiva de cloropromazina de urina. A cloropromazina é um medicamento de uso veterinário e

utilizado como sedativo. Os MIP apresentaram alta seletividade e alta recuperação na extração de cloropromazina em urina. As recuperações ficaram em torno de 73,3 %, com baixos desvios.

Uma das aplicações que tem elevada importância é a de extração de pesticidas e herbicidas a partir de matrizes ambientais. Vários estudos foram realizados na determinação de herbicidas triazínicos [106-109]. Turiel *et al.* [110] desenvolveram um método de MISPE para extração de triazinas em amostras de água potável, água superficial e amostras de solo. O polímero foi preparado utilizando-se propazina como *template*. Além disso, a MISPE tem sido aplicada na extração de outros poluentes orgânicos, incluindo ácido etil metil fosfônico [111], benzo-a-pireno [112], microcistina-LR [113], antiinflamatórios [114], e cloroguaiacol [115].

Outras aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais podem ser encontradas na Tabela 9.

 Tabela 9: Exemplos de aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais utilizando

 MISPE.

Analito	Amostra	Referência
Bentazona	Amostras aquosas	[116]
Triazinas	Água, maçã	[117]
Atrazina	Água superficial	[118]
Clorotriazinas	Sedimentos	[119]
4-Nitrofenol	Águas naturais	[120]
Nicotina	Gomas de mascar	[121]
Atenolol	Solução metanólica	[122]
Sameridina	Plasma humano	[123]
β-estradiol	Leite	[124]
Cloropromazina	Urina	[105]

1.4.2 Sílica impressa molecularmente aplicada a SPE

A maioria dos materiais impressos aplicados a SPE são baseados no uso de polímeros acrílicos, sendo que poucos trabalhos foram aplicados a SPE utilizando-se materiais híbridos orgânicos-inorgânicos (MISSPE, do inglês *Molecularly Imprinted Silica Solid Phase Extraction*).

Wang e colaboradores [125] prepararam um material híbrido orgânico inorgânico impresso com estazolam (substância usada como medicamento para o sistema nervoso central), utilizando combinação de 3-aminopropiltrietoxissilano e feniltrimetoxissilano como monômeros funcionais. O material foi aplicado na SPE de amostras de plasma humano. A Figura 16 ilustra os cromatogramas obtidos após extração das amostras com o material híbrido impresso preparado em laboratório que foi comparado a um cartucho comercial C₁₈ e LLE. Observa-se que com uso do material impresso, obteve-se cromatogramas limpos, livres de interferentes.



Figura 15: Seções de cromatogramas obtidos por HPLC-UV após extração de amostras de plasma utilizando cartuchos impresso com estazolam (MIP), C18 e extração líquido líquido (L-L). Adaptado de [125].

Zhang e colaboradores[126] prepararam um ormosil impresso molecularmente para SPE de 2,4-dinitrofenol, a em amostras aquosas. O material impresso apresentou excelente seletividade, com recuperações superiores a 92 % e desvios inferiores a 2,8 %. O material preparado em laboratório foi comparado a um cartucho comercial C_{18} . Este apresentou desempenho inferior, com recuperações inferiores a 30 % e desvios inferiores a 3,0 %.

Wang *et al* [127] desenvolveram um método de MISSPE para determinação de traços de estrona (hormônio estrogênico) em amostras de água de rio. O material apresentou seletividade satisfatória, sendo que a recuperação obtida com os cartuchos variaram entre 83 a 98 %. Os materiais impresso e não impresso (NIS) foram comparados com cartuchos comerciais C_{18} . O cartucho comercial não apresentou seletividade satisfatória, o que não foi observado com o cartucho contendo material impresso.

Jiang *et al.* [128] sintetizaram uma sílica impressa molecularmente para determinação de dietilestilbestrol em amostras de água e peixe, seguido de análise por HPLC. Comparado com a sílica não impressa, o material apresentou alta capacidade de adsorção e alta seletividade. As recuperações obtidas variaram entre 87,5 e 97,3 % para as amostras de peixe e 97 a 100 % para as amostras aquosas. O mesmo grupo de pesquisa sintetizou um material para SPE para determinação seletiva de bisfenol A [129].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] F.M. Lanças, Extração em Fase Sólida (SPE), Rima: São Carlos, 2004.

[2] J.J. Sun, J.S. Fritz, J. Chromatogr. 590 (1992) 197.

[3] R.E. Majors, LC-GC, 9 (1998) Suplemento P.

[4] A.J.S. Neto, M.E.P.B. Siqueira, Quim. Nova 28 (2005) 747.

[5] L. Snyder, J. Kirkland, *Introduction to modern liquid chromatography*. New York: John Wiley & Sons, 1979.

[6] C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato, *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas, Ed. Unicamp, 1997.

[7] J. Haginaka, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 407.

[8] C.F. Poole, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 362.

[9] X. Li, A. Fekete, M. Engemann, C. Gotz, M. Rothballer, M. Frommberger, K. Buddrus, J. Fekete, C. Cai, P. Schroder, A. Hartman, G. Chen, P. Schimitt-Kopplin, J. Chromatogr. A 1134 (2006) 186.

- [10] N. Delaunay-Bertoncini, V. Pichon, M. Hennion, LC-GC Europe (2001) 1.
- [11] R.M. Izat, J.S. Bradshaw, Accounts Chem. Res. 30 (1995) 338.
- [12] R.R. Chang, W.M. Jarman, J.A. Hennings, Anal. Chem. 65 (1993) 2420.
- [13] R.E. Majors, LC-GC 10 (1992) 656.
- [14] J. Van Zijtveld, A.V. Poulwelse, C.P. Groen, J. Chromatogr. 600 (1992) 211.
- [15] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, Chromatographia 40 (1995)474.

[16] Y. Sato, E. Yamamoto, S. Takakuwa, T. Kato, N. Asakawa J. Chromatogr. A 1190, (2008) 8.

[17] C.R.T. Tarley, M.D.P.T. Sotomayor, L.T. Kubota, Quim. Nova 28 (2005) 1076.

[18] V. Pichon, L. Chen, M. Hennnion, R. Daniel, A. Martel, F. LeGoffic, J. Abian, D. Barcelo, Anal. Chem. 67 (1995) 2451.

- [19] A. Marx, T. Giersh, B. Hock, Anal. Lett. 28 (1995) 267.
- [20] J. Cai, J. Hennion, Anal. Chem. 68 (1996) 72.
- [21] W. Hayes, L. Davidson, Curr. Org. Chem. 6 (2002) 265.
- [22] S. Mudd, J. Immunol. 23 (1932) 423.
- [23] L. Pauling, J. Am. Chem. Soc. 62 (1940) 2643.
- [24] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, Molecular Imprinting:
- From Fundamentals to ApplicationsWeinheim: 2003.
- [25] M.W. Polyakov, Zhur. Fiz. Khim. 2 (1931) 799.
- [26] L. Pauling, D.H. Campbell, J. Exper. Med. 76 (1942) 211.
- [27] F.H. Dickey, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35 (1949) 1039.
- [28] G. Wulff, A.A. Sarchan, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 11 (1972) 341.
- [29] [2] B. Sellergren, L.I. Andersson, J. Org. Chem. 55 (1990) 3381.

[30] M.J. Whitcombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E. Vulfson, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 7105.

- [31] R. Arshady, K. Mosbach, Makromol. Chem. 182 (1981) 687.
- [32] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, Adv. Drug Deliv. Rev. 57 (2005) 1742.
- [33] G. Wulff, A. Sarhan, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 11 (1972) 341.
- [34] A. Kugimiya, J. Matsui, H. Abe, M. Aburatani, T. Takeuchi, Anal. Chim. Acta 365 (1998) 75.
- [35] G. Wulff, W. Best, A. Akelah, React. Polym. 2 (1984) 167.
- [36] K.J. Shea, T.K. Dougherty J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 1091.

[37] G. Wulff, R. Vesper, R. Grobe-Einsler, A. Sarhan, Makromol. Chem. 178 (1977) 2799.

[38] G. Wulff, S. Schauhoff, J. Org. Chem. 56 (1991) 395.

[39] A. Kugimiya, J. Matsui, T. Takeuchi, K. Yano, H. Muguruma, A.V. Elgersma, I. Karube, Anal. Lett. 28 (1995) 2317.

[40] G. Wulff, W. Best, A. Akelah, React. Polym. 2 (1984) 167.

[41] G. Wulff, J. Vietmeier, Makromol. Chem. 190 (1989) 1727.

- [42] K.J. Shea, T.K. Dougherty, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 1091.
- [43] K.J. Shea, D.Y. Sasaki, J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 3442.
- [44] J. Damen, D.C. Neckers, Tetrahedron Lett. 21 (1980) 1913.
- [45] J. Damen, D.C. Neckers, J. Org. Chem. 45 (1980) 1382.

[46] K.J. Shea, E.A. Thompson, J. Org. Chem. 43 (1978) 4253.

[47] S.E. Bystrom, A. Borje, B. Akermark, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 2081.

[48] B. Sellergren, L. Andersson, J. Org. Chem. 55 (1990) 3381.

[49] M.J. Whitcombe, M.E. Rodrigues, P. Villar, E.N. Vulfson, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 7105.

[50] O. Norrlow, M. Glad, K. Mosbach, J. Chromatogr. 299 (1984) 29.

[51] O. Ramstro⁻⁻m, I.A. Nicholls, K. Mosbach, Tetrahedron: Asymmetry 5 (1994) 649.

[52] O. Ramstrom, K. Mosbach, Curr. Opin. Chem. Biol. 3 (1999) 759.

[53[O. Ramstrom, L.I. Andersson, K. Mosbach, J. Org. Chem. 58 (1993) 7562.

[54] C. Yu, K. Mosbach, J. Org. Chem. 62 (1997) 4057.

[55] A. Guyot, Synthesis and structure of polymer supports, in: D.C. Sherrington, P. Hodge (Eds.), Syntheses and Separations Using Functional Polymers, Wiley, Chichester, 1988, pp. 1–42.

[56] E. Yilmaz, K. Haupt, K. Mosbach, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 39 (2000) 2115.[57] C. Yu, O. Ramstrom, K. Mosbach, Anal. Lett. 30 (1997) 2123.

[58] L.I. Andersson, R. Muller, G. Vlatakis, K. Mosbach, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995) 4788.

- [59] A.G. Mayes, L.I. Andersson, K. Mosbach, Anal. Biochem. 222 (1994) 483.
- [60] L. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, Tetrahedron Lett. 25 (1984) 5211.
- [61] J. Matsui, O. Doblhoff-Dier, T. Takeuchi, Anal. Chim. Acta 343 (1997) 1.
- [62] J. Matsui, T. Takeuchi, Anal. Commun. 34 (1997)199.

[63] B. Sellergren, B. Ekberg, K. Mosbach, J. Chromatogr. 347 (1985) 1.

[64] L. Fischer, R. Mu["] ller, B. Ekberg, K. Mosbach, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 9358.

[65] R. Suedee, C. Songkram, A. Petmoreekul, S. Sangkunakup, S. Sankasa, N. Kongyarit, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 519.

