



**Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Química**

TESE DE DOUTORADO

***Polímero impresso molecularmente
mediado por íons para extração em fase sólida
de quercetina em amostras fitoterápicas***

Lilian Rodrigues Braga

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristi Basile Dias

Brasília, DF.

2013



**Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Química**

TESE DE DOUTORADO

***Polímero impresso molecularmente
mediado por íons para extração em fase sólida
de quercetina em amostras fitoterápicas***

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília como parte do
requisito exigido para a obtenção do Título de
Doutora em Química.

Lilian Rodrigues Braga

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristi Basile Dias

Brasília, DF.

2013



COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do (a) aluno (a) **Lilian Rodrigues Braga**, matrícula nº 09/0083806, intitulada “**Polímero Impresso Molecularmente Mediado por Íons para Extração em Fase Sólida de Quercetina em Amostras Fitoterápicas**”, apresentada no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 15 de outubro de 2013.

Profª Drª Ana Cristi Basile Dias
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Profº Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
Membro Titular (DQ/UJEL)

Profª Drª Lorena Carneiro Albernaiz
Membro Titular (FS/UnB)

Profº Dr. Fabrício Machado Silva
Membro Titular (IQ/UnB)

Profª Drª Fernanda Vasconcelos de Almeida
Membro Titular (IQ/UnB)

Profº Dr. Alexandre Fonseca
Membro Titular (IQ/UnB)

Em 15 de outubro de 2013.

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Jez Willian Batista Braga por seu amor incondicional, pelos auxílios e por estar sempre ao meu lado. E aos meus amados pais Francisco Rodrigues da Silva e Ademilda Rodrigues da Silva e meu querido irmão Juliano Rodrigues da Silva pelo amor, exemplo, incentivo e por estarem sempre juntos a mim em todos os momentos de minha vida.

Agradecimentos

- Agradeço a Deus, por toda luz, força, fé e principalmente pela oportunidade de conseguir finalizar mais esta etapa de estudo.
- Em especial, agradeço a Profa. Dra. Ana Cristi Basile Dias, pela oportunidade da realização deste trabalho, pela orientação, paciência, convivência e amizade.
- Ao meu querido esposo por seu amor, companheirismo, paciência e apoio em toda esta jornada.
- A minha família, meus pais Francisco Rodrigues da Silva e Ademilda Rodrigues da Silva e meu irmão Juliano Rodrigues da Silva pelo incentivo, apoio, carinho e companheirismo durante toda a minha vida.
- Um obrigado muito especial as minhas queridas amigas Sheila Marques Evangelista e Lorena Cristina da Cruz Lima por estarem sempre ao meu lado principalmente nos momentos mais difíceis desta Jornada.
- A jovem Amanda Rosa, aluna de técnica de pesquisa, muito obrigada pela imensa ajuda na realização dos ensaios, pela amizade e companheirismo.
- A todos os amigos do Laboratório AQQUA, muitíssimo obrigada pelos momentos de descontração e inúmeros momentos compartilhados. Agradeço aos professores Fernanda Vasconcelos, Fernando Sodré e Alexandre Fonseca pelas contribuições e amizade para a realização deste trabalho.
- Aos químicos da Central Analítica do Instituto de Química da UnB, Cleber e Arilson, a técnica Ingrid do Laboratório de Microscopia do Instituto de Ciências Biológicas (IB-UnB) e em especial à Química Luciana Diniz do IQ-UnB pela amizade e por está sempre disposta a ajudar.
- Aos funcionários, colegas e amigos do Instituto de Química e a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho e para esta etapa de minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

- Ao órgão de fomento CAPES/REUNI pelo apoio financiamento e pela oportunidade de contribuir na organização e aperfeiçoamento da apostila de Laboratório de Química Fundamental.

“Ao se desejar o cume da montanha, não se repara nas pedras do caminho”.

Arthur Schopenhauer (Filósofo alemão).

Resumo

Esse trabalho objetivou sintetizar um polímero impresso molecularmente (MIP) mediado por íons metálicos através da extração em fase sólida (SPE) de quercetina a partir de dois processos distintos: o baseado em síntese orgânica e em síntese do processo sol gel, para a análise do fitoterápico *Ginkgo biloba* L. Na primeira parte deste estudo foram sintetizados os monômeros funcionais (MF) com os íons Al^{3+} e Cu^{2+} . Posteriormente, esses MF mediados com e sem íons metálicos foram empregados nas sínteses dos MIP por meio da síntese orgânica. Os parâmetros estimados para avaliar a eficiência dos MIP foram capacidade de adsorção, seletividade e precisão. A fim de investigar as características estruturais e químicas, os MIP foram caracterizados pelas técnicas MEV, BET, FTIR e FRX/EDX. Com base nos resultados de caracterização e eficiência do MIP contendo os MF com íons metálicos constatou-se que os materiais não foram adequados para uso como SPE. No caso do MIP sem íons metálicos foi obtida uma eficiência de adsorção duas vezes superior ao polímero não impresso (NIP). Contudo, estes polímeros mostraram baixa seletividade e precisão na determinação da quercetina não sendo aplicado na análise do fitoterápico. Na segunda parte, foi proposta a síntese do processo sol gel (PSG) para obtenção da sílica impressa molecularmente (MIS) mediados com e sem íons Al^{3+} . Os parâmetros estimados foram a capacidade de adsorção, dessorção, seletividade e precisão do MIS como SPE e foram caracterizados empregando as mesmas técnicas anteriores. O SPE desenvolvido com MIS contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de íons Al^{3+} mostrou-se adequado para extração de quercetina em extrato de *Ginkgo biloba* L. de 40 mg e 80 mg, sendo então aplicado como etapa de *clean-up* antes da análise cromatográfica. O polímero demonstrou ser seletivo e apresentou cromatogramas com excelente resolução para o pico de quercetina. Além disso, observou-se que o SPE produzido com MIS-0,01 pode ser reutilizado 5 vezes mantendo seu desempenho analítico.

Palavras-chaves: Quercetina, polímero impresso molecularmente, extração em fase sólida

Abstract

This work aimed the synthesis of a molecular imprinted polymer (MIP) mediated by metal ions for solid phase extraction (SPE) of quercetin from two distinct processes: the organic synthesis and the Sol-Gel Process synthesis, for the herbal medicine *Ginkgo biloba* L. analysis. In the first part of this study, functional monomers (FM) with Al^{3+} and Cu^{2+} ions were synthesized. Then, these FM mediated with and without metal ions were employed in the synthesis of MIP through organic synthesis. The estimated parameters used to evaluate the efficiency of the MIP were adsorption capacity, selectivity and precision. In order to investigate the structural and chemical characteristics of the MIP, different analytical techniques were used, such as: MEV, BET, FTIR and FRX/EDX. Based on the characterization results and the efficiency of the MIP containing MF and metal ions, it was concluded that the materials were not suitable for use as SPE. In the case of the MIP synthesized without metal ions, it was obtained an adsorption efficiency twice better than the one observed in the non-printed polymer (NIP). However, these polymers presented poor selectivity and precision to quercetin determination. Therefore, this material was not applied to the analysis of the herbal medicine. In the second part, it was proposed the synthesis based on Sol-Gel Process (PSG) in order to obtain molecularly imprinted silica (MIS) mediated with and without Al^{3+} ions. The adsorption capacity, desorption, selectivity and precision of the MIS as SPE were estimated and characterized using the same techniques as previously mentioned. The results showed that the MIS containing 0.01 mol L^{-1} of Al^{3+} ions was suitable for use as SPE for quercetin extraction in *Ginkgo biloba* L. 40 mg and 80 mg. The results suggest that the MIS can be used as a *clean-up* step before the chromatographic analysis. The polymer has shown to be selective and presented chromatograms with excellent resolution to the peak of quercetin. Furthermore, it was observed that the MIS-0.01 SPE produced can be reused up to 5 times maintaining its analytical performance.

Keywords: Quercetin, molecular imprinted polymer, solid phase extraction.

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Figuras	xv
Introdução & Objetivos	1
Objetivo Geral	5
Objetivos Específicos	5
Revisão da Literatura	6
1. Fitoterápicos.....	7
1.1. Determinação de flavonóides em fitoterápicos.....	12
2. Polímero impresso molecularmente	14
2.1. Um breve histórico sobre impressão molecular	14
2.2. Processo geral de obtenção de polímero impresso	16
2.2.1. Etapa de remoção da molécula molde.....	19
2.3. Processos de síntese do polímero impresso	22
2.3.1. Síntese orgânica do MIP.....	22
2.3.1.1. MIP para quercetina aplicados a SPE.....	27
2.3.2. Síntese do MIS baseado no PSG.....	29
2.3.2.1. MIS para quercetina aplicado a SPE.....	32
CAPÍTULO I - Síntese e caracterização de polímero impresso molecularmente (MIP) mediados por íons para extração de quercetina	38
1. Introdução	39
2. Metodologia.....	41
2.1. Reagentes	41
2.2. Equipamentos.....	41
2.3. Síntese do monômero funcional modificado com íons metálicos	42
2.4. Estudos de interação Quercetina e Monômero Funcional	43
2.4.1. Avaliação dos solventes	43
2.4.2. Estudo cinético.....	44
2.4.3. Efeito da concentração de quercetina.....	44
2.4.4. Efeito da concentração do monômero funcional	44