[66] C. Yu, K. Mosbach, J. Mol. Recognit. 11 (1998) 69.

[67] O. Ramstrom, L.I. Andersson, K. Mosbach, J. Org. Chem. 58 (1993) 7562.

[68] Z.H. Meng, J.F. Wang, L.M. Zhou, Q.H. Wang, D.Q. Zh. Anal. Sci. 15 (1999) 141.

[69] M. Petcu, J. Cooney, C. Cook, D. Lauren, P. Schaaare, P. Holland, Anal. Chim. Acta 435 (2001) 49.

[70] K. Haupt, Analyst 126 (2001) 747.

[71] A. Ellwanger, L. Karlsson, P. K. Owens, C. Berggren, C. Crecenzi, K. Ensing, S. Bayoudh, P. Cormack, D. Sherrington, B. Sellergren, Analyst 126 (2001) 784.

[72] L. I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, Chromatographia 46 (1997) 57.

[73] E.J. Pilau, R.G.C. Silva, I.C.F.S. Jardim, F. Augusto, J. Braz. Chem. Soc., 19 (2008) 1136.

[74] H. Hiratani, A. Fujiwara, Y. Tamiya, Y. Mizutani, C. Alvarez-Lorenzo, Biomaterials 26 (2005) 1293.

[75] M.M. Ariffin, E.I. Miller, P.A.G. Cormack, R.A. Anderson, Anal. Chem. 79 (2007) 256.

[76] H. Yunhua; L. Jiuru; L. Mei; D. Jianxiu; N. Fei, J. Anal. Toxicol. 29 (2005) 528.

[77] X. Dong, W. Wang, S. Ma, H. Sun, Y. Li, J. Guo, J. Chromatogr. A, 1070 (2005) 125.

[78] C. Baggiani, G. Giraudi, F. Trotta, C. Giovannoli , A. Vanni, Talanta 51 (2000) 71.

[79] L.I. Andersson, R. Müller, G. Vlatakis, K. Mosbach Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (1995) 4788.

[80] J.Matsui, O. Doblhoff-Dier, T. Takeuchi, Chem. Lett. 24 (1995) 489.

[81] E.V. Piletska, N.W. Turner, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, J. Control. Rel. 108 (2005) 132.

[82] J.D. Marty, H. Gornitzka, M. Mauzac, Eur. Phys. J. E 17 (2005) 515.

[83] F. Liu, X. Liu, S. Ng, H. Chan, Sens. Actuators B 113 (2006) 234.

[84] L. Zhang, G. Cheng, C. Fu, Polym. Int. 51 (2002) 687.

[85] J. Mathew, O. Buchardt, Bioconjugate Chem., 6 (1995), 524.

[86] E.I. Holthoff, F.G. Bright, Anal. Chim. Acta 594 (2007) 147.

[87] P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, J. Chromatogr. B 804 (2004) 173.

[88] K. Kim, J. Lee, M.H. Kim, S. Cho, Polym.. J. 37 (2005) 669.

[89] S.A. Piletsky, H.S. Andersson, I.A. Nicholls, J. Mol. Recognit. 11 (1998) 94.

[90] E.C. Figueiredo, A.C. Dias, M.A.Z. Arruda, Braz. J. Pharm. Sci. 44 (2008) 361.

[91] V.B. Kandimalla, J. Hunagxian, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 587.

[92] R.J. Ansell, D. Krij, K. Mosbach, Curr. Opin. Biotechnol. 7 (1996) 89.

[93] R. Gupta, A. Kumar, Biotech. Adv. 26 (2008) 533.

[94] N. M. José, Quim. Nova 28 (2005) 281.

[95]H. Schmidt, J. Non-Cryst. Solids, 63 (1984) 283.

[96] J. Brinker, G. Scherer, Sol-Gel Science, Academic Press, New York, 1989.

[97] R. J. P. Corriu,; D. Leclercq, Angew. Chem. Int. Ed. (1996), 35, 1420.

[98] L. L. Hench, J. K. West, Chem. Rev. 90 (1990) 33.

[99] A. M. Buckley, M. Greenblatt, J. Chem. Educ. 71 (1994) 599.

[100] C. Pinel, A. Loisil, P. Gallezot, Adv. Mater. 9 (1997) 582.

[101] M.E. Diáz-Garcia, R.B. Laino, Microchim. Acta 149 (2005) 19.

[102] K. Nilsson, J. Lindell, O. Norrlow, B. Sellergren, J. Chromatogr. 680 (1994) 57.

[103] L.A. Pereira, S. Rath, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 1063.

[104] E. Benito-Peña, S. Martins, G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 235.

[105] S. Song, X. Shi, R. Li, Z. Lin, A. Wu, D. Zhang, Process Biochemistry 43 (2008) 1209.

[106] T. Pap, V. Horváth, A. Tolokán, G. Horvai, B. Sellergren, J. Chromatogr. A 973 (2002) 1.

[107] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernández, J. Chromatogr. A 1085 (2005) 199.

[108] R. Koeber, C. Fleischer, F. Lanza, K. Boos, B. Sellergren, D. Barceló, Anal. Chem. 73 (2001) 2437.

[109] F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, S. Sellergren, M.C. Hennion, J. Chromatogr. A 999 (2003)23.

[110] E. Turiel, A. Martin-Esteban, P. Fernandez, C. Perez-Conde, C. Camara, Anal. Chem. 73 (2001) 5133.

[111] S. Le Moullec, A. Bégos, V. Pichon, B. Bellier, J. Chromatogr. A 1108 (2006)7.

[112] J.P. Lai, R. Niessner, D. Knopp, Anal. Chim. Acta 522 (2004) 137.

[113] I.Chianella, S.A. Piletsky, I.E. Tothill, B. Chen, A.P.F. Turner, Biosens. Bioelectron. 18 (2003) 119.

[114] E. Caro, R.M. Marce, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, J. Biochem. Biophys. Meth. 70 (2007) 133.

[115] C.R.T. Tarley, M.G. Segatelli, L.T. Kubota, Talanta 69 (2006) 259.

[116] C. Baggiani, F. Trotta, G. Giraudi, C. Giovannoli, A. Vanni, Anal. Commun. 36 (1999) 236.

[117] J. Matsui, M. Okada, M. Tsuruoka, T. Takeuchi, Anal. Commun. 34 (1997)263.

[118] B. Bjarnason, I. Chimuka, O. Ramstrom, Anal. Chem. 71 (1999) 2152.

[119] I. Ferrer, D. Barceló, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 180.

[120] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, Anal. Chem. 72 (2000)3934.

[121] A. Zander, P. Findlay, T.H. Renner, B. Sellergren, A. Swietlow, Anal. Chem. 70 (1998) 3304.

[122] D. Stevenson, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 154.

[123] L.I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, Chromatographia 46 (1997) 303.

- [124] Z. Qiujin, W. Liping, W. Shengfang, J. Wasswa, G. Xiaohong, T.Jian Food Chemistry 113 (2009) 608.
- [125] G. Jin, Y. Tang, S. Liu, S. Wang, R. Xing, Anal. Lett. 41 (2008) 1811.
- [126] W. Luoa, L. Zhua, C. Yua, H. Tanga, H. Yub, X. Li, X. Zhang, Anal. Chim. Acta 618 (2008) 147.
- [127] S. Wang, Z.X.G. Fang, Y. Zhang, J. He, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1181.
- [128] X. Jiang, C. Zhao, N. Jiang, H. Zhang, M. Liu, Food Chem. 108 (2008) 1061.
- [129] X. Jiang, W. Tian, C. Zhao, H. Zhang, M. Liu, Talanta 72 (2007) 119.

OBJETIVOS
Objetivo geral:

⇒ O estudo do preparo de materiais sorventes baseados em sílicas organicamente modificadas impressas molecularmente preparados a partir do processo sol-gel, utilizando diferentes *templates*.

Objetivos específicos:

 \Rightarrow A caracterização química e morfológica dos materiais sintetizados.

- \Rightarrow A aplicação dos materiais sorventes preparados a diversas amostras, para posterior análise cromatográfica:
- A) Águas.
- B) Caldo de cana.
- C) Plasma humano.
- D) Urina humana

Capítulo I

SÍLICA ORGANICAMENTE MODIFICADA IMPRESSA MOLECULARMENTE COM CAFEÍNA

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, a cafeína proveniente de fontes naturais tem sido consumida e apreciada, sendo o chá a bebida mais antiga que contém cafeína [1]. A cafeína é comumente encontrada em muitas bebidas como café, chá, refrigerantes a base de cola, chocolates, entre outros. As primeiras plantações de café (chamadas de "Kaweh") apareceram na península Arábica, no século XIV. Nessa época o café era utilizado como remédio e para fazer uma bebida árabe denominada "qahwa", que era famosa por prevenir o sono [2]. A cafeína pertence à família dos alcalóides e dentre os vários alcalóides existentes na natureza, encontram-se as metilxantinas. Existem três metilxantinas particularmente importantes: a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina). Todas são derivadas da purina.

Atualmente, a cafeína é consumida por bilhões de pessoas no mundo, estando este hábito inserido em diversos países [3]. A água natural é importante para os ecossistemas e para o consumo humano. A poluição das águas pode vir de diversas fontes, como a doméstica e a industrial, entre outras. Um marcador ideal deve permitir a quantificação da poluição. Um potencial marcador químico para as águas residuais domésticas é a cafeína, já que o homem é a única espécie que a consome e excreta a mesma

Este trabalho foi desenvolvido objetivando explorar o potencial dos materiais impressos molecularmente preparados pelo PSG utilizando APTMS como monômero funcional e TEOS como agente reticulante. O material foi aplicado a análises de metilxantinas em duas amostras: água e urina humana.

63

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes

- Acetonitrila, Tedia (Fairfield, OH, USA)
- Água deionizada Milli Q Plus, Millipore.
- 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), Acros, Morris Plains, NJ, EUA.
- Cafeína, Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Etanol, Tedia (Rio de Janeiro, Brasil).
- Hidróxido de amônio (NH₄OH), J.T. Baker (São Paulo, Brasil).
- Metanol, grau cromatográfico, Tedia.
- Teobromina, Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Teofilina, Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Tetraetilortossilicato (TEOS), Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Ácido trifluoracético (TFA), Acros (Morris Plains, NJ, EUA).

2.2. Materiais

- Agitador Vórtex, Phoenix modelo AP56.

- Analisador termogravimétrico, TA Instruments modelo TGA-2050 (New Castle, EUA).

- Balança analítica, Boeco, precisão de 0,0001 g.
- Banho termostatizado, Cole Parmer, modelo polystat.
- Banho ultra-som, Maxiclean, modelo 1400A.
- Cartuchos comerciais C₁₈ da Supelco (Bellefonte, EUA).
- Centrífuga, Fanen, modelo 206 BL (São Paulo, SP).

- Coluna C_{18} Novapack, com partículas esféricas, diâmetro médio de 4 μ m, com 150 mm de comprimento e 3,9 de di. Waters (Milford, MA, EUA).

- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu (Kyoto, Japan), composto de uma bomba de alta pressão, modelo LC-10 AD; detector UV-Vis, modelo SPD-10 AV utilizado em $\lambda = 272$ nm; válvula de injeção (alça de amostragem de 5 µL), Rheodyne modelo 8125; Softwares - ChromPerfect 3.52 (Justice Laboratory Solutions, Mountain View, CA).

- Espectrômetro de absorção no infravermelho, Bomem MB-102 (ABB, St-Laurent, Canadá)

- Fase móvel utilizada na determinação das metilxantinas: mistura de 20 % de metanol e 80 % de água (v/v) com pH ajustado em 2,5. Vazão de fase móvel: 0,5 mL min^{-1} .

- Microscópio eletrônico de varredura Jeol modelo JSM-6360LV (Japão).

- pHmetro, Micronal, modelo B474.

- Peneiras para análise e controle granulométricos. Abrozinox (75 e 100 µm).

- Seringas de polipropileno (80 mm x 0,5 mm d.i.)

- Sistema de deionização de água, Milli-Q Plus, Millipore (Billerica, MA, EUA).

2.3. Amostras

• <u>Água.</u>

Foram utilizadas amostras de águas coletadas em um córrego situado na cidade de Campinas, SP (Anhumas, Latitude: 22° 52'16"S e Longitude: 47°22'68"O). O ponto de amostragem está localizado próximo a uma favela que não possui rede de esgoto. As amostras foram utilizadas em até 24 h após amostragem, sendo filtradas e armazenadas em um frasco de vidro sob refrigeração a 4 °C durante esse período.

• <u>Urina.</u>

O material também foi aplicado na extração de metilxantinas a partir de urina humana. Foram coletadas amostras de urina de uma mesma pessoa (homem, 23 anos) em jejum (que foram utilizadas como "branco") e após ingestão de aproximadamente 200 mL de leite achocolatado (aproximadamente 3 h). As amostras de urina em branco foram dopadas com solução estoque de cafeína, teobromina e teofilina em diferentes concentrações para otimização dos resultados.

2.4. Preparo da sílica impressa molecularmente (MIS).

As quantidades relativas de cada reagente no preparo foram selecionadas após estudos preliminares. Para o preparo da sílica impressa molecularmente com cafeína, foram avaliados quatro materiais. Neles, foram variados as proporções de reagente reticulante, precursor e tipo de catalisador.

A uma mistura de 100 mg de APTMS e 500 mg de TEOS foi adicionado 1 mL de solução aquosa saturada de cafeína (contendo aproximadamente 20 mg de cafeína) e 200 μ L de NH₄OH concentrado. A mistura foi aquecida sob agitação a 40 °C até gelificação e formação de um monolito branco opaco. O material resultante foi resfriado a temperatura ambiente e os monolitos obtidos foram triturados e peneirados (dp = 75 a 100 μ m). A cafeína foi removida através de extração em um Soxhlet usando metanol como solvente extrator. Para verificar se a remoção foi efetiva, a presença de cafeína no metanol usado foi periodicamente verificado por HPLC-UV. Paralelamente, foi preparado um material sem adição da cafeína, para comparação (*NIS*).

Foram preparados cartuchos de extração contendo material impresso e não impresso através da inserção de 100 mg destes em seringas de polipropileno (80 mm

66

x 0,5 mm d.i.); discos de polietileno sinterizado ("frits") recuperados de cartuchos comerciais usados foram utilizados para conter a fase nas seringas.

2.5. Caracterização dos materiais.

A caracterização do MIS e NIS foi feita através de espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) para avaliar os grupamentos existentes nos materiais e análise termogravimétrica (TGA) para avaliar as propriedades térmicas dos materiais. A análise termogravimétrica foi realizada em um analisador termogravimétrico, sendo a faixa de temperatura utilizada de 30 a 1000 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C mim⁻¹. As medidas foram realizadas sob ar sintético, no qual foi medida a porcentagem de perda de massa da amostra, empregando uma microbalança, com o aumento da temperatura.

As análises de IV foram conduzidas em um espectrômetro Bomem MB-102. As amostras foram prensadas com brometo de potássio sob vácuo, na proporção de 10:1, formando pastilhas adequadas para análises na região do infravermelho (IV). Os espectros de IV foram obtidos no intervalo espectral de 4.000 a 500 cm⁻¹, empregando uma resolução de 4 cm⁻¹ e uma taxa de 20 varreduras por minuto.

2.6. Determinações cromatográficas.

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC-10AD, equipado com coluna Novapack C₁₈ (150 mm x 3,9 mm, 4 μ m) da Waters (Milford, Massachusetts, EUA). Uma válvula Rheodyne (Cotati, CA, EUA) com uma alça de amostragem de 5 μ L foi utilizada. Todas as separações foram conduzidas a temperatura ambiente. A detecção foi feita utilizando-se um detector SPD-10A UV-vis da Shimadzu no

comprimento de onda de 272 nm, sendo que os cromatogramas foram coletados e analisados pelo programa de detecção e integração ChromPerfect (Justice Laboratory Solutions, Mountain View, CA, EUA).

2.7. Procedimento de extração.

Misturas teste contendo cafeína, teobromina e teofilina (10 mg L⁻¹) dissolvidas em água deionizada foram empregadas em todos os experimentos. As estruturas químicas de cada um dos compostos avaliados neste estudo estão apresentadas na Figura A-1.



Figura I-1: Estruturas químicas dos compostos avaliados neste estudo.

Os cartuchos foram condicionados pela eluição de 2 mL de metanol, seguidos de 2 mL de água, utilizando-se uma bomba de vácuo. Foram otimizados parâmetros de extração como natureza e volume de solvente de dessorção, pH da amostra e repetibilidade entre lotes de materiais impressos.

Para a escolha do solvente de dessorção para as metilxantinas, foram avaliados acetonitrila, 2-propanol, metanol e etanol. Alíquotas de 10 mL de solução aquosa teste

contendo as metilxantinas foram extraídas e dessorvidas com 5 mL de cada solvente Os extratos utilizando os solventes avaliados foram cromatografados e comparados.

No experimento para determinação do volume do solvente de dessorção foram utilizadas o melhor solvente, variando-se o volume de dessorção das metilxantinas. Foram avaliados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mL.

O pH das amostras foi outro parâmetro avaliado. Nessa etapa, foram estudados três valores de pH: 3, 6 e 12. Para o estudo do efeito do pH nas extrações, este foi ajustado por adição de $NH_4OH_{(conc)}$ ou $HCl_{(conc)}$ às soluções teste antes das extrações.

A repetibilidade no preparo dos materiais foi avaliada preparando-se dois lotes de materiais em meses diferentes. A extração da mistura teste contendo as metilxantinas foi feita em um mesmo dia, utilizando os cartuchos contendo os materiais dos diferentes lotes.

2.8. Avaliação do desempenho analítico do MIS.

Alíquotas de 10 mL de água do córrego Anhumas foram extraídas usando os cartuchos MIS e NIS nas condições otimizadas. Antes da extração, os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de água.

Além disso, os cartuchos com MIS foram comparados com cartuchos comerciais de SPE com fase C_{18} (100 mg, DSC-18 da Supelco) extraindo-se 1 mL de amostras de urina coletada de um voluntário (antes e após ingestão de leite achocolatado). As condições operacionais foram as mesmas para os cartuchos C_{18} , MIS seletivo para cafeína e NIS. Para quantificação das metilxantinas foram obtidas curvas analíticas utilizando soluções aquosas das metilxantinas na faixa de 100 a 1500 µg L⁻¹ para cada analito.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obtenção das condições experimentais otimizadas de preparo dos materiais, foram avaliadas quatro proporções diferentes dos agentes reacionais da mistura sol (*template*, reticulante e precursor), bem como dois tipos de catalisadores (ácido e base). Com excesso de APTMS, não houve gelificação da fase sol, sendo que o material apresentou elevada viscosidade. O material impresso que apresentou os melhores resultados foi o que possui proporção de 1:4 da mistura APTMS/TEOS.

Com relação ao uso de dois diferentes catalisadores, foram avaliados NH_4OH e mistura de TFA com 5% de água. Com uso de ambos catalisadores houve gelificação, porém optou-se pelo uso do catalisador básico pelo menor custo e maior disponibilidade.

3.1. Caracterização química e estrutural do MIS e NIS.

A caracterização estrutural dos materiais impresso e não impresso foi realizada por técnicas espectroscópicas de análises. Medidas na região do infravermelho foram realizadas para ambos materiais, e os espectros obtidos para as amostras são apresentados na Figura I-2. Observa-se que ambos os espectros são similares. As bandas em 3434 e 3453 cm⁻¹ (1) são atribuídas às vibrações O–H axiais provenientes de grupos hidroxila. Essas bandas são resultado de silanóis não condensados e água residual. As bandas de absorção para as ligações C–H estão em 2938 cm⁻¹, 2943 cm⁻¹ (2), 791 e 785 cm⁻¹ (6). As bandas em 1640 e 1653 cm⁻¹ (3) são típicas de ligação N–H e podem ser produzidas pelos grupos funcionais (amino) presentes nas cadeias do material. As bandas em 970 e 972 cm⁻¹ (5) podem ser atribuídas a grupos silanóis livres (Si-OH). Finalmente, as bandas em 1075 e 1072 cm⁻¹ (4) são características de silicatos e correspondem ao estiramento da ligação Si-O [4]. As bandas em 460 e 462

são características de ligações Si-O-Si (7). Os espectros de IV obtidos são consistentes com aqueles de materiais modificados por grupos aminopropila. Como esperado, não há diferenças significativas entre os espectros de infravermelho do MIS e NIS, já que a diferença entre os dois é essencialmente morfológica e não de composição química e estrutural. A presença do analito alvo durante as etapas de hidrólise e condensação não alteram a composição química do ormosil. As bandas relativas a molécula molde (cafeína) não foram observadas no espectro referente ao MIS.



Figura I-2: Espectro de absorção no infravermelho para MIS e NIS. Bandas: (1) –OH, (2) C–H, (3) N–H, (4) Si–O, (5) Si-OH, (6) C–H e (7) Si-O.

A estabilidade térmica dos materiais foram avaliadas por medidas termogravimétricas. A Figura I-3 apresenta termogramas típicos obtidos para os materiais impresso e não impresso com cafeína, assim como as curvas derivadas correspondentes. Em ambas ocorre um evento com uma grande perda de massa entre 50 e 100 °C. Essa perda pode ser atribuída a vaporização de compostos voláteis

gerados como produtos da reação (metanol, etanol, água) ou reagentes não consumidos (APTMS, TEOS) e que ficaram sorvidos no ormosil. Como o NIS não foi submetido a uma extração exaustiva por Soxhlet como o MIS, sua maior perda de massa em comparação ao MIS na mesma faixa de temperatura pode ser atribuída a essas impurezas remanescentes. A curva de TGA do MIS também mostra uma perda de massa a ~170 °C, mas que não aparece na curva do NIS. Essa perda foi estimada como sendo (0.9 ± 0.3) % da massa total de amostra. Este evento pode ser atribuído a uma perda de *template* (cafeína) residual, já que a sublimação desta ocorre a 178 °C [5]. Isso sugere que o procedimento de lavagem empregado não remove completamente todo o *template*, o que poderia causar sérios problemas analíticos quando utilizado como materiais para SPE. No entanto, análises por HPLC-UV de extrações em branco mostraram que não havia picos de cafeína visíveis nos cromatogramas. Esta é uma evidência de que a cafeína remanescente está ocluída profundamente nos poros mais finos da sílica e no interior das cadeias de sílica do MIS, em cavidades não acessíveis aos solventes de lavagem; como, portanto, esse template residual está ocluído no MIS e não removível por lavagens com solventes, ele também não interferirá na aplicação do MIS. Com exceção da perda do *template* residual, ocorre uma mudança na massa do MIS acima de 300 °C, sendo que essa temperatura pode ser considerada a temperatura limite (máxima) para uma possível aplicação envolvendo a dessorção térmica de analitos.



Figura I-3: Curvas termogravimétricas (gráfico superior) e 1º derivada correspondente (gráfico inferior) para MIS e NIS.

A estrutura do MIS pode ser conjecturada considerando que a cafeína contém em sua estrutura molecular grupos funcionais que são capazes de interagir fortemente com o monômero APTMS, ocorrendo a formação de um complexo monômero*template* (M-T, cafeína - APTMS) estável graças à formação de ligações de hidrogênio entre os átomos de nitrogênio e oxigênio da cafeína com os grupos amino do APTMS. Um possível esquema simplificado para a síntese, remoção do *template* e religamento do analito no MIS é mostrado na Figura I-4. As cadeias de polissilicato tridimensionais do ormosil, produzidas por reações de hidrólise e condensação do TEOS, pode incorporar o complexo APTMS-cafeína (**A**). Após completa gelificação e secagem do ormosil, a remoção do *template* (**B**) produz nanocavidades na cadeia de sílica, compatíveis com moléculas com estrutura similar a do *template* (cafeína, $R_1 = R_2 = CH_3$, teofilina, $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$ e teobromina, $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$). Estas nanocavidades agem como sítios de ligação específicos / seletivos para estas espécies durante o processo de extração (**C**), levando ao isolamento seletivo desses analitos.



Figura I-4: Reação sugerida para o preparo e aplicação do MIS: (A) hidrólise e policondensação do complexo APTMS/cafeína e TEOS; (B) remoção do *template* e água da cadeia de polissilicato durante extração por Soxhlet e (C) religamento das metilxantinas nos sítios específicos adsortivos durante o processo de extração.

3.2. Otimização do método de MISPE-HPLC-UV.

Foram estudados os efeitos de solvente de dessorção, volume de solvente de dessorção e pH das amostras. Para dessorção dos analitos foram avaliados acetonitrila, etanol, metanol e 2-propanol. A Figura I-5 compara a eficiência de dessorção dos solventes de dessorção testados. Pode-se observar que para os três analitos, a eficiência de dessorção aumenta de acordo com a seguinte ordem: 2propanol < etanol < acetonitrila << metanol (com exceção para teobromina, na qual o etanol é superior a acetonitrila). Estes resultados podem ser discutidos considerando a classificação de Snyder para força de solvente e seletividade em HPLC [6]. Considerando o parâmetro da solubilidade de Hildebrandt (δ), a polaridade dessa série de solventes aumenta na seguinte ordem: 2-propanol ($\delta = 10,2$) < etanol ($\delta = 11,2$) < acetonitrila ($\delta = 11,8$) < metanol ($\delta = 12,9$), que corresponde a ordem observada para eficiência de dessorção para cafeína e teofilina. Como as metilxantinas podem ser consideradas compostos orgânicos polares, é esperado um aumento da eficiência de dessorção com o aumento da polaridade do solvente. A eficiência de extração quando se usa metanol é 1100 % maior que quando comparado com os outros solventes como no caso da cafeína e comparado ao 2-propanol. Também deve ser considerada a estrutura dos analitos, que podem formar ligações de hidrogênio com o solvente de dessorção. De acordo com a classificação de Snyder, metanol é um aceptor de prótons δ_a e os parâmetros de solubilidade de doador de prótons δ_h são iguais a 7,5, que são significativamente maiores do que os dos outros solventes (2-propanol: $\delta_a = \delta_h = 4,0$, etanol: $\delta_a = \delta_h = 5,0$ e acetonitrila $\delta_a = 2,5$ e $\delta_h = 0,0$). Portanto, metanol forma mais efetivamente ligações de hidrogênio com os analitos. Essa capacidade de formar ligações de hidrogênio mais efetivas com os analitos combinada com a sua alta

polaridade explica a maior eficiência de dessorção do metanol, quando comparado com outros solventes.



Figura I-5: Dependência das massas de cafeína (**CF**), teobromina (**TB**) e teofilina (**TP**) extraídos com 5 mL dos diferentes solventes de dessorção, após extração com cartucho MIS. Condições do experimento: percolação de 10 mL de amostra, lavagem do cartucho com 5 mL de água e dessorção com 5 mL de cada solvente avaliado.

Após a seleção do solvente de dessorção, foi otimizado o volume do solvente de dessorção (Figura I-6). Para cafeína e teofilina, 2 mL de metanol foram suficientes para alcançar a completa dessorção dos analitos; para teobromina, é necessário um volume de solvente maior (5 mL). Por esse motivo, este foi o volume de solvente de dessorção utilizado nas etapas posteriores.



Figura I-6: Dependência da eficiência de dessorção (em %) com o volume do solvente de dessorção (mL) para cafeína (), teobromina (0) e teofilina (Δ).

A dependência entre o pH da amostra aquosa e a eficiência de extração pode ser observada na Figura I-7. Para cafeína e teofilina, a eficiência de extração é maximizada em um pH próximo a 7,0. A teobromina apresenta um comportamento diferenciado: a eficiência de extração é maximizada para amostras ácidas. Seria esperada uma certa dependência entre a eficiência de extração e o pH da amostra, considerando as estruturas mostradas na Figura I-4. Os pontos de ancoragem para o analito no interior das nanocavidades são grupos amino, que podem estar protonados ou desprotonados dependendo do pH do meio. Considerando que a natureza das interações entre o analito e os pontos de ancoragem nas cavidades específicas são predominantemente eletrostáticas, a carga sobre os sítios de ligação é um fator importante que controla a capacidade do material de reter essas espécies. Além disso, os analitos propriamente ditos também podem ser protonados ou desprotonados. Teobromina e teofilina possuem caráter anfiprótico, tendo átomos de hidrogênio ionizáveis nas posições 1 e 7 das suas estruturas (Figura I-1) e pk_a de 10,0 e 8,8, respectivamente [7], assim como átomos de nitrogênio protonáveis na cadeia da xantina. A cafeína não é ácida, mas ela pode ser protonada como as outras espécies. O efeito do pH da amostra na eficiência de extração vai ser resultante da somatória dos efeitos sobre as cargas do analito e dos sítios de ligação. Considerando a complexidade envolvida no processo, a otimização do pH da amostra é essencialmente empírica. Em vista dessas observações, para os demais experimentos, as extrações foram conduzidas em pH igual a 7,0.



Figura I-7: Dependência entre massas recuperadas de cafeína (), teobromina (0) e teofilina (Δ) e o pH de amostras aquosas testadas, após extração com cartuchos de MIS.

A repetibilidade no preparo dos materiais impressos com cafeína foi avaliada. Para isso, foram preparados dois lotes de materiais em meses diferentes, sendo os cartuchos avaliados no mesmo dia. A Figura I-8 ilustra a variação na repetibilidade entre lotes diferentes. Com exceção da teobromina, a repetibilidade da quantidade extraída de teofilina e cafeína foi satisfatória.



Figura I-8: Avaliação da repetibilidade no preparo de materiais com impressão molecular preparados pelo PSG. **TB**: teobromina, **TP**: teofilina e **CF**: cafeína.

3.3. Desempenho analítico do MIS.

A Figura I-9 mostra os cromatogramas de HPLC-UV obtidos após extração de água do córrego Anhumas com cartuchos de MIS e NIS. A comparação entre os cromatogramas mostra o sucesso da impressão molecular nas sílicas modificadas. Com exceção dos picos identificados como teobromina ($t_R = 5,05 \text{ min}$), teofilina ($t_R = 6,80 \text{ min}$) e cafeína ($t_R = 9,35 \text{ min}$), os únicos sinais observáveis são o pico do solvente ($t_R \approx 3,8 \text{ min}$) e um grande e não identificado pico com $t_R = 2,80 \text{ min}$. Os picos para as metilxantinas no cromatograma obtido após extração com o cartucho contendo NIS são menos intensos, confirmando que ocorreu a impressão molecular. Nesse cromatograma aparecem dois picos que não aparecem no cromatograma do MIS com $t_R = 5,50 \text{ e} 7,20 \text{ min.}$ O fator de impressão **IF** (definido como a razão entre as quantidades extraídas com MIS e NIS [8]) foi estimado em 20,5 ± 1,9, sugerindo que a maioria dos analitos sorvidos pelo MIS são retidos por interações específicas. Para avaliar o desempenho do MIS, deve-se considerar o efeito de impressão para uma molécula molde (template) em relação a um material não impresso (NIS). Quanto maior for a quantidade de analito extraída com MIS em relação ao NIS, melhor será o desempenho seletivo do material impresso. O IF obtido para o analito sempre deve ser superior a 1. Os valores de IF tipicamente encontrados na literatura para materiais de impressão molecular com base de poliacrilato são menores, ficando na faixa entre 1,7 a 7,7 [8-13] dependendo do analito e tipo de material. O maior valor de IF do MIS comparado com esses outros materiais é uma indicação do grande potencial analítico dos materiais baseados em sílica impressa molecularmente.



Figura I-9: Seções de cromatogramas de HPLC-UV obtidos após extração de água do córrego Anhumas usando cartuchos de NIS (cromatograma abaixo) e MIS (cromatograma acima). Identificação dos picos: (1) teobromina, (2) teofilina e (3) cafeína. A escala do sinal do detector e tempo são idênticas para ambos cromatogramas.

Quanto à presença de cafeína nas amostras de água em si, esta era previsível considerando a descarga de esgoto no córrego, tendo sido a concentração estimada em 220 μ g L⁻¹. Os principais metabólitos humanos da cafeína são paraxantina (1,7 dimetilxantina), teobromina e teofilina [3]. A teobromina e teofilina (em concentração da mesma ordem de grandeza que a cafeína) encontradas podem ser produtos de metabolização de cafeína, o que pode explicar a sua presença. Além disso, as pessoas podem ter ingerido chás ou chocolate, evidenciando a presença desses analitos.

A seletividade da MIS foi comparada com cartuchos comerciais de SPE C_{18} . Nesse caso, foi realizada análise de urina humana de um voluntário em jejum e após ingestão de leite achocolatado. Os cromatogramas estão ilustrados na Figura I-10. Recuperações foram estimadas em 67 % para cafeína, 83 % para teobromina e 68 % para teofilina e nenhuma outra espécie foi detectada no intervalo em que as metilxantinas eluiram. Os cromatogramas para urina antes da ingestão de leite achocolatado mostraram pequenos picos considerados residuais para as metilxantinas. É importante ressaltar que em extrações em branco dos cromatogramas não havia nenhum pico. Por outro lado, particularmente na região entre 3,5 e 4,5 min no cromatograma dos extratos obtidos com sílica C_{18} ocorrem diversos picos não detectados no cromatograma de MIS. Finalmente, o pico de teobromina nesses cromatogramas é assimétrico, possivelmente devido a analitos coeluídos.