2.5. Síntese dos polímeros impressos molecularmente.....	45
2.5.1. Etapa de remoção da molécula molde do MIP	47
2.6. Caracterização química e estrutural dos polímeros	48
2.7. Estudo de desempenho dos polímeros.....	49
2.8. Avaliação da seletividade dos polímeros	50
3. Resultados e discussões.....	51
3.1. Caracterização do monômero funcional modificado com íons metálicos.....	51
3.2. Estudo de interação Quercetina e Monômero Funcional	52
3.2.1. Avaliação dos solventes	52
3.2.2. Estudo cinético.....	54
3.2.3. Efeito da concentração da quercetina.....	56
3.2.4. Efeito da concentração do monômero funcional.....	57
3.3. Síntese do polímero impresso molecularmente	60
3.4. Caracterização da síntese	65
3.5. Estudo do desempenho da adsorção.....	68
3.6. Estudo de seletividade dos polímeros.....	72
4. Considerações Finais.....	74
Capítulo II - Síntese e caracterização da Sílica impressa molecularmente (MIS)	
mediado por íons para extração de quercetina em fitoterápico <i>Ginkgo biloba</i>	
L.....	76
1. Introdução	77
2. Metodologia.....	78
2.3. Síntese da Sílica Impressa Molecularmente (MIS)	79
2.4. Caracterização Química e estrutural.....	80
2.5. Estudo de desempenho das sílicas impressas molecularmente	80
2.5.1. Estudo de adsorção em diferentes solventes	80
2.5.2. Estudo de seletividade.....	81
2.5.3. Estudo de dessorção da sílica impressa em SPE.....	82
2.6. Avaliação preliminar da eficiência do MIS-0,01 e NIS-0,01 em SPE	83
2.7. Avaliação do desempenho analítico do MIS-0,01 em SPE	84
3. Resultados e discussões.....	85
3.1 Caracterização química e estrutural.....	85
3.2. Estudo de desempenho das sílicas impressas molecularmente	93
3.3. Seletividade	98

3.4. Estudo de dessorção.....	99
3.5. Avaliação preliminar da eficiência do MIS-0,01 e NIS-0,01 em SPE.....	101
3.6. Avaliação do desempenho analítico da sílica impressa em SPE.....	104
4. Considerações Finais.....	113
Conclusões Gerais	115
Perspectivas Futuras	116
Referências Bibliográficas	117

Lista de abreviaturas

(ordem alfabética)

AIBN	2,2'-azobisisobutironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APTES	3-aminopropiltrietoxissilano
APTMS	3-aminopropiltrimetoxissilano
BET	Brunauer, Emmett and Teller
BJH	Barret, Joyner and Halen
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
c	Índice de heterogeneidade de Langmuir-Freundlich
$1/c$	Índice de heterogeneidade de Freundlich
C_o	Concentração inicial da solução do analito
C_s	Concentração do analito livre no equilíbrio
FC	Fator de correção
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
FTIR	Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier
FRX/EDX	Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva
IF	Fator de impressão
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K_F	Constante de Freundlich
K_{LF}	Constante de Langmuir-Freundlich
LC	Agente de ligação cruzada
LD	Limite de detecção
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	Polímero impresso molecularmente
MIS	Sílica impressa molecularmente

Mor	Morina
NIP	Polímero não impresso molecularmente
NIS	Sílica não impressa molecularmente
MF	Monômero funcional
MF-Al ³⁺	Monômero funcional modificado com íons Al ³⁺
MF-Cu ²⁺	Monômero funcional modificado com íons Cu ²⁺
MM	Molécula molde
MPTMS	Metacriloxipropiltrimetoxissilano
ORMOSILS	Sílica organicamente modificada
PDA	Detector de arranjo de diodos
PSG	Processo sol-gel
PTEOS	Feniltrietoxissilano
PTMOS	Feniltrimetoxissilano
q _m	Capacidade máxima de adsorção
Q	Capacidade de adsorção do analito no equilíbrio
Quer	Quercetina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rut	Rutina
SPE	Extração em fase sólida
TEOS	Tetraetoxissilano
TG	Termogravimetria
TMOS	Tetrametoxissilano
USP	Farmacopéia Americana

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição dos MIP e NIP sintetizados com base na proporção molar.	46
Tabela 2. Procedimento e mistura de solventes para remoção da MM do MIP-Al ³⁺ ...	48
Tabela 3. Resultados da análise de FRX/EDX dos polímeros com íons Al ³⁺	62
Tabela 4. Resultados obtidos para os teores de alumínio no MIP-Al ³⁺ após os diferentes procedimentos de lavagem utilizando a técnica de FRX/EDX.	65
Tabela 5. Porosimetria do MIP e NIP, em metanol.	67
Tabela 6. Avaliação da capacidade de adsorção de Quer pelas sínteses.	69
Tabela 7. Estudo de seletividade do MIP e NIP frente à Quer e seus análogos.	73
Tabela 8. Porosimetria das sílicas impressas e não impressas molecularmente.....	88
Tabela 9. Valores obtidos da razão Si/Al por FRX/EDX para as sílicas impressas e não impressas molecularmente antes e após remoção da MM.....	90
Tabela 10. Resultados da adsorção das sílicas impressas e não-impressas em metanol e em etanol:água.	94
Tabela 11. Parâmetros de ajuste dos modelos de Freundlich e Langmuir-Freundlich aplicados aos MIS-0,01 e NIS-0,01.	97
Tabela 12. Avaliação da seletividade do MIS-0,01 e NIS-0,01 por meio de estudo de adsorção por CLAE.	99
Tabela 13. Avaliação dessorção do MIS-0,01 em etanol:água e etanol com 200 e 400 mg de MIS-0,01.	100
Tabela 14. Avaliação da reprodutibilidade do MIS-0,01 usando etanol como solvente de dessorção reutilizando os mesmos cartuchos anteriores.	100
Tabela 15. Avaliação da adsorção/dessorção do MIS-0,01 (400 mg) com uso do etanol puro na dessorção da Quer no espectrofotômetro UV-Vis.	101
Tabela 16. Avaliação da eficiência de adsorção das curvas analíticas a partir do padrão de Quer sem e após passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01 e a dessorção com etanol.	102
Tabela 17. Avaliação da eficiência de adsorção das curvas analíticas a partir do padrão de Quer sem e após passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01.	106
Tabela 18. Resultado comparativo da amostra de <i>Ginkgo biloba</i> L. com o uso das curvas analíticas sem e após percolar pelo SPE contendo MIS-0,01.	110

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas química de seis subclasses dos flavonóides.....	10
Figura 2. Estrutura química dos ginkgoflavonóides.....	11
Figura 3. Estrutura química da rutina.....	12
Figura 4. Principais etapas envolvidas na extração em fase sólida (SPE).	14
Figura 5. Número de publicações científicas sobre MIP nas diversas áreas da ciência a partir de 1990. Fonte: Web of Science..	16
Figura 6. Esquema genérico da síntese do MIP.....	17
Figura 7. Esquema dos modos de remoção da MM do MIP.....	21
Figura 8. Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de MIP.	24
Figura 9. Estruturas químicas de alguns reagentes de ligação cruzada usados na síntese do MIP.....	25
Figura 10. Estruturas químicas dos iniciadores radicalares usados em MIP.....	26
Figura 11. Etapas do processo sol-gel e suas aplicações conforme processo de secagem.....	30
Figura 12. Reações de hidrólise do alcóxido de silício (A) de condensação aquosa (B) e condensação alcoólica (C) pelo PSG.	31
Figura 13. Número de publicações científicas sobre MIS nas diversas áreas da ciência a partir de 1997..	33
Figura 14. Sílica impressa molecularmente não covalente por PSG.....	34
Figura 15. Preparação da sílica impressa molecularmente para Quer por PSG.	35
Figura 16. Estrutura do complexo (Quer-Al ³⁺).....	39
Figura 17. Ampola de vidro usada na síntese do MIP.	47
Figura 18. Registros dos espectros no FTIR..	52
Figura 19. Espectros UV-Vis em metanol (A), Acetonitrila (B), Acetonitrila : DMSO (C) e Acetona (D).	53
Figura 20. Espectros UV-Vis em metanol: Quer-MF (A), Quer-MF-Al ³⁺ (B), Quer-MF-Cu ²⁺ (C).	55
Figura 21. Espectro de absorção UV-Vis da mistura de Quer e o MF com a concentração fixa de MF em diferentes concentrações de Quer em mmol. (A) Quer: MF (B) Quer : MF-Al ³⁺ e (C) Quer : MF-Cu ²⁺	57

Figura 22. Espectro de absorção UV-Vis da interação Quer e MF-Al ³⁺ nas proporções (1:4) (A), (1:8) (B) e (1:12) (C) nos tempos de interação.....	58
Figura 23. Estudo de interação Quer e MA-Al ³⁺ em meio metanólico em três diferentes proporções (1:4), (1:8) e (1:12).....	59
Figura 24. Fotografias dos polímeros MIP (A) e MIP-Al ³⁺ (B).....	60
Figura 25. Espectros UV-Vis obtidos após remoção das MM do MIP (A) e MIP-Al ³⁺ (B) com mistura metanol : ácido acético (9:1).	62
Figura 26. Espectro de Quer em diferentes misturas de solução tampão e metanol..	64
Figura 27. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e NIP (B) com aumento de 1.000 vezes e MIP (C) e NIP (D) com aumento de 10.000 vezes	66
Figura 28. Espectro de FTIR para o MIP e NIP em pastilhas de KBr.	68
Figura 29. Espectro do subproduto gerado ao longo de 24 h de agitação entre MIP e Quer.	70
Figura 30. Isotermas de adsorção do MIP e NIP.	70
Figura 31. Foto do sistema utilizado para as análises com os cartuchos de SPE contendo sílica impressa (A) e bomba peristáltica (B).....	82
Figura 32. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIS e NIS com aumento de 100 vezes (A) e (B) e 10.000 vezes (C) e (D).....	85
Figura 33. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIS-0,01 e NIS-0,01 com aumento de 500 vezes (E) e (F) e 10.000 vezes (G) e (H).....	86
Figura 34. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIS-0,1 e NIS-01 com aumento de 100 (I) e (J) e 10.000 vezes (L) e (M).	87
Figura 35. Espectro de FTIR para das sílicas impressas e não impressas molecularmente em pastilhas de KBr.	89
Figura 36. Representação dos sítios ácidos de Brønsted e do ácido de Lewis. ⁶⁷	91
Figura 37. Proposta da reação de hidrólise e policondensação entre APTMS/Quer/TEOS em solução aquosa de Al ³⁺	92
Figura 38. Isoterma de adsorção do MIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25°C.....	94
Figura 39. Isoterma de adsorção do NIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25°C.	95
Figura 40. Isoterma de adsorção do MIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25°C ajustadas aos modelos Freundlich (A) e Langmuir-Freundlich (B).....	96
Figura 41. Isoterma de adsorção do NIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25 °C ajustadas aos modelos (A) Freundlich e (B) Langmuir-Freundlich.....	97

Figura 42. Avaliação da eficiência de dessorção (%) com o volume do solvente etanol (mL) em MIS-0,01 (400 mg).	101
Figura 43. Curva analítica da solução padrão de Quer sem passar pelo cartucho (Curva A1) e após extração do cartucho de SPE com MIS-0,01 (Curva B1).	103
Figura 44. Cromatogramas obtidos após extração de <i>Ginkgo biloba</i> L. de 40 mg em cartuchos de NIS-0,01 (–) e MIS-0,01 (–) utilizando 2 mL de etanol na etapa de dessorção.....	104
Figura 45. Cromatogramas com soluções padrão de Quer na obtenção da curva analítica sem (A) e após (B) passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01.....	105
Figura 46. Curva analítica do padrão de Quer sem (Curva A2) e após (Curva B2) passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01.....	107
Figura 47. Cromatogramas de CLAE de <i>Ginkgo Biloba</i> L. de 40 mg (–) e 80 mg (–) sem passar pelo cartucho com MIS-0,01.	108
Figura 48. Cromatogramas de CLAE de <i>Ginkgo Biloba</i> L. de 40 mg sem (–) e após (–) passar pelo cartucho com MIS-0,01.....	109
Figura 49. Cromatogramas de CLAE de <i>Ginkgo Biloba</i> L. de 80 mg sem (–) e após (–) passar pelo cartucho com MIS-0,01.....	109
Figura 50. Gráfico produzido na análise termogravimétrica da amostra do MIS-0,01 sem reuso.....	111
Figura 51. Gráfico produzido na análise termogravimétrica da amostra do MIS-0,01 após o reuso do cartucho por 5 vezes.....	112

Introdução & objetivos

Introdução

Durante séculos, o homem faz uso de plantas medicinais na prevenção e no tratamento de doenças. Entretanto, além dos efeitos benéficos, as doses excessivas e a falta de conhecimento das propriedades farmacológicas podem levar a sérios riscos de saúde.¹ Com o uso frequente das plantas pela população para fins terapêuticos, surge o interesse em estudar o isolamento, a extração, a estrutura química e a biossíntese dos princípios ativos provenientes de plantas. Atualmente, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de se comprovar os efeitos benéficos das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos na saúde do ser humano.

Uma das classes de substâncias bioativas bastante exploradas em função da sua atividade antioxidante é a dos flavonóides por inibir os radicais livres e promover melhorias a nível celular, minimizando o stress oxidativo e prevenindo o aparecimento de doenças.²

Um dos fitoterápicos que se destaca com estas potencialidades é o extrato das folhas de *Ginkgo biloba* L. A Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC – ANVISA) nº 89/2004 recomenda que o extrato padronizado de *Ginkgo Biloba* L. deve conter na sua composição 24% de ginkgoflavonóides (quercetina, Kaempferol, Isoarmnetina) e 6% de terpenolactonas (bilobalide, Ginkgolide A, B, C, E).³ Contudo, apesar dessa discriminação por parte da ANVISA os métodos^{4,5} são baseados na quantificação total dos princípios ativos, sendo de extrema importância o desenvolvimento de métodos que possibilitem uma determinação mais específica dos compostos, já que a atividade antioxidante está diretamente associada a sua estrutura molecular.

Dentre todos os flavonóides presentes na amostra de *Ginkgo biloba* L., um dos que se destaca é quercetina, por ser o flavonóide mais bioativo da subclasse, o flavonol.² No entanto, devido à sua similaridade estrutural com os outros flavonóides presentes, tem sido um desafio analítico desenvolver estratégias de preparo de amostras que permitam a separação e detecção dessa molécula. Portanto, alternativas como método de extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido, microextração em fase sólida e entre outras, tem sido bastante exploradas como

etapa de preparo da amostra antes da análise cromatográfica. A etapa de preparo da amostra normalmente é empregada em matrizes complexas ou mesmo com baixas concentrações do analito de interesse, visando na etapa de extração a eliminação de espécies interferentes e auxiliando na técnica de separação.⁶

Estas considerações mostram a necessidade de materiais seletivos que auxiliem na separação desses flavonóides. Portanto, uma das alternativas promissoras tem sido o uso de polímeros impressos como sorvente para aplicação em extração em fase sólida (SPE) do analito de interesse de matrizes complexas. Esses polímeros se destacam como ótimo extrator por formar cavidades tridimensionais específicas ao redor de uma molécula molde, permitindo assim, detecção mais seletiva devido ao reconhecimento molecular.

Nesse sentido, essa tese propõe uma nova abordagem de síntese do polímero impresso, explorando as interações específicas com íons metálicos por dois processos distintos: (i) síntese orgânica e (ii) síntese do processo sol gel. Almeja-se com este estudo produzir um polímero altamente seletivo para extração de quercetina em amostras fitoterápicas.

A presente tese foi dividida de forma a abordar inicialmente uma revisão geral da literatura, seguida de dois capítulos que descrevem as duas estratégias de síntese, seguida das conclusões gerais, perspectivas futuras e referências bibliográficas utilizadas. A revisão da literatura refere-se aos pontos mais relevantes sobre os fitoterápicos com destaque para a classe dos flavonóides, especificamente para quercetina, bem como aos conceitos de polímero impresso molecularmente e suas diferentes possibilidades de síntese.

No primeiro capítulo, intitulado Síntese e caracterização de polímero impresso molecularmente (MIP) mediados por íons para extração de quercetina, é abordada a síntese do MIP para quercetina baseado em acrilato, na presença do dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) como agente reticulante e ácido metacrílico modificado com íons Al^{3+} e Cu^{2+} como monômero funcional. Este capítulo aborda os estudos de eficiência de adsorção, seletividade e a reprodutibilidade do MIP.

No segundo capítulo, intitulado Síntese e caracterização da sílica impressa molecularmente (MIS) mediado por íons para extração de quercetina em fitoterápico

Ginkgo Biloba L., é abordada a síntese do MIS para quercetina baseado no processo sol-gel, em presença dos precursores tetraetoxissilano (TEOS) como agente reticulante e do 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) como monômero funcional mediados por íons Al^{3+} . Este estudo visa avaliar a eficiência de adsorção, seletividade, reprodutibilidade do MIS em SPE e a quantificação da quercetina em fitoterápico *Ginkgo Biloba L.*

Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar um polímero impresso mediado com íons metálicos para extração seletiva de quercetina em amostras fitoterápicas.

Objetivos específicos

- Sintetizar um polímero impresso com íons metálico seletivo para o flavonóide quercetina.
- Realizar a caracterização química e estrutural dos materiais sintetizados.
- Otimizar um procedimento de separação e quantificação de quercetina utilizando polímero impresso como extrator em fase sólida (SPE).
- Avaliar a seletividade, reprodutibilidade e eficiência de adsorção do polímero impresso e a sensibilidade do método proposto.
- Avaliar o potencial de aplicação do SPE contendo polímero impresso em amostra fitoterápica de extrato de *Ginkgo biloba* L.

Revisão da literatura

1. Fitoterápicos

A melhoria da qualidade de vida associada ao aumento da expectativa de vida do ser humano tem sido considerada um dos principais objetivos da ciência moderna. A capacidade de prevenir doenças, ao invés de curá-las, abriu novos caminhos para a medicina e ciências farmacêuticas, principalmente para a fitoterapia, a qual estuda as plantas como medicamentos. O primeiro manuscrito conhecido sobre essa prática é o papiro de Ebers, datado de cerca de 1550 a.C, que contém a compilação de textos médicos relatando 700 fórmulas de remédios feitos à base de plantas.¹ A contribuição dos gregos Hipócrates e Dioscórides com suas notáveis obras - o *Corpus Hippocraticum* e *De Materia Medica* – consagrou a terapia com os vegetais e minerais para uso medicinal.⁷ Com isto, iniciou-se uma das mais importantes áreas da farmácia e medicina, a farmacognosia, ciência que estuda o isolamento, a extração, a estrutura química e a biossíntese dos princípios ativos das plantas. Desde então, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de se comprovar os efeitos benéficos das plantas na saúde do ser humano.

O uso da fitoterapia como medicina popular no Brasil tem sua origem na cultura indígena associada às contribuições dos escravos e imigrantes, como por exemplo, o uso do guaraná e jaborandi.⁸ Com a abundante flora brasileira providenciando uma diversidade em recursos medicinais, a substituição dos medicamentos industrializados por naturais se torna então evidente. Isso ainda está associado com a facilidade de plantio, comercialização e indicação de uso dessas plantas, cujos experimentos tiveram início pelos antepassados que passaram as informações por décadas de geração. Entretanto, além de seus efeitos benéficos, doses excessivas e a falta de conhecimento das propriedades farmacológicas de certas substâncias têm levado a sério riscos à saúde.⁸ Desta forma, estudos específicos acerca da toxicidade das substâncias ativas presentes nas plantas devem ser cuidadosamente realizados antes de serem consumidas. Além disso, um eficiente controle de qualidade na comercialização dessas plantas deve ser considerado, uma vez que feiras livres e comércios locais não possuem qualquer vigilância sobre a venda e indicação desses produtos. O comércio de fitoterápicos rende mundialmente cerca de 20 bilhões de dólares, com uma irrisória participação do Brasil, mesmo possuindo uma extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente um terço da flora mundial.⁹ Isso pode

estar associado às limitações em investimento na produção de fitoterápicos, bem como em um adequado controle de qualidade para posterior inserção no mercado interno. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) possui normas reguladoras para o registro de fitoterápicos, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14, de 31 de março de 2010,¹⁰ que exige a reprodutibilidade dos fitoterápicos fabricados, cujos lotes devem ser produzidos com a mesma quantidade de molécula denominada de marcador (substância bioativa) resultando em maior confiabilidade e segurança para o consumidor. Recentemente, a ANVISA publicou a primeira norma que regula as Boas Práticas de Fabricação (BPF) dos produtos fitoterápicos tradicionais (RDC nº 13, de 14 de março de 2013).¹¹ Essa resolução define procedimentos a serem adotados pelo fabricante para produção dos fitoterápicos.