Foi realizada a quantificação das metilxantinas em urina de um outro voluntário. Encontraram-se 0,34 mg L⁻¹ de cafeína, 1,84 mg L⁻¹ de teobromina (alcalóide de chocolate) e 0,58 mg L⁻¹ de teofilina. Estes valores são consistentes com valores referidos na literatura; por ex. a concentração média de cafeína em 11361 amostras provenientes de atletas foi estimada em (1,22 ± 2,45) mg L⁻¹ [14].



Figura I-10: Seções de cromatogramas de HPLC-UV obtidos após extração de urina humana com cartuchos comerciais C_{18} e cartuchos de MIS. Linha pontilhada: pessoa em jejum. Linha cheia: após ingestão de leite com chocolate. Identificação dos picos: (1) teobromina, (2) teofilina e (3) cafeína. Escalas idênticas para todos cromatogramas.

A Tabela I-1 lista os parâmetros estimados através de curvas analíticas utilizando o método otimizado, utilizando 1 mL de soluções aquosas neutras contendo de 100 a 1000 μ g L⁻¹ das metilxantinas e 5 mL de metanol para dessorção. Como o volume de dessorção é maior do que o volume de amostra e o excesso de solvente não foi evaporado, esse procedimento não foi de pré-concentração mas apenas de "clean-up" para demonstrar a seletividade e especificidade do material. As curvas apresentaram coeficientes de correlação de 0,992 a 0,997 e limites de detecção variando entre 44 a 85 μ g L⁻¹.

Tabela I-1: Figuras de mérito quantitativas de metilxantinas obtidas por HPLC-UV
após extração com cartucho de MIS. Inclinação da curva: a, intercepto: b, coeficiente de
correlação: r, limite de detecção: LD e limite de quantificação: LQ

Analito	a	b	r	LD ^a	LQ ^a
Teobromina	$10,8 \pm 0,5$	-800 ± 310	0,992	85	285
Teofilina	$10,9 \pm 0,3$	-450 ± 160	0,998	44	147
Cafeína	$9,7 \pm 0,3$	800 ± 170	0,997	53	176

* LD e LQ são expressos em μ g L⁻¹ e definidos como (3 x s_B)/a e (10 x s_B)/a, respectivamente (s_B = desvio padrão do intercepto).

4. CONCLUSÕES

A aplicação extensiva da impressão molecular como fase extratora em SPE é resultado da simplicidade e alto grau de seletividade desses materiais, quando comparados a sorventes convencionais. Embora uma imensa variedade de materiais impressos (geralmente acrílicos) tenha sido empregada em SPE, poucos estudos foram feitos utilizando a tecnologia sol-gel.

O método proposto para extração seletiva de cafeína se mostrou eficaz. O material preparado através da impressão com cafeína demonstrou alta seletividade para as metilxantinas avaliadas, gerando cromatogramas extremamente limpos, alcançando os objetivos propostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] L.M. Grosso, M.B. Bracken, AEP 15 (2005) 460.

[2] B. Eskenazi, A. Stapleton, M. Kharrazi, W. Chee, Epidemiology 10 (1999) 242.

[3] R.M. Silverstein, F.X. Webster, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6° ed., New York, Wiley (1997).

[4] A. Smith (Ed.), The Merck Index (12th ed. CD-ROM). Chapman & Hall, London (1997) monography, 1674.

[5] L.R. Snyder, in: J.J. Kirkland (Ed.), Modern Practice of Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York, (1971) 125.

[6] M. Blanco, I. Valverde, J. Chromatogr. A 950 (2002) 293.

[7] F.Q. Qiao, H. Sun, H. Yan, K.H. Row, Cromatographia 64 (2006) 625.

[8] R. Hsieh, H. Tsai, M. Syu, Biomaterials 27 (2006) 2083.

[9] E. Caro, R.M. Marce, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, Anal. Chim. Acta 552 (2005) 81.

[10] B.S. Vicente, F.N. Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 115.

[11] Q.L. Deng, Z.H. Lun, H. Shao, C. Yan, R.Y. Gao, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 51.

[12] F.G. Yamayo, A. Martin-Esteban, J. Chromatogr. A, 1098 (2005) 116.

[13] M. Nakamura, M. Ono, T. Nakajima, Y. Ito, T. Aketo, J. Haginaga, J. Pharm.. Biomed. Anal. 37 (2005) 231.

[14] W. Van Thuyne, K. Roels, F.T. Delbeke, Int. J. Sports Med. 26 (2005) 714.

Capítulo II

SÍLICA ORGANICAMENTE MODIFICADA IMPRESSA MOLECULARMENTE COM ÁCIDO BARBITÚRICO

1. INTRODUÇÃO

A determinação de fármacos em fluidos biológicos deve ser feita para atender as necessidades clínicas e toxicológicas, e é de primordial importância para se ter um diagnóstico preciso de intoxicações, sejam elas intencionais ou não, e na determinação de *causa mortis* de pacientes [1].

O fenobarbital é um fármaco barbitúrico anticonvulsivante, hipnótico e sedativo. Ele foi muito utilizado entre 1934 e 1945 por médicos alemães nazistas para matar os garotos que nasciam doentes ou com deformidades físicas. O primeiro barbitúrico foi sintetizado em 1902 por químicos alemães (Emil Fisher e Joseph von Mering). O fenobarbital, assim como os outros barbitúricos, foram muito populares nos anos 60 e 70. Desde então, a sua popularidade caiu devido ao seu uso mais restrito [2]. Os efeitos do fenobarbital aumentam pela administração concomitante de outros depressores do sistema nervoso central incluindo o álcool e benzodiazepínicos (diazepam, triazolam e outros). O fenobarbital tem sido um dos fármacos mais notados em envenenamentos acidentais e suicídios sendo o álcool um sinergístico nestes casos. Nos primeiros anos de sua utilização, não se suspeitava que causassem dependência. Depois que milhares de pessoas já haviam se tornado dependentes, é que surgiram normas reguladoras que dificultaram a sua aquisição.

A aplicação dos barbitúricos pode ser oral, intramuscular, endovenoso, ou retal. Independentemente da via de administração eles se distribuem uniformemente pelos tecidos. Após a absorção pelo organismo, eles se ligam a proteínas do sangue e vão agir principalmente no cérebro [3].

Nessa etapa do trabalho foi preparado um ormosil impresso molecularmente seletivo para fenobarbital, utilizando-se como *template* um análogo estrutural ao analito alvo. O MIS foi preparado usando ácido barbitúrico como *template* e APTMS

89

e TEOS como monômero funcional e reticulante, respectivamente. O material foi aplicado na SPE de amostras aquosas e plasma humano.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes

- Acetonitrila, Tedia (Fairfield, OH, USA)
- Ácido acetilsalisílico, Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Ácido barbitúrico, Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Água Deionizada Milli Q Plus, Millipore.
- Clorofórmio, grau cromatográfico, Tedia (Fairfield, OH, USA)
- Diclorometano grau cromatográfico, Tedia (Fairfield, OH, EUA).

- Fenobarbital, doado pelo professor Arício X. Linhares do Instituto de Biologia da Unicamp (Campinas, SP, Brasil).

- 3-Aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Cafeína, Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Etanol, Tedia (Rio de Janeiro, Brasil).
- Hidróxido de amônio, J.T. Baker (São Paulo, Brasil).
- Metanol, grau cromatográfico, Tedia.
- Paracetamol, Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Tetraetilortossilicato (TEOS), Acros (Morris Plains, NJ, EUA).

2.2. Materiais

- Agitador Vórtex, Phoenix modelo AP56.

- Banho termostatizado, Cole Parmer, modelo polystat.
- Banho ultra-som, Maxiclean, modelo 1400 A.
- Bomba de vácuo, ColeParmer (Vernon Hills, EUA).
- Centrífuga, Fanen, modelo 206BL.

- Coluna C_{18} Novapak (waters, Milford, Massachusetts, EUA), com partículas esféricas, diâmetro médio de 4 μ m. Coluna com 3,9 mm de d.i e 150 mm de comprimento.

- Cromatógrafo a Líquido Waters 510 (Millford, MA, EUA), equipado com válvula Rheodyne 8125 (Cotati, CA, EUA) com um alça de amostragem de 5 μ L. A detecção foi feita utilizando-se um detector UV-vis Shimadzu modelo SPD-10 utilizado em $\lambda = 210$ nm, sendo que o sinal de absorbância foi avaliado pelo programa de detecção e integração ChromPerfect.

- Espectrômetro de absorção no infravermelho, Bomem MB-102 (ABB, St-Laurent, Canadá)

- Microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM-6360LV.

- pHmetro, Micronal, modelo B474.

- Peneira de 75 e 100 μ m, para análise e controle granulométrico, da Abrozinox.

- Seringas de polipropileno (80 mm x 0,5 mm d.i.)

- Sistema de deionização de água, Milli-Q Plus, Millipore.

2.3. Amostras

Amostras de plasma humano foram cedidas pelo banco de sangue do Hospital das Clínicas da Unicamp (Campinas, SP, Brasil). O plasma foi preparado de acordo com o procedimento convencional: o sangue foi coletado por volta das 8 h da manhã, armazenado em bolsas de plasma tratada com heparina (8 a 10 IU de heparina por mL de sangue), centrifugado a 2500 rpm por 20 min sendo o sobrenadante armazenado a – 20°C até posterior análise.

2.4. Preparo dos Materiais Impressos preparados pelo PSG.

Cerca de 100 mg de APTMS e 500 mg de TEOS foram misturados em um tubo e agitado em vortex com 1,5 mL de solução aquosa saturada de ácido barbitúrico (contendo 213 mg de template). Imediatamente foram adicionados 200 μ L de hidróxido de amônio concentrado (catalisador). A mistura foi aquecida sob agitação a 40 °C até formação de material monolítico. O material resultante foi resfriado a temperatura ambiente e os monolitos obtidos foram macerados e peneirados de modo que a granulometria média das partículas variaram entre 75 a 100 μ m. A remoção do *template* foi feita utilizando-se extração por Soxhlet (metanol). Paralelamente, foi preparado um material sem adição de ácido barbitúrico, para comparação. Foram recheadas seringas de polipropileno (80 mm x 5 mm d.i.) com 300 mg de MIS e NIS.

2.5. Determinações cromatográficas.

As análises por HPLC foram conduzidas em um Cromatógrafo a Líquido Waters 510 (Milford, MA, EUA), equipado com coluna C_{18} (3,9 x 150 mm, 4µm) NovaPak (Milford, MA, EUA). Uma válvula Rheodyne 8125 (Cotati, CA, EUA) com uma alça de amostragem de 5 µL foi utilizada. A detecção foi feita utilizando-se um detector UV-vis, sendo que o sinal de absorbância foi avaliado pelo programa de detecção e integração ChromPerfect. As fases móveis utilizadas nas determinações foram: uma mistura de 20 % de acetonitrila e 80 % de água (v/v) a um pH ajustado em 3,0, (o ajuste do pH foi feito para água deionizada utilizando-se H₃PO₄, antes da mistura com acetonitrila) sendo que a vazão utilizada foi de 0,8 mL min⁻¹, para separação de mistura contendo fenobarbital, paracetamol, ácido acetilsalicílico e cafeína; o comprimento de onda utilizado no detector foi de 210 nm.

2.6. Caracterização Química da MIS e NIS.

A caracterização da sílica impressa molecularmente (MIS) e não impressa molecularmente (NIS) foi feita através de espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) para avaliar os grupamentos existentes nos materiais. As análises de IV foram conduzidas em um espectrômetro Bomem MB-102 (ABB, St-Laurent, Canadá). As amostras foram prensadas com brometo de potássio sob vácuo, na proporção de 10:1, formando pastilhas adequadas para análises na região do infravermelho (IV). Os espectros de IV foram obtidos no intervalo espectral de 4.000 a 500 cm⁻¹, empregando uma resolução de 4 cm⁻¹ e uma taxa de 20 varreduras por minuto.

Além disso, a morfologia dos materiais foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). Na SEM, as partículas foram fixadas em porta amostras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura.

2.7. Otimização do método de MISSPE-HPLC-UV.

Misturas teste metanólica contendo 10 μ g mL⁻¹ de cafeína, paracetamol, ácido acetilsalisílico e fenobarbital foram utilizadas nos experimentos de otimização. A seletividade do ormosil impresso molecularmente foi avaliada através da extração de soluções aquosas contendo fenobarbital, cafeína, paracetamol e ácido acetilsalisílico. Como auxílio de uma mini bomba de vácuo, 5 mL de metanol e 5 mL de água foram

eluídos através dos cartuchos para condicionamento e em seguida extraiu-se 10 mL de mistura teste a uma vazão de 2 mL min⁻¹. Os analitos foram eluídos com 2 mL de solvente de dessorção e o extrato foi imediatamente cromatografado. Foram estudados efeitos de natureza do solvente de dessorção e solvente da amostra e volume de solvente de dessorção. Para os estudos de solvente de sorção e solvente da amostra, foram testados clorofórmio, acetonitrila, metanol e diclorometano.

Figuras de mérito quantitativas do método otimizado foram determinadas através de curvas analíticas (adição de padrão) obtidas a partir de soluções aquosas de fenobarbital na faixa de 10 a 100 μ g L⁻¹. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

2.8. Aplicações a amostras de plasma humano.

Amostras de plasma humano foram fortificadas com 30 μ g mL⁻¹ de fenobarbital. Antes de cada extração os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol seguido de 2 mL de água. Antes das extrações, 100 μ L de amostra foram desprotenizadas por adição de 100 μ L de HClO₄ (1,5 mol L⁻¹) e 500 μ L de água deionizada. A amostra foi agitada em vórtex por 5 min e centrifugada por 5 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi extraído e o cartucho lavado com 1 mL de água deionizada, seco por 30 s sob vácuo, e eluído com 1 mL de metanol. O metanol foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o resíduo foi redissovido em 1 mL de fase móvel, com posterior análise por HPLC. Para comparação, o mesmo procedimento foi realizado a amostras de plasma fortificado não precipitado (sem separação de proteínas).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização Química e Estrutural do MIS e NIS.

Os espectros de absorção no IV para MIS e NIS preparados pelo PSG estão mostrados na Figura II-1. As bandas de absorção em ~3440 cm⁻¹ (I) podem corresponder aos estiramentos das ligações O-H, e são atribuídos a silanóis não condensados, água residual e grupos aminopropil ligados à cadeia de sílica. As bandas em 785 cm⁻¹ (V), 2935 cm⁻¹ (II) podem ser atribuídas as ligações C-H. Outra banda de absorção associada a aminas primárias está localizada em 1650 cm⁻¹ (III, N-H). Finalmente, as bandas em 1075 cm⁻¹ (IV) e 460 cm⁻¹ (VI) correspondem a ligações Si-O e Si-O-Si [4]. Os espectros são similares e alguma diferença entre esses materiais (especialmente as propriedades sortivas) pode ser devida a diferenças morfológicas causadas pelo processo de impressão molecular, como será mostrado posteriormente.



Figura II-1: Espectro de absorção no infravermelho para MIS e NIS. (I) O-H, N-H, (II) C-H, (III) N-H, (IV) Si-O, (V) C-H e (VI) Si-O.

A morfologia dos materiais pode ser observada na Figura II-2, que mostra micrografias obtidas com diferentes aumentos. Com um aumento de 20000 vezes, os materiais parecem não apresentar poros visíveis. As diferenças aparecem quando as partículas de MIS e NIS são examinadas com um aumento de 50000 vezes. Ambos aparentemente são agregados de partículas irregulares.; no entanto, as estruturas do MIS possuem diâmetros entre ~100 nm até ~500 nm, enquanto que nas subestruturas do NIS, as partículas são menores, com diâmetros variando entre ~50 a ~100 nm. Essas pequenas diferenças entre as estruturas do MIS e NIS podem ser consequência da diferença na velocidade das reações sol-gel. Considerando que o catalisador empregado foi uma base (hidróxido de amônio) e o *template* foi um ácido fraco (ácido barbitúrico), é possível que o catalisador seja parcialmente neutralizado pelo *template*,

diminuindo as taxas iniciais de hidrólise e condensação do TEOS e APTMS. Além disso, a quantidade de água disponível para a hidrólise do precursor é menor na síntese do MIS, já que na produção do NIS, água pura é adicionada ao invés de solução saturada de ácido barbitúrico. Como o reticulado de sílica cresce ao redor de núcleos de condensação iniciais suspenso na fase sol [5], taxas de reações iniciais mais rápidas podem causar mais núcleos disponíveis para agir como ponto para geração de reticulados de sílica macroscópica, resultando em grãos maiores no diferença poderia material final, como observado NIS. Esta no causar comportamentos sortivos distintos entre os materiais: o NIS deveria ser mais poroso, graças ao maior número de canais entre as partículas que o constitui. Isso poderia resultar em maior eficiência de sorção quando comparado ao MIS. Como isso não foi observado pode-se assumir que a diferença observada nas microestruturas dos materiais não teve impacto significativo nas diferenças entre seus comportamentos sortivos.


Figura II-2: Micrografias para o MIS e NIS sol-gel. Aumentos de 20000 e 50000 vezes.

A Figura II-3 mostra uma sequência de reações propostas para a síntese sol-gel do MIS impresso com ácido barbitúrico. Na primeira etapa (1), é formado um complexo não covalente entre o ácido barbitúrico (*template*) e o monômero funcional (APTMS) através de ligações de hidrogênio entre essas espécies. Esses complexos não covalentes podem hidrolisar e condensar com TEOS (2), sendo incorporado as cadeias de polissilicatos modificadas com aminopropila. Após completa gelificação, é feita a remoção do *template* através de extração por Soxhlet (3), produzindo nanocavidades na cadeia de sílica modificada. Estas cavidades podem agir como sítios de ligação específicos para moléculas com estrutura similar ao *template*, como o fenobarbital. Portanto, durante o processo de extração, cada molécula do analito pode se religar ao material sorvente (4).



Figura II-3: Proposta de reação para a preparação do MIS: 1: geração de complexo não covalente, 2: hidrólise e policondensação do complexo APTMS / ácido barbitúrico e TEOS,
3: remoção do *template* e água da cadeia de polissilicato durante extração por Soxhlet, 4: religamento do fenobarbital aos sítios adsortivos durante o processo de extração.

3.2. Método de MISSPE-HPLC-UV.

Foi avaliada a eficiência de dessorção e solvente da amostra dos analitos utilizando diferentes solventes. Foram testados como solventes acetonitrila, clorofórmio, diclorometano e metanol. A Figura II-4 compara as áreas dos picos obtidos após extração de 10 mL de solução aquosa teste (10 µg L⁻¹) de fenobarbital e sorção / dessorção com vários solventes de dessorção. A eficiência de dessorção diminui na seguinte ordem: metanol > acetonitrila > clorofórmio ≈ diclorometano. Foi avaliado também o efeito do solvente para dissolução da amostra na eficiência de extração dos analitos, usando soluções teste de fenobarbital nos mesmos solventes estudados acima, utilizando metanol para dessorção (Figura II-4). A eficiência de extração foi maximizada na seguinte ordem: clorofórmio > diclorometano > acetonitrila ≈ metanol. Esses resultados podem ser interpretados considerando a polaridade dos solventes. A eficiência é maximizada para extrações a partir de amostras dissolvidas em clorofórmio e diclorometano, que são menos polares do que o metanol e acetonitrila e não competem com o MIS pelo fenobarbital (polar). A polaridade dos solventes halogenados é similar, no entanto, diclorometano é o melhor aceptor de prótons, e portanto as extrações a partir de soluções de clorofórmio são mais eficientes.



Figura II-4: Dependência da quantidade de fenobarbital (expresso em área de picos) com a natureza do solvente de sorção e dessorção.

Após seleção do solvente de dessorção (metanol), foi otimizado o volume do solvente de dessorção (Figura II-5). Nesse experimento, percolou-se uma solução de fenobarbital aquoso pelo cartucho de MIS, lavou-se esse cartucho com água e dessorveu-se com diferentes volumes de metanol. Foram avaliados volumes desde 1 até 6 mL e verifica-se que 4 mL são suficientes para completa dessorção do fenobarbital.



Figura II-5: Dependência da eficiência de dessorção (em %) com o volume do solvente de dessorção (mL) para fenobarbital.

A dependência entre o pH da amostra aquosa e eficiência de extração pode ser observada na Figura II-6. Para fenobarbital, a eficiência de extração é maximizada em pH 4.



Figura II-6: Dependência entre massas recuperadas de fenobarbital e o pH de amostras aquosas testadas, após extração com cartucho de MIS.

A seletividade do MIS foi avaliada extraindo-se soluções aquosas teste contendo fenobarbital e outras espécies (fármacos) - paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico - que podem ser potenciais interferentes. A Figura II-7 compara os cromatogramas de HPLC-UV obtidos após extração de uma amostra dopada com estas espécies e pela injeção da solução estoque metanólica dos analitos. Além de fenobarbital, cafeína e paracetamol também foram extraídos. A retenção do ácido acetilsalicílico foi mínima. Estes resultados podem ser discutidos em vista das estruturas moleculares destas espécies comparadas a do *template* empregado no preparo do MIS (Figura II-8). Fenobarbital (**b**) pode ser considerado um derivado do ácido barbitúrico (**a**) pela substituição de átomos de H na posição 5 da cadeia heterocíclica. A afinidade do MIS pelo fenobarbital pode ser resultado de interações dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio entre os grupos amino e carbonila na cadeia

pirimidinatriona e os grupos 3-aminopropil especificamente posicionados no interior das nanocavidades criadas na cadeia de sílica após impressão molecular do ormosil. Paracetamol e cafeína possuem fragmentos estruturais similares ao *template*. A cadeia de xantina da cafeína consiste de grupos amina e carbonila alternados, similares à base estrutural de pirimidietriona do *template*. Para o paracetamol, a ligação ao MIS pode ocorrer através do radical acetamido na posição 4 da cadeia aromática, que é estruturalmente relacionado ao *template*. Além da similaridade estrutural, cafeína e paracetamol possuem tamanhos moleculares compatíveis com as nanocavidades impressas com ácido barbitúrico. Por outro lado, ácido acetilsalicílico não possui nem similaridade estrutural e nem tamanho compatíveis com o *template*, por isso é fracamente retido. Assim, o MIS preparado a partir de ácido barbitúrico é seletivo para barbituratos e outras espécies com similaridades estruturais. O IF para fenobarbital, calculado a partir do cromatograma obtido após extração de plasma tratado (Figura II-9), foi estimado em 58, sugerindo que a retenção dessa espécie ocorre por ligações específicas ao MIS.