Uma lista de produtos avaliados tem sido publicada e atualizada pela ANVISA.³ Essa lista contém os principais e mais conhecidos fitoterápicos, como por exemplo, o extrato de maracujá e o *Ginkgo biloba*. Já existe cerca de 512 medicamentos fitoterápicos registrados, o que não abrange 1/10 das espécies popularmente consumidas no Brasil. Desta forma, muitos estudos ainda devem ser feitos para uma adequada avaliação das ervas populares como fitoterápicos de ação benéfica para o homem. Isto resulta em uma necessidade eminente de pesquisa nessa área.

Uma das classes de fitoterápicos amplamente estudadas para prevenção de doenças tem sido os que contêm uma elevada quantidade de substâncias com ação antioxidante.¹² Essas substâncias permitem inibir o efeito da oxidação a nível celular, através dos radicais livres e evitar a formação de novos compostos reativos,¹³ o que está diretamente associada à prevenção do stress oxidativo celular. O excesso de radicais livres pode causar efeitos letais e irreversíveis às células, por meio de rompimento das funções celulares de proteínas, lipídios, DNA e enzimas¹² ou, ainda, por mutações e degradações dos tecidos celulares.¹⁴ Estes danos celulares estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de um grande número de doenças crônicas, incluindo as cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, etc.¹⁵

Os radicais livres são geralmente produzidos por fontes endogênicas (intracelulares), sendo a respiração aeróbica a principal, e exogênicas (externas à célula) como óxido nítrico fornecido principalmente pelo consumo do cigarro.¹⁶

Espécies reativas de oxigênio podem ser facilmente formadas por meio do desemparelhamento de um elétron, gerando radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), os radicais peroxil (ROO^\cdot), alcoxyl (RO^\cdot), hidroxil (HO^\cdot) e o óxido nítrico (NO^\cdot). O superóxido participa ainda da reação com o óxido nítrico produzindo o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante altamente instável e reativo.¹⁷ Portanto, o consumo de espécies antioxidantes não produzidas pelo homem se torna então uma fonte extra de supressores de radicais livres, promovendo melhorias a nível celular, minimizando o stress oxidativo e prevenindo o aparecimento de doenças.

Os flavonóides são polifenóis não produzidos pelo homem que apresentam elevada ação antioxidante. Esses compostos possuem em sua estrutura básica dois anéis benzênicos ligados a um fragmento de três átomos de carbono, exemplificado por $C_6-C_3-C_6$. Essa estrutura básica pode sofrer substituições e adições de grupos funcionais, resultando em alta variabilidade de estruturas moleculares (Figura 1). Isto está refletido nas 6500 espécies de flavonóides descobertos, nos quais estão incluídos cerca de 3000 flavonas e 700 isoflavonas que ocorrem naturalmente nas plantas.¹⁸ No reino vegetal, os flavonóides atuam como pigmentos das flores, inibidores de enzimas, precursores de substâncias tóxicas, protetores da exposição da radiação UV, quelantes de metais e agentes redutores.¹⁹ Também ocorrem como glicosídeos (ligados a açúcares) ou como agliconas (sem molécula de açúcar) e podem ser subdivididos em 13 classes de compostos e classificados nas subclasses: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas, flavonóies, dihidroflavonol, flavanonas, flavanol, flavandiol, antocianidina, isoflavonóides, bioflavonóide e proantocianinas.^{8,2}

As sutis diferenças estruturais entre os flavonóides refletem diretamente na sua atividade antioxidante, a qual está relacionada à sua capacidade de inibir a oxidação iniciada pela formação de radicais.²⁰ A atividade antioxidante dessas espécies é determinada pela reatividade como agente doador de elétron ou hidrogênio, resultante da captação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e quelação de metais de transição (Cu^{1+} e Fe^{2+}) que estariam livres para promoção de radicais livres na presença de H_2O_2 .²¹

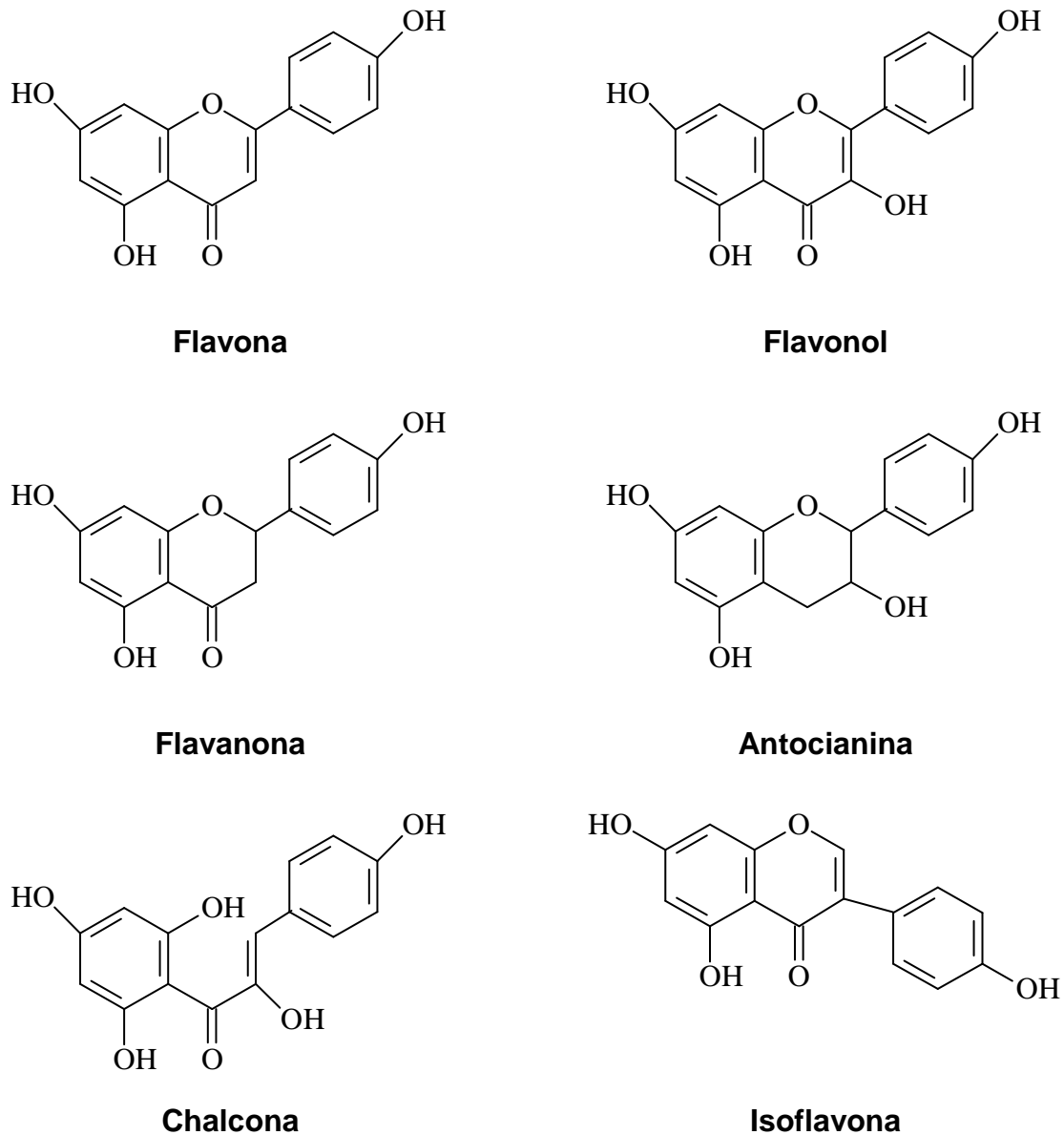


Figura 1. Estruturas químicas de seis subclasses dos flavonóides.⁸

Os flavonóides são grupos de substâncias naturais presentes em ervas, frutas, vegetais, grãos e vinhos.² Uma erva que está no topo das plantas medicinais mais comercializadas mundialmente por possuir considerável potencial antioxidante na prevenção aos danos oxidativos tem sido o fitoterápico *Ginkgo biloba* L.²²

O ginkgo biloba é uma planta nativa da China, sendo considerada a única vivente da família Ginkgoaceae. Dentre as principais partes da planta, a folha é que contém os princípios ativos de ação terapêutica, incluindo, flavonóides, alcalóides,

lipídios, esteróis, benzenos, carotenóides, fenilpropanóis, carboidratos e os terpenóides.²³

A ação medicinal do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. padronizado das folhas para uso em fitoterápico é atribuída ao sinergismo de duas classes químicas responsáveis pela atividade farmacológica: ginkgoflavonóides e terpenolactonas. A RDC nº 89/2004 da ANVISA³ preconiza que o extrato deve conter na sua composição 24% de ginkgoflavonóides ou denominado de flavonóides totais (expressos pela soma das quantidades de quercetina, kaempferol, Isorhamnetina (Figura 2) e 6% de terpenolactonas (bilobalídeos, ginkgolídeos A, B, C, J).

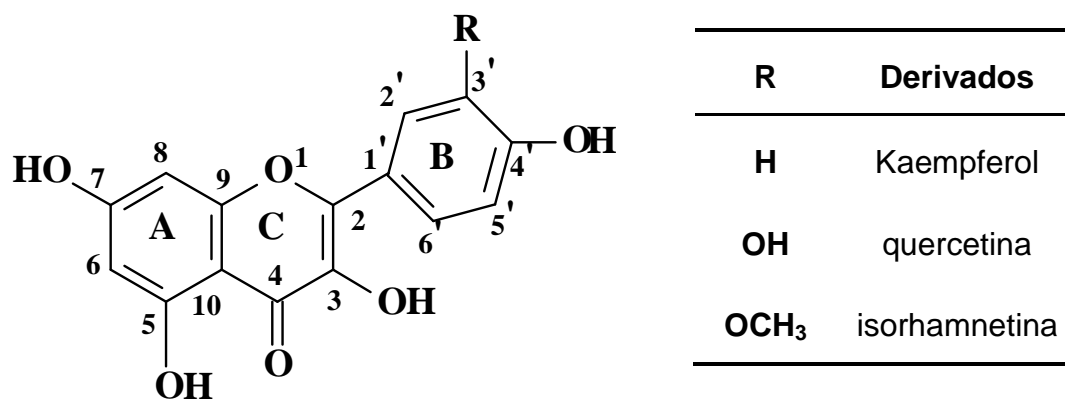


Figura 2. Estrutura química dos ginkgoflavonóides.

Dentre os ginkgoflavonóides, a quercetina tem sido considerada um dos flavonóides mais ativos do ponto de vista biológico,²⁴ entretanto, sua estrutura molecular pouco se diferencia das outras espécies de sua subclasse flavonol. Os grupos hidroxilas ligados ao anel aromático da quercetina, através da deslocalização eletrônica de todo o sistema, são os responsáveis pela atividade antioxidante, o qual resulta na formação de radicais estáveis.²⁵

Várias propriedades terapêuticas da quercetina vêm sendo constantemente estudadas, pois este flavonol está envolvido numa série de ações farmacológicas, tais como, antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica (pois atua no sistema imunológico), antiviral, cardiovascular e hepático.²⁶ A quercetina é encontrada na natureza em sua forma livre, mas frequentemente está na forma glicosilada. Entre as 180 diferentes quercetina glicosídeos existentes na natureza, a mais comum é a quercetina-3-rutinosídeo, mais conhecida como rutina (Figura 3).²⁷

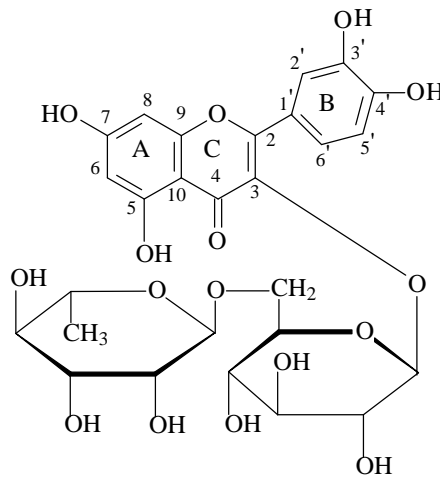


Figura 3. Estrutura química da rutina

Apesar da intensa investigação dos flavonóides, em especial a quercetina, sobre seu potencial benéfico à saúde humana, ainda são necessários o desenvolvimento de métodos seletivos, sensíveis e robustos para o preparo de amostras fitoterápicas. Pois, a maioria dos trabalhos envolve a sua quantificação total, sendo de extrema importância uma determinação mais específica das espécies individuais, já que a atividade antioxidante está diretamente associada a sua estrutura molecular.

1.1. Determinação de flavonóides em fitoterápicos

De acordo com o método descrito pela Farmacopéia Americana (USP, do inglês *United States Pharmacopeia*), a quantificação dos ginkgoflavonóides (somatória da concentração de quercetina, kaempferol, isoharmnetina) no extrato de *Ginkgo biloba* L., tem sido explorada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que preconiza inicialmente uma extração e hidrólise dos glicosídeos (rutina) em meio ácido para isolar as agliconas.⁴ Uma efetiva separação dos flavonóides deve ser considerada quando suas formas conjugadas ou não (agliconas ou glicosídeos) estão presentes na amostra, exigindo estratégias específicas de preparo de amostras e seletivas de separação e detecção.¹⁸ Amostras de plantas requerem normalmente etapas de extração, quelação, decomposição, os quais podem envolver extração em fase sólida ou líquido-líquido com solventes,^{18,28} com radiação micro-onda,²⁹ com banho ultra-som e etc.³⁰ Para análise de flavonóides, devem ser tomados cuidados com relação a processos abrasivos que podem acarretar em mudanças físico-

químicas,³¹ em rompimento de glicosídeos³² e em condições oxidativas.³⁰ A partir destas considerações, o preparo de amostras para determinação de flavonóides em plantas deve ser cuidadosamente avaliado em função do objetivo da análise.^{18,31}

Cromatografia líquida tem sido a técnica de separação mais empregada para determinação de flavonóides em diversas matrizes, tais como: vinho³³, plantas,^{18,27,34} frutas³⁵ e vegetais.^{36,18} Na etapa de quantificação, detectores, espectrofotométricos, fluorimétricos e eletroquímicos podem ser empregados após a separação cromatográfica, e atualmente, espectrômetros de massas têm sido considerados grandes aliados para a caracterização dessas espécies.¹⁸ A exploração da cromatografia líquida está associada à varredura (“fingerprint”) de diversas espécies de flavonóides de determinada classe com o objetivo de se conhecer e quantificar todas as espécies contidas na amostra.³⁷ Por outro lado, análises simultâneas de isolamento de uma subclasse de flavonóides e estudos de sua atividade antioxidante têm sido desenvolvidas a partir de alternativas mais simples, como a extração em fase sólida.^{38,39}

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é um dos métodos mais usados para separação de espécies químicas presentes em baixas concentrações em amostras de matrizes complexas ou como forma de limpeza *clean-up*.⁴⁰ A SPE é um método de separação líquido-sólido que se comporta como uma cromatografia líquida clássica que emprega uma coluna aberta contendo a fase sólida. A coluna, geralmente é um cartucho de extração que contém na base inferior e superior um fritz (disco de polietileno ~ 20 µm) para manter a fase sólida (fase estacionária) compacta dentro do cartucho.⁴¹ A Figura 4 mostra um exemplo típico de um cartucho de extração em fase sólida e as principais etapas do processo de extração. O emprego da SPE visa basicamente a pré-concentração dos analitos de interesse (enriquecimento), extração dos analitos da matriz ou a eliminação de interferentes do extrato *clean-up*.

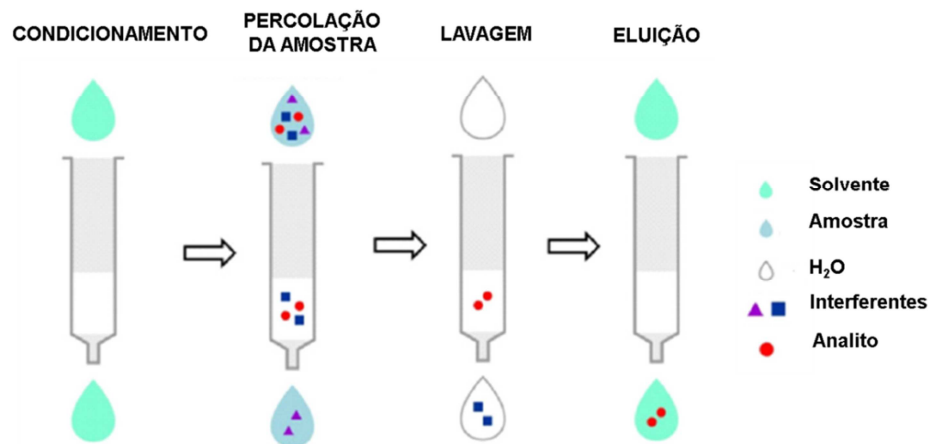


Figura 4. Principais etapas envolvidas na extração em fase sólida (SPE) (adaptado de Caldas et al.⁴²).

São disponíveis comercialmente uma grande variedade de sorventes para uso em SPE, tais como, carvão ativado, alumina, sílica gel, fase quimicamente liga (sílica C18, C8, entre outros) e trocadores iônicos orgânicos e inorgânicos. Uma das principais desvantagens do uso desses sorventes clássicos aplicados à SPE tem sido sua falta de seletividade. Portanto, nos últimos anos fases mais seletivas tem sido introduzidas, como os imunossorventes.⁴³ Este sorvente é baseado na imobilização de materiais biológicos (como por exemplo, anticorpos) em suporte sólido (sílica porosa) que é disposto em cartucho de SPE. Contudo, devido à baixa estabilidade dos materiais biológicos em diferentes condições do ambiente nativo, há uma grande dificuldade na sua obtenção além do seu elevado custo.⁴⁴ Neste sentido, os polímeros impressos molecularmente surgem como uma alternativa atraente, pois neste caso empregam-se moléculas molde como imitadores dos materiais biológicos para a impressão molecular no polímero, tornando-os altamente seletivos para a extração da molécula alvo.⁴⁵

2. Polímero impresso molecularmente

2.1. Um breve histórico sobre impressão molecular

A primeira síntese de impressão molecular surgiu por volta da década de 30 com Polyakov, que sintetizou um material baseado em sílica gel. Neste estudo, uma solução de silicato de sódio foi acidificada e após secagem foi obtida uma matriz

rígida de sílica. Uma série de investigações da estrutura porosa da sílica foi avaliada frente à presença das moléculas de benzeno, tolueno e xileno durante a produção da sílica. Após um processo de secagem de 20 a 30 dias foi observado que cada tipo de molécula testada proporcionava uma mudança na estrutura da sílica ao passar pelo processo de secagem, pois deixavam espaços vazios que eram dependentes da molécula. A adsorção de uma molécula específica pela sílica foi favorecida quando a mesma foi sintetizada contendo a molécula de benzeno, tolueno ou xileno durante o processo de polimerização. Conseqüentemente, uma maior seletividade foi alcançada quando o material sintetizado foi utilizado para a extração da molécula.⁴⁶