Figura II-7: Cromatogramas de HPLC-UV correspondente a injeção direta de solução estoque metanólica contendo paracetamol (1), cafeína (2), ácido acetilsalicílico (3) e fenobarbital (4) e extrato metanólico obtido após eluição de amostras teste aquosas.



Figura II-8: Estruturas moleculares do *template* (ácido barbitúrico, **a**) e os analitos testados: fenobarbital (**b**), paracetamol (**c**), cafeína (**d**) e ácido acetilsalicílico (**e**).

Fragmentos estruturais dos analitos similares ao *template* estão assinalados pelas linhas pontilhadas.

3.3. Aplicação ao plasma humano.

A Figura II-9 mostra cromatogramas obtidos após extração de plasma humano fortificado com 30 μ g L⁻¹ de fenobarbital, antes e após remoção de proteínas. Esse nível de concentração foi selecionado considerando a faixa de concentração terapeuticamente efetiva dessa droga (15 a 40 μ g L⁻¹). Em todos os cromatogramas, existe um grupo de picos com t_R de até 3,5 min, que correspondem a espécies extraídas através de interações não específicas. Com exceção desses picos, os cromatogramas são extremamente limpos; no cromatograma de MIS, pode-se observar apenas os sinais para fenobarbital (t_R = 10,40 min) e para duas espécies não identificadas, com t_R de 6,60 e 9,95 min. As recuperações nas extrações para plasma tratado e não tratado foram, respectivamente: 75 e 40 %; essa diferença pode ser atribuída a possíveis perdas nas frações de analito ligada as proteínas, em amostras sem desproteinização. Também pode ter ocorrido obstrução das nanocavidades do MIS pelas proteínas. Os cartuchos puderam ser reutilizados em até 5 vezes.

Esse resultado mostra a resistência do material frente a eluição de plasma sem qualquer tratamento, que poderia ocasionar, em outros materiais, rápida degradação devido à adsorção irreversível de proteínas e lipídeos [6].



Figura II-9: Cromatogramas de HPLC-UV de extrato metanólico de plasma humano bruto (cromatograma superior) e desproteinado (cromatograma inferior) fortificados com 30 μ g L⁻¹ de fenobarbital usando MIS (linha cheia) e NIS (linha pontilhada). Pico do fenobarbital está ilustrado com uma seta.

4. CONCLUSÕES

O material proposto impresso preparado pelo PSG demonstrou ser eficiente e seletivo na extração de fenobarbital em amostras de plasma. Esse material pode ser facilmente sintetizado através de uma rota de policondensação simples. As análises por HPLC-UV mostraram cromatogramas extremamente limpos. Para o preparo dos

materiais impresso e não impresso, foram consumidos baixas quantidades de reagentes. Além disso, foi utilizado um pequeno volume de amostra. Todas essas vantagens demonstram um atrativo para o emprego desta metodologia na determinação de fenobarbital.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] E.F. Freire, J.L. Miranda, P.P. Maia, E.P. Vieira, K.B. Borges, M.E.P.B. Siqueira, Quim. Nova 28 (2005) 773.

[2] P. Kwan, M. Brodie, Epilepsia 45 (2004), 1141.

[3] Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camañas, M.J. Medina-Hernández, Biomed. Chromatogr. 14 (2000) 113.

[4] R.M. Silverstein, F.X. Webster, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6° ed. *Wiley, New York*, (1997).

[5] J. Brinker, G. Scherer, Sol-Gel Science, New York, Academic Press (1989).

[6] A. Vintiloiu, W.M. Mullett, R. Papp, D. Lubda, E. Kwong J. Chromatogr. A 1082 (2005) 150.

Capítulo III

SÍLICA ORGANICAMENTE MODIFICADA IMPRESSA MOLECULARMENTE COM ATRAZINA

1. INTRODUÇÃO

A agricultura utiliza diversos compostos químicos com o objetivo de atuarem como pesticidas. As triazinas são compostos heterocíclicos cuja síntese tem despertado interesse em função de algumas aplicações. Esses compostos foram reportados diversas vezes na literatura, sendo utilizados como corantes [1,2] e herbicidas [3].

No Brasil existe uma intensa agricultura de cana de açúcar que necessita de grandes quantidades de aplicação de herbicidas que proporcionam uma melhoria significativa na produtividade agrícola. Porém, a utilização intensiva destes insumos pode ter papel fundamental na contaminação ambiental, principalmente em águas superficiais, enfatizando a importância na determinação desses compostos.

A atrazina é um composto regulamentado desde os anos 90, tendo sido estabelecidos limites máximos para a sua detecção em águas de consumo, 3 μ g L⁻¹ nos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) e 0,1 μ g L⁻¹ na União Européia [4].

Baseado na importância da determinação de triazinas, este trabalho teve como objetivo a síntese de um MIS seletivo para triazinas (simazina, propazina e atrazina, Figura III-1), sendo o mesmo aplicado na análise de simazina, propazina e atrazina em amostras de caldo de cana. Foi realizada uma comparação do ormosil preparado em laboratório com um MIP comercial seletivo para triazinas.



Figura III-1: Estruturas dos herbicidas triazínicos avaliados neste estudo: atrazina, simazina e propazina.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes

- Acetonitrila, Tedia (Fairfield, OH, USA).
- Água deionizada Milli Q Plus, Millipore.
- Atrazina, Supelco (Bellefonte, PA).
- Aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) Acros (Morris Plains, NJ, EUA).
- Diuron, Dupont (Rio de Janeiro, Brasil).
- Etanol, Tedia (Rio de Janeiro, Brasil).
- Hidróxido de amônio p.a., J.T. Baker (São Paulo, Brasil).
- Linuron, Dupont (Rio de Janeiro, Brasil)
- Metanol, grau cromatográfico, Tedia.
- Propazina, Supelco (Bellefonte, PA).
- Simazina, Supelco (Bellefonte, PA).
- Tetraetilortossilicato (TEOS) Acros (Morris Plains, NJ, EUA).

2.2. Materiais

- Agitador vórtex, Phoenix modelo AP56.
- Balança analítica, Boeco, precisão de 0,0001 g.
- Banho termostatizado, Cole Parmer, modelo Polystat.
- Banho ultra-som, Maxiclean, modelo 1400 A.

- Cartuchos comerciais de SPE seletivo para triazinas (SupelMIP®, com 25 mg) Supelco.

- Centrífuga, Fanen, modelo 206BL.

- Coluna C_{18} Novapak (Milford, Massachusetts, EUA), com partículas esféricas, diâmetro médio de 4 μ m. Coluna com 3,9 mm de d.i.

- Cromatógrafo a Líquido Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado válvula Rheodyne com uma alça de amostragem de 5 μ L. A detecção foi feita utilizando-se um detector UV-vis no comprimento de onda de 254 nm, sendo que o sinal de absorbância foi avaliado pelo programa de detecção e integração ChromPerfect (Justice Laboratory Solutions, Mountain View, California).

- Espectrômetro de absorção no infravermelho, Bomem MB-102 (ABB, St-Laurent, Canadá)

- Microscópio eletrônico de varredura Jeol modelo JSM-6360LV.

- pHmetro, Micronal, modelo B474.

- Peneira de 75 e 100 µm, para análise e controle granulométrico (Abrozinox).

- Seringas de polipropileno (80 mm x 0,5 mm d.i.)

- Sistema de deionização de água, Milli-Q plus, Millipore.

2.3. Amostras

Foram utilizadas as amostras de águas coletadas em lagos dentro da UNICAMP (Latitude: 22°49'91"S e Longitude: 47°03'47"O), que foram filtradas (filtro de 0.45 μ m), armazenadas em garrafas de vidro a 4 °C até análise. As amostras de água foram dopadas com solução estoque de herbicidas em diferentes concentrações. Amostras de caldo de cana de açúcar ("garapa") foram obtidas de uma plantação orgânica, sendo filtradas com papel de filtro (poros de 14 μ m) antes de serem percoladas pelos cartuchos.

2.4. Preparo dos materiais impresso e não impresso seletivo para triazinas.

A uma mistura de 300 mg de APTMS e 250 mg de TEOS, foi adicionado 2 mL de solução saturada de atrazina e 200 μ L de NH₄OH. A mistura foi aquecida sob agitação a 40 °C até gelificação. O material resultante foi resfriado a temperatura ambiente e os monolitos obtidos foram macerados e peneirados (granulometria: 75 a 100 μ m). A atrazina foi removida através de extração por Soxhlet usando metanol como solvente extrator. Paralelamente, foi preparado um material sem adição de *template* para comparação e verificação do reconhecimento molecular (material não impresso, NIS).

2.5. Determinações cromatográficas.

Para análise e determinação das triazinas, foi utilizado um cromatógrafo líquido da Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado com coluna Novapak C₁₈ (3,9 x 150 mm) da Waters (Milford, Massachusetts, USA). Uma válvula Rheodyne (com alça de amostragem de 5 μ L) foi utilizada. A detecção foi feita utilizando-se um detector UV-vis no comprimento de onda de 254 nm, sendo que o sinal de absorbância foi avaliado pelo programa de detecção e integração ChromPerfect (Justice Laboratory Solutions, Mountain View, California). A fase móvel utilizada na determinação das triazinas foi uma mistura de 30 % de acetonitrila e 70 % de água (v/v) a um pH ajustado em 3,0 com H₃PO₄, sendo que a vazão utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹.

2.6. Caracterização dos materiais.

A caracterização do MIS e NIS foi feita através de espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) para avaliar os grupamentos existentes nos materiais. As análises de IV foram conduzidas em um espectrômetro Bomem MB-102 (ABB, St-Laurent, Canadá). As amostras foram prensadas com brometo de potássio sob vácuo, na proporção de 10:1, formando pastilhas adequadas para análises na região do infravermelho (IV). Os espectros de IV foram obtidos no intervalo espectral de 4.000 a 500 cm⁻¹, empregando uma resolução de 4 cm⁻¹ e uma taxa de 20 varreduras por minuto.

A morfologia dos materiais foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). Na SEM, as partículas foram fixadas em porta amostras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura.