Em 1942, Pauling e Campbell reportaram o processo de formação de anticorpos *in vitro*. Neste estudo, o antígeno se comportava como uma molécula molde e o anticorpo era modelado ao redor gerando configurações altamente seletivas. A partir desta concepção, surgiu a ideia de sintetizar um polímero impresso molecularmente (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymers*), sintetizado ao redor de uma molécula molde, formando uma estrutura com cavidades de reconhecimento molecular após a remoção da mesma.⁴⁷

Em 1949, Dickey descreveu um procedimento experimental a base de sílica gel para a extração de quatro diferentes corantes (alaranjado de metila, alaranjado de etila, alaranjado de propila e alaranjado de butila). O procedimento da síntese utilizava silicato de sódio em presença de cada uma das moléculas moldes. Após algumas etapas de extração foi comprovado que cada um dos MIP sintetizados adsorvia uma maior quantidade do respectivo corante quando comparado com o polímero não impresso (NIP, do inglês *Non-Imprinted Polymers*), o qual não possui a molécula molde. A partir deste estudo, especificamente, vários grupos de pesquisa exploraram o método de Dickey na produção de adsorventes com cavidades específicas. Contudo, após 15 anos de pesquisa com MIP baseados em sílica, houve um declínio, pois os pesquisadores na época alegaram limitações do polímero obtido quanto à estabilidade e reprodutibilidade.⁴⁸

Em meados de 1972, dois grupos de pesquisa independentes liderados por I.M. Klotz e G. Wulff apresentaram os primeiros relatos de MIP baseados em síntese orgânica. Neste contexto, destacou-se o grupo de G. Wulff que descreveu um procedimento envolvendo uma reação de copolimerização utilizando ácido D-glicérico com divinilbenzeno com uma subsequente hidrólise do glicerato. Esta síntese foi

investigada exaustivamente durante a década de 70 e 80 pelo mesmo grupo de pesquisa, os quais observaram que o MIP apresentava reconhecimento quiral para o ácido D-glicérico.⁴⁶

Desde então, com destaque a partir da década de 90 (Figura 5), houve um crescimento exponencial no número de publicações com MIP baseado em síntese orgânica nas diversas áreas da ciência, contemplando, por exemplo: química analítica, orgânica, bioquímica, ambiental e farmacêutica.

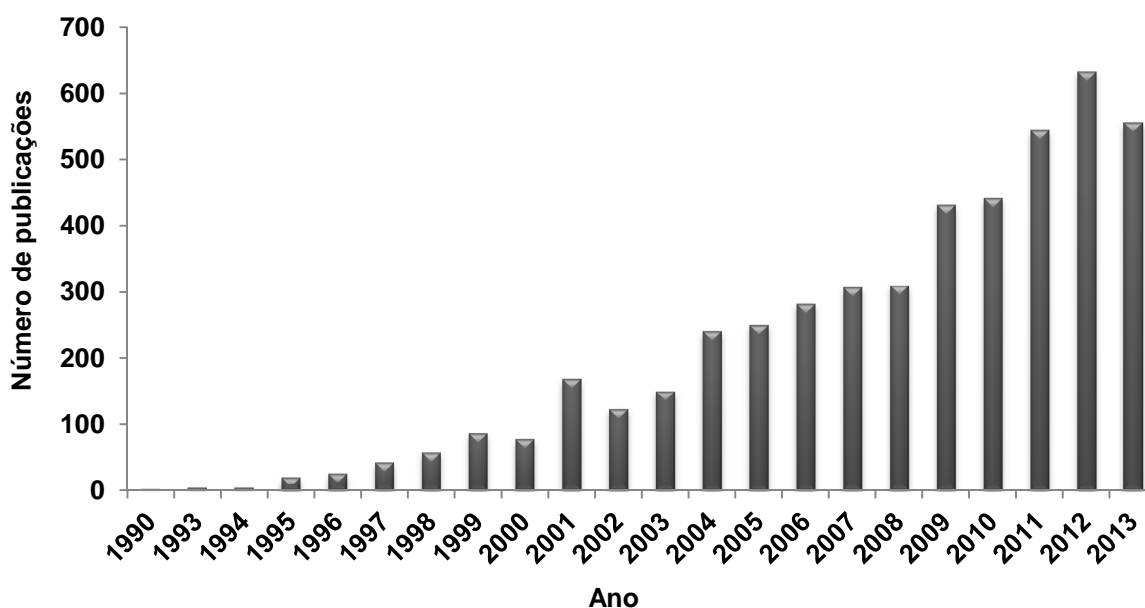


Figura 5. Número de publicações científicas sobre MIP nas diversas áreas da ciência a partir de 1990. Fonte: Web of Science. (Palavras-chaves: molecularly and imprint and polymers).

2.2. Processo geral de obtenção de polímero impresso

A maioria dos estudos reportados de impressão molecular apresenta a síntese orgânica via polimerização radicalar como a mais explorada e que ainda ocupa um lugar de destaque. A terminologia “impressão molecular” se refere à produção de sítios específicos de ligação, denominados de reconhecimento molecular, que são modelados a partir de uma molécula molde (também denominado como template).⁴⁹

O processo geral da síntese de um MIP e o seu mecanismo de atuação são mostrados na Figura 6. A síntese consiste, inicialmente, na formação de sítios específicos de ligação que são formados por meio de interações covalentes ou não-

covalentes, entre os grupos funcionais da molécula molde (MM) e dos monômeros funcionais (MF) em um solvente apropriado. A ligação entre os MF é realizada pela adição de um agente de ligação cruzada (do inglês *cross-linker*) o qual realiza a ligação de todos os monômeros, a fim de formar uma matriz polimérica e rígida em torno da MM. A polimerização se inicia na presença de um reagente iniciador radicalar na ausência de oxigênio, geralmente realizada com um fluxo de um gás inerte (N_2 ou Ar), e em seguida é induzida por temperatura ou radiação ultravioleta (UV). Por fim, o sólido polimérico é moído, peneirado e submetido a um processo de remoção da MM com um solvente de extração apropriado. Após este processo, as cavidades tridimensionais com sítios específicos de ligação agem no reconhecimento do composto com estrutura similar a MM.^{50,51}

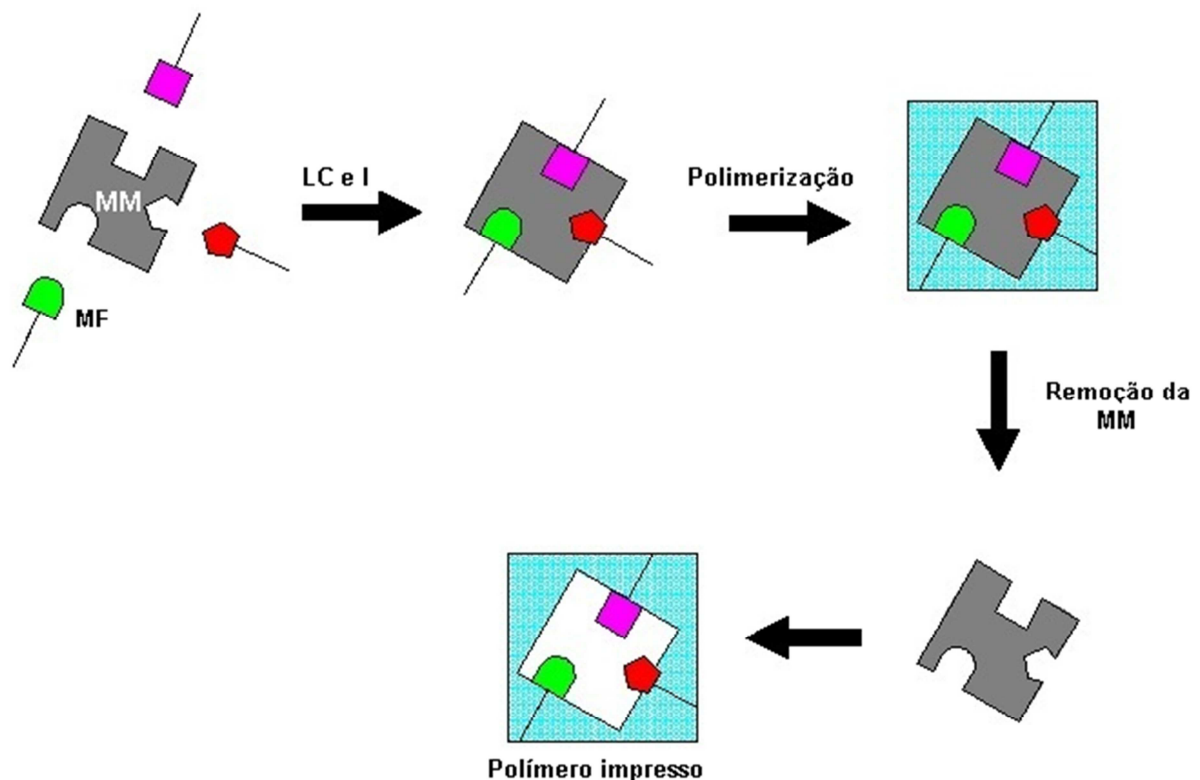


Figura 6. Esquema genérico da síntese do MIP (MM: molécula molde, MF: monômero funcional, LC: agente de ligação cruzada, I: iniciador radicalar).

A polimerização via radical livre é o método de síntese mais empregado para a conversão de um monômero a um polímero, e tem sido explorada amplamente na indústria para a produção de muitos plásticos comerciais.⁵² Este processo pode ser explorado em condição branda, temperaturas ambientes, em solução ou em bloco (do inglês *bulk*) e é bastante tolerante com relação a impurezas. Devido a essas

vantagens, este processo é o mais recomendado para a síntese do MIP. O mecanismo é constituído de três estágios distintos: (1) iniciação, (2) propagação e (3) terminação.⁴⁶ A etapa de iniciação parte do uso de iniciadores termicamente instáveis que são decompostos termicamente (por temperatura ou radiação) com a formação de centros ativos e que rapidamente o radical ativo gerado ataca a dupla ligação de um monômero (C=C) transferindo o centro ativo e iniciando a polimerização e permanece ativo durante toda a síntese. A propagação segue com a consequente transferência do centro ativo de monômero a monômero e, por fim, a terminação ocorre com a interrupção do crescimento da cadeia através do desaparecimento do centro ativo quando toda a cadeia polimérica está formada.⁵³

A síntese dos MIP deve ser realizada especificamente para cada molécula, uma vez que as cavidades são dependentes da estrutura tridimensional da molécula usada como molde. Estas cavidades são formadas por meio de ligações químicas entre o analito e o monômero funcional.⁵⁴ Logo, os tipos de interações envolvidas na impressão molecular são classificadas como ligações covalentes, ligações não-covalentes, ligações covalente e não-covalente e as ligações com metais de coordenação.

A impressão covalente foi proposta inicialmente por Wulff et al.⁵⁵ e tem como princípio básico a formação de ligações covalentes reversíveis entre o MF e a MM antes de iniciar a polimerização. Entretanto, após a polimerização, ocorre uma dificuldade em quebrar as ligações covalentes para a retirada do molde, já que as ligações são consideradas de natureza forte. Em alguns casos, devido à alta estabilidade entre as ligações formadas entre MM e MF, é necessária a realização de condições drásticas de hidrólise. Outro inconveniente é o número limitado de moléculas compatíveis com essa metodologia, sendo necessário que pertençam às classes dos alcoóis, aldeídos, cetonas, aminas ou ácidos carboxílicos.^{56,57}

A impressão não-covalente, que explora ligações não-covalentes entre o MF e a MM tem sido a mais estudada e mais aplicada desde a sua concepção.^{24,50} Sua ampla aplicação é devido à versatilidade das interações não-covalentes, tais como, ligações de hidrogênio, iônica, íon-dipolo, dipolo-dipolo.⁵⁶ Além disto, a cinética de ligação é bastante rápida e simplificada, bem como a clivagem das ligações para a retirada da molécula molde. Entretanto, algumas limitações são observadas quanto à

formação dos sítios de ligação heterogênea em função da natureza fraca das ligações não-covalentes.

Uma alternativa versátil para contornar as limitações provenientes das impressões covalente e não-covalente foi combinar as características vantajosas de ambas as impressões, denominada de impressão baseada em sacrifício espacial.⁵⁶ Esse procedimento utiliza um MF que se liga a MM por meio de ligações covalentes, mas que é facilmente retirado por clivagem hidrolítica liberando CO₂ após a polimerização. Os grupos remanescentes no sítio formado (após a hidrólise) são capazes de se religar a MM por meio de interações não-covalentes. Assim, as interações covalentes entre o MF e a MM só ocorrem na etapa de síntese, possibilitando ligações de caráter não-covalente para as cavidades de reconhecimento molecular impressas no polímero.⁴⁹

Diante dos tipos de ligações reportadas para a síntese do MIP outra estratégia tem sido a inserção de íons metálicos para aumentar a reatividade e seletividade dos sítios de reconhecimento molecular. Isto pode ser devido às propriedades do metal de coordenação em organizar os grupos funcionais e criar sítios específicos ou seletivos em função da formação de complexos. Segundo Fan e Wang,⁵⁸ as interações por meio dos metais de coordenação com a MM são mais fortes do que as ligações de hidrogênio e as forças de Van der Waals. Além disso, destaca-se que a força dessas interações/ligações são relativamente estáveis em meio contendo água e álcool e que a configuração espacial dos complexos formados são mais específicas. Contudo, algumas orientações devem ser consideradas durante a síntese do MIP em presença do íon metálico, tais como: (a) a compatibilidade com as condições da polimerização, onde os centros metálicos não podem inibir as etapas de iniciação e propagação, (b) devem possuir esfera de coordenação bem definida e (c) a interação metal-MM deve ser estável nas condições de polimerização e lábil o suficiente para permitir a remoção da MM.^{46,49}

2.2.1. Etapa de remoção da molécula molde

Embora a polimerização seja considerada a etapa crítica para obtenção de um MIP com as características desejadas em relação à morfologia, a uniformidade das

partículas e a presença dos sítios seletivos, a etapa de remoção da MM do polímero é sem dúvida a etapa essencial para formação das cavidades intactas e seletivas.⁵⁹ Porém, poucos estudos descrevem as condições e as técnicas usadas na remoção da MM sem provocar danos, rupturas ou colapso das cavidades impressas.

Mesmo que nas últimas décadas tenham sido observados avanços nas técnicas de remoção, poucas técnicas ainda são empregadas para a remoção da MM. Os métodos de remoção convencionais mais usados são a imersão dos polímeros em solventes orgânicos, solução tampão e a extração por Soxhlet com ciclos de lavagens contínuos. A remoção total da MM pode representar uma difícil etapa, mesmo após exaustivas lavagens com o solvente adequado, devido a dificuldade do solvente atingir regiões altamente reticuladas, ou seja, retirar a MM residual ocluída nas cavidades e provocar a quebra das interações entre a MM e o polímero.⁶⁰

A Figura 7 mostra um esquema com cinco modos de remoção da MM após a síntese do polímero impresso. A remoção adequada da molécula molde, Figura 7 (A), requer a utilização de um solvente apropriado para acessar as cavidades do MIP de forma adequada, o que garante um maior desempenho ao polímero impresso na etapa de extração.⁵⁹

A Figura 7 (B) exhibe um MIP com a remoção incompleta da MM. Um estudo relatado por Levi and Srebnik⁶¹ exemplifica este fato utilizando um modelo de simulação de um MIP impresso com uma proteína, que consiste de uma biomacromolécula. Pelos dados gerados pode ser observado que após a etapa de remoção da proteína quase 25% da MM ainda permanecia ocluída no polímero, comprometendo a etapa de remoção do analito de interesse em etapas posteriores. Vale ressaltar que a seletividade do MIP também é influenciada pelo tamanho da MM. Nesse sentido, a síntese do MIP com biomacromoléculas ainda é um desafio, por apresentar características como: estruturas conformacionais flexíveis, múltiplas ligações fracas disponíveis na superfície e insolubilidade em meio aquoso, que dificultam a sua impressão e a remoção da mesma da cavidade do polímero.⁶²

Com relação à Figura 7 (C), diferentes tipos de ligações químicas podem estar envolvidas na interação entre MM e MIP, o que requer na etapa de remoção da MM o uso de condições drásticas, como por exemplo, utilizar solução de pH em extremos, ácidos ou básicos, ou o uso de temperatura elevada por um longo período de tempo.

Contudo, a utilização dessas condições pode ocasionar rupturas, ou seja, distorções da cavidade do MIP, gerando a estrutura representada na Figura 7 (C) e resultando em um polímero com baixa eficiência na extração.⁶³

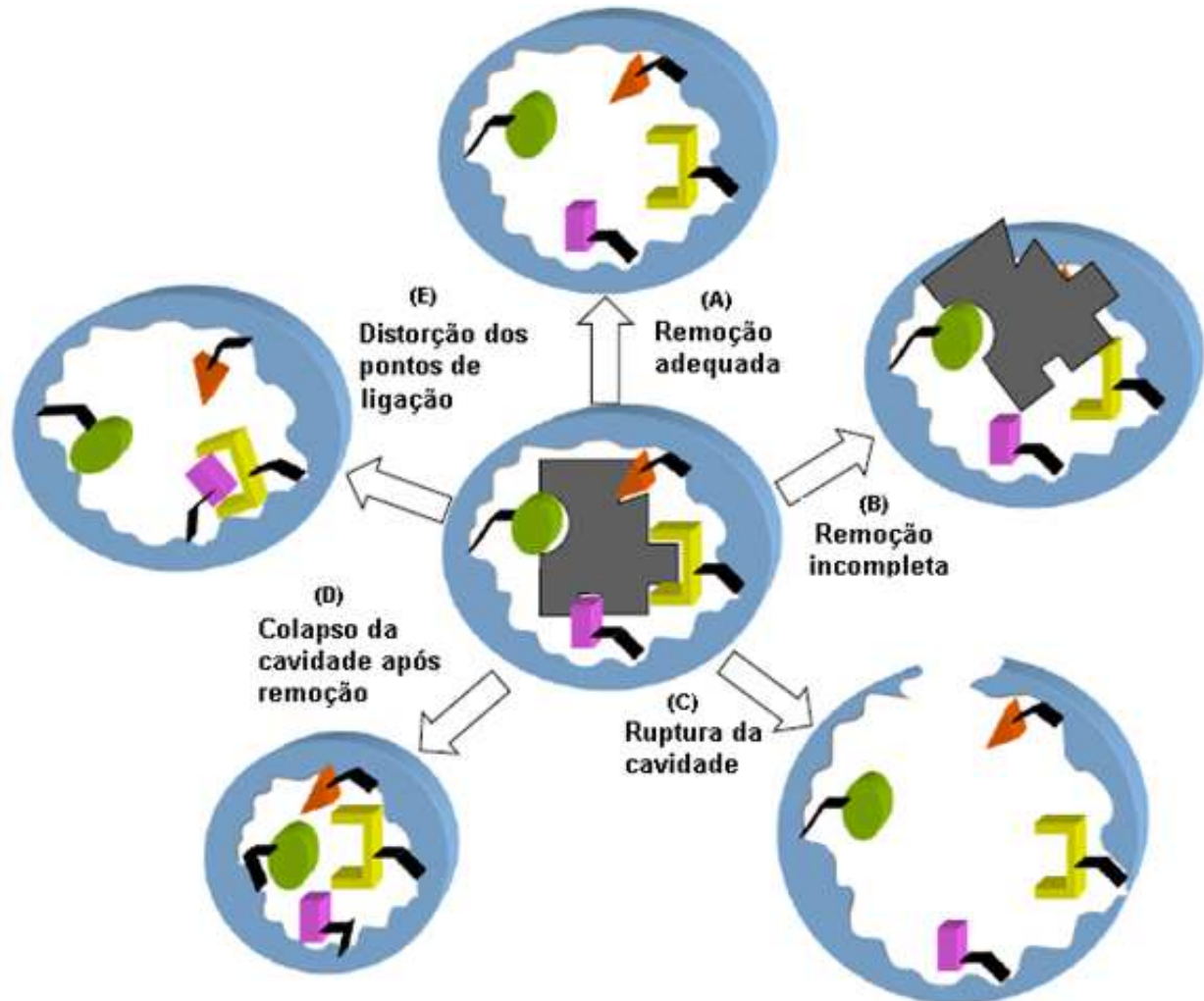


Figura 7. Esquema dos modos de remoção da MM do MIP (adaptado de Lorenzo et al.⁵⁹).