2.7. Procedimento de extração.

Para o preparo dos cartuchos de extração foram utilizadas seringas de polipropileno com dimensões reduzidas (70 mm x 0,2 mm d.i.), que foram previamente limpas e secas. Foram preparados cartuchos de extração contendo material impresso e não impresso através do enchimento de 25 mg destes nos cartuchos. Estes foram primeiramente condicionados com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de água deionizada. Os cartuchos de MIS e NIS foram comparados com cartuchos comerciais da Supelco (25 mg SupelMIP) seletivos para triazinas. O cartucho comercial foi condicionado com 1 mL de metanol, 1 mL de água deionizada, 1 mL de fosfato de amônio 25 mmol L⁻¹, a pH 3, conforme exigido pelo fabricante. O cartucho foi seco após condicionamento. Alíquotas de 10 mL de amostra foram extraídas, sendo que a lavagem do cartucho durante 20 min e em seguida, adicionouse 1,5 mL de diclorometano. Os analitos foram eluídos com 3 x 1 mL de metanol. Além disso, foi avaliada também a repetibilidade no preparo dos MIS.

2.8. Aplicações a amostras de garapa.

Amostras de caldo de cana foram dopadas com solução estoque metanólica de atrazina, simazina, propazina (análogos ao *template*), diuron e linuron (50 μ g L⁻¹) (estruturalmente diferentes). Antes da extração, o cartucho foi condicionado com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de água deionizada. Alíquotas de 10 mL de amostra foram extraídas e dessorvidas com 5 mL de metanol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização química e morfológica dos materiais.

A estrutura do MIS pode ser prevista considerando que a atrazina contém grupos funcionais que irão interagir como o APTMS, formando um complexo estável entre monômero e *template* (APTMS e atrazina, M-T). São formadas ligações de hidrogênio entre o nitrogênio e o cloro da atrazina com os grupos aminopropila do APTMS. Um possível esquema está mostrado na Figura III-2, ilustrando a síntese, remoção e religamento do analito alvo no MIS. As cadeias de polissilicato produzidas pelas reações de hidrólise e condensação que ocorrem no PSG pode incorporar o complexo M-T (etapa **A**). A viscosidade da solução sol aumenta gradativamente, tornando a fase sol interconectada, formando um gel. Após gelificação e secagem da MIS, a remoção da atrazina (etapa **B**) produz nanocavidades na cadeia de sílica, compatíveis com as triazinas avaliadas neste estudo. Estas cavidades agem como sítios de ligação específicos para estas espécies em uma eventual extração (etapa **C**).



Figura III-2: Reação sugerida para o preparo e aplicação da MIS: (A) hidrólise e policondensação do complexo M-T (APTMS-atrazina), (B) remoção do template e água da cadeia de polissilicato durante lavagem com solvente e (C) religamento dos herbicidas triazínicos nos sítios específicos durante a etapa de extração.

A Figura III-3 mostra micrografias para os materiais impresso com atrazina e não impresso. Em a, aumento de 10000 vezes, o material impresso se mostrou lamelar, com uma estrutura não porosa e partículas irregulares. O material não impresso (b, aumento de 50000 vezes) possui aparência de um agregado de partículas com alta densidade.



(a)



Figura III-3 Micrografias obtidas para ormosil impresso com atrazina, MIS (a) e não impresso, NIS (b).

Os espectros de absorção no infravermelho para os materiais impresso com atrazina e não impresso estão ilustrados na Figura III-4 A banda de absorção em ~1063 cm⁻¹ (**5**, na Figura 34) corresponde a ligação Si-O-Si. As bandas em ~3443 e cm⁻¹ (**1**) e 1630 cm⁻¹(**4**) podem corresponder aos estiramentos das ligações O-H e N-H, e podem ser atribuídos a silanóis não condensados, água residual e grupos aminopropil ligados à cadeia de sílica. As bandas em 785 cm⁻¹ (**6**) e 455 cm⁻¹ (**7**) são resultado de vibrações da ligação Si-O. Bandas características da sílica impressa e não impressa estão em 1560 cm⁻¹ (**3**), que são associadas a aminas primárias. A banda em 2935 cm⁻¹ (**2**) pode ser atribuída a ligação C-H [5].



Figura III-4 Espectro de absorção no infravermelho para MIS (A) e NIS (B). (1) O-H, N-H, (2) C-H, (3) N-H, (4) N-H, (5) Si-O-Si, (6) Si-O e (7) Si-O.

3.2.Otimização do método de MISSPE-HPLC-UV.

Em todas as etapas foi utilizado metanol para dessorção dos analitos. Foi otimizado o volume do solvente de dessorção. Os resultados estão ilustrados na Figura III-5. Para simazina, propazina e atrazina, 6 mL de metanol foi suficiente para alcançar a completa dessorção dos analitos.



Figura III-5: Dependência da eficiência de dessorção (em %) com o volume do solvente de dessorção para simazina (), propazina (o) e atrazina (Δ).

Para verificar a seletividade do material para reter compostos triazínicos, foi realizada a extração de uma mistura teste aquosa contendo herbicidas triazínicos: simazina (1), atrazina (2), propazina (4) e não triazínicos: diuron (3), e linuron (5), utilizando MIS e NIS. Nestes experimentos, foram utilizadas misturas teste 300 μ g L⁻¹. Os resultados estão mostrados na Figura III-6. O ormosil impresso molecularmente foi sintetizado usando atrazina como *template*, então é esperada a extração de compostos similares, como outras espécies triazínicas. Por outro lado, MIS exibiu alta seletividade para as triazinas avaliadas, enquanto que o NIS não extraiu nenhum dos compostos.



Figura III-6: Cromatogramas obtidos após extração de 10 mL de água dopada com 300 μ g L⁻¹ de mistura teste contendo simazina (1), atrazina (2), diuron (3), propazina (4) e linuron (5). Condições cromatográficas: coluna NovaPak C18, vazão de 0.8 mL min⁻¹fase móvel acetonitrila : água pH 3 (30:70 v/v), detecção a 220 nm.

Outro parâmetro avaliado foi a repetibilidade do preparo do MIS. Foram preparados dois lotes dos materiais com meses intercalados. Os desvios padrão relativos variaram entre 5 a 16 % para as três triazinas avaliadas na faixa entre 300 e 500 μ g L⁻¹ (Figura III-7). Com exceção da extração da atrazina, a repetibilidade das extrações utilizando diferentes cartuchos foi satisfatória.



Figura III-7: Avaliação da repetibilidade no preparo dos materiais impressos molecularmente preparados pelo PSG, utilizando dois níveis de concentração: (a) $300 \ \mu g \ L^{-1}$ e (b) $500 \ \mu g \ L^{-1}$.

3.3. Aplicação a amostras de garapa.

O desempenho do ormosil impresso molecularmente foi comparado a um polímero de impressão molecular comercial do tipo acrílico (SupelMIPTM), seletivo para triazinas na extração de amostras de caldo de cana dopadas com compostos

triazínicos.. As eficiências de extração e seletividade para ambos cartuchos foram similares (Figura III-8; dependendo da concentração, as concentrações para o MIS variaram entre 79 a 99 % (simazina), 81 a 116 % (atrazina) e 99 a 105 % (propazina). Já para o cartucho de MIP comercial as recuperações variaram entre 75 a 107 % (simazina), 76 a 81 % (atrazina) e 80 to 94 % (propazina).



Figura III-8: Cromatogramas de HPLC-UV obtidos após MISPE com cartucho de MIP comercial e MIS de 10 mL de caldo de cana de açúcar dopado com mistura teste contendo simazina (1), atrazina (2), propazina (4), diuron e linuron (não extraídos).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na impressão de atrazina utilizando a tecnologia sol-gel sugerem que as reações de hidrólise e policondensação providenciam uma rota adequada para a síntese do MIS. Na extração de amostras de caldo de cana, a comparação dos resultados mostra que a sílica organicamente modificada impressa molecularmente apresenta resultados comparáveis com os obtidos com o cartucho comercial. As recuperações obtidas para ambos materiais são muito similares; o cartucho comercial apresenta uma maior recuperação para simazina. As recuperações obtidas com o ormosil variaram entre 40 a 81 % e com o cartucho comercial variaram entre 64 e 75 %.

Outra vantagem do material proposto é o baixo custo quando o cartucho preparado em laboratório é comparado ao cartucho comercial. Uma boa seletividade foi obtida, já que nenhum interferente foi observado nas análises de caldo de cana. Além disso, os cartuchos preparados em laboratório puderam ser reutilizados em torno de 5 vezes, enquanto que os cartuchos comerciais não puderam ser reutilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] M.F. Cavalcante, M.C.C. Oliveira, J.R. Velandia, A. Echevarria, Quim. Nova, 23 (2000) 20.

[2] M. Jarman, H.M. Coley, PCT Int. Appl. WO9320,056 Pat.; CA 1994, 120, 134536j.

[3] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, J. Hernández-Méndez, Journal of Chromatogr. A 869 (2000) 451.

[4] M.J. Cerejeira, P. Viana, S. Batista, T. Pereira, E. Silva, M.J. Valério, A. Silva, M. Ferreira, A.M. Silva-Fernandes, Water Res. 37 (2003) 1055.

[5] R.M. Silverstein, F.X. Webster, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6° ed. New York, Wiley (1997).

CONCLUSÕES GERAIS

A grande maioria dos meios impresso molecularmente são baseados no uso de polímeros acrílicos e uma alternativa atrativa é o uso de materiais híbridos orgânicosinorgânicos baseados em sílica organicamente modificada. Nesse trabalho os ormosils com impressão molecular foram preparados através de uma rota sol-gel simples, sendo esses materiais avaliados como sorventes específicos para extração em fase sólida de três diferentes famílias de compostos: metilxantinas, fenobarbital e compostos triazínicos. Os ormosils impressos molecularmente utilizando-se os diversos *templates* apresentaram alta seletividade para os analitos alvo. Os resultados obtidos demonstraram o potencial desses materiais preparados através da tecnologia sol-gel para aplicações analíticas. Eles podem ser facilmente sintetizados através de rotas de policondensação sol-gel e aplicados em diversas matrizes (amostras ambientais e biológicas).

O material preparado através da impressão com cafeína demonstrou alta seletividade para metilxantinas, gerando cromatogramas extremamente limpos, alcançando os objetivos propostos. Já o ormosil impresso com ácido barbitúrico foi aplicado no isolamento de fenobarbital de amostras aquosas de plasma humano. O material impresso com atrazina se mostrou altamente seletivo para os herbicidas triazínicos, obtendo-se cromatogramas extremamente livre de interferentes, quando comparados com o cartucho comercial seletivo para triazinas.

Uma das grandes vantagens do uso desses materiais impressos preparados pelo PSG aplicada a SPE é a reutilização. Enquanto que os sorventes comerciais são utilizados apenas uma vez, os materiais preparados em laboratório puderam ser reutilizados por diversas vezes.

Como a combinação da impressão molecular com a tecnologia sol-gel mostrouse vantajosa, ela poderá ser aplicada futuramente na confecção de fases extratoras para microextração em fase sólida (SPME). Devido ao limitado número de fases poliméricas comerciais para SPME, para determinadas amostras ela apresenta reduzida seletividade. O emprego dos MIP em SPME surge como uma opção viável para promover uma extração mais seletiva e, consequentemente, melhorar a etapa de separação cromatográfica.