Outro fato que pode ser observado na remoção da MM é quando as moléculas do solvente penetram dentro da rede polimérica e ocupam posições entre as cadeias, podendo provocar o colapso da cavidade, Figura 7 (D). Além disso, as ligações fracas e secundárias intermoleculares envolvidas podem enfraquecer e causar um inchaço no polímero durante a extração e secagem, e provocar distorção dos pontos de ligação, Figura 7 (E), ou nas forças das interações envolvidas entre a MM e o polímero. Apesar dos vários problemas que podem ocorrer ao MIP após a remoção

da MM de forma inadequada, poucas investigações ainda foram divulgadas neste contexto.

Lorenzo et al.⁵⁹ destacou três estratégias de remoção da MM: (i) extração com solventes utilizando Soxhlet ou por imersão; (ii) extração assistida fisicamente por ultra-som, micro-ondas ou líquido pressurizado; (iii) extração com solvente supercrítico (por exemplo, CO₂) ou subcrítico. Vale salientar que cada técnica apresenta suas vantagens e limitações que devem ser levadas em consideração para a escolha, cujo objetivo é remover a MM de forma adequada, disponibilizar as cavidades na etapa de remoção e aumentar o desempenho do MIP.

2.3. Processos de síntese do polímero impresso

Na literatura vários métodos de polimerização têm sido propostos para síntese do MIP, tais como: polimerização em bulk ou em massa,⁵⁴ em suspensão,⁶⁴ por precipitação,⁶⁵ por enxerto,⁶⁶ e recentemente vem sendo explorado os materiais baseado no processo sol-gel (PSG) na obtenção da sílica impressa molecularmente (MIS).⁶⁷

Considerando os procedimentos de síntese utilizados no desenvolvimento dessa tese, a seguir é apresentada uma revisão da síntese do MIP baseado em síntese orgânica e a síntese de MIS por meio do PSG.

2.3.1. Síntese orgânica do MIP

Dentre os inúmeros métodos descritos, a polimerização em bulk tem sido o processo mais estudado para a formação do MIP, por ser considerado um dos mais simples.⁵⁴ Neste processo, todos os reagentes são misturados em uma ampola selada sem presença de oxigênio. Após a polimerização realizada por termólise ou fotólise é formado um bloco de polímero. Este bloco é então moído e peneirado até a granulometria desejada.

A seletividade específica do MIP depende exclusivamente do processo de síntese e conseqüentemente das variáveis envolvidas: proporções molares entre a molécula molde e monômero funcional, tipo e quantidade de solvente, quantidade do reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar, tempo e processo de polimerização.

A síntese exige um entendimento profundo de equilíbrio químico entre os compostos envolvidos, teoria de reconhecimento molecular, termodinâmica e química de polímeros para se obter um polímero com elevado número de cavidades de reconhecimento molecular.⁶⁸ Desta forma, a otimização dos parâmetros envolvidos antes da síntese se torna o principal estudo quando são confeccionados os polímeros impressos molecularmente.

Para a confecção de polímeros molecularmente impressos com moléculas moldes há a necessidade de se conhecer profundamente todas as variáveis envolvidas e suas interdependências:⁵⁰

a) **Molécula molde (MM) ou analito:** molécula de interesse que servirá como molde no polímero. Sua estrutura molecular determina o tipo de monômero funcional a ser utilizado na síntese, já que as ligações químicas entre ambos é que fundamenta o reconhecimento molecular. O analito deve ser quimicamente inerte sob as condições de polimerização e estável sob condições de síntese (temperatura ou radiação UV).

b) **Solvente:** substância que dissolve a MM na preparação para a síntese e que durante a síntese reúne (agrega), em uma só fase, todas as substâncias envolvidas na polimerização. Por isto, o solvente é caracterizado como porogênico, substância responsável pela formação dos poros nos polímeros, o que é resultante da sua capacidade de agrupar a molécula molde, monômero funcional, o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar durante a polimerização. A natureza e o volume do solvente influenciam diretamente a morfologia e o volume total de poros do polímero. Solventes apolares e apróticos são os mais usados devido a melhor solubilidade com outras substâncias e a não capacidade de doarem prótons durante a síntese. O volume do solvente influencia diretamente o volume dos poros, já que é o responsável pela junção de todas as substâncias durante a síntese, sendo observado que o uso de um maior volume de solvente, assim como o emprego de solventes mais voláteis permite obter um controle maior do tamanho e da distribuição de poros. Os solventes geralmente usados são acetonitrila, tolueno, dimetilsulfóxido, metanol, clorofórmio, etc.

c) **Monômero funcional (MF)**: substâncias responsáveis pelos sítios de ligação no polímero impresso resultantes de sua interação com a MM. O monômero deve corresponder a funcionalidade da MM (ex.: doador de H com receptor de H) e as suas interações devem ser fortes o suficiente para realizar a formação dos sítios de ligação, mas também, fracas o suficiente para permitir a retirada da MM e formar as cavidades de reconhecimento. Geralmente a quantidade de MF deve estar em excesso com relação à MM (4:1) para assegurar que todo o molde permaneça envolto por monômeros funcionais. Misturas de monômeros funcionais também podem ser usados para prover uma cavidade mais específica no polímero, entretanto, podem ocorrer copolimerização e complexação do molde durante a síntese.⁵² Desta forma, a escolha de um MF ou de uma mistura de monômeros deve ser cuidadosa. A Figura 8 apresenta os principais tipos de MF ácidos, básicos e neutros utilizados na síntese de MIP.

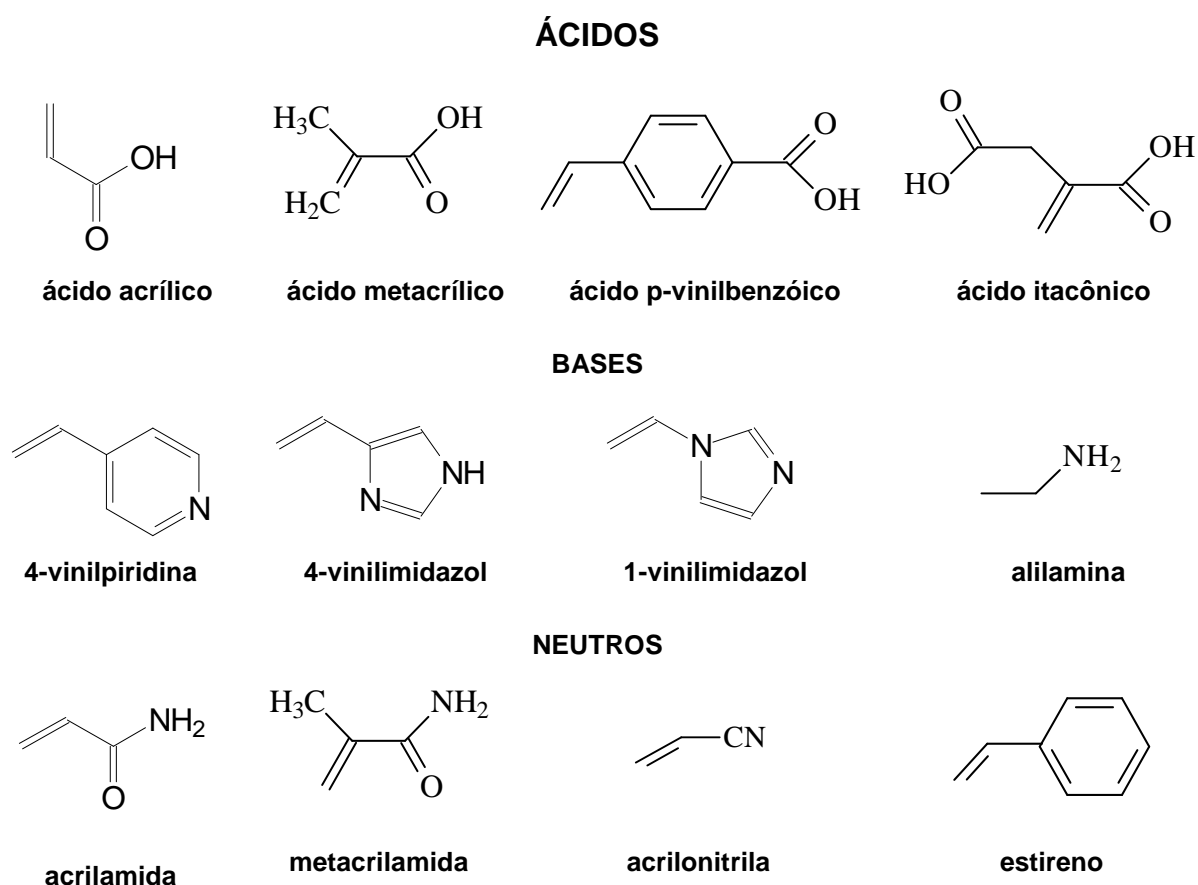
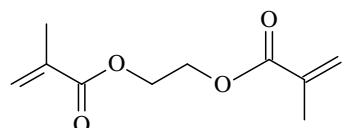


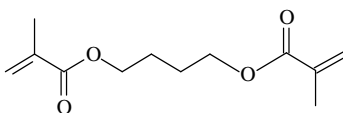
Figura 8. Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de MIP.⁶⁹

d) **Agente de ligação cruzada (LC)**: reagente que realiza a união de todos os MF para a formação do arranjo tridimensional do polímero. Um dos reagentes mais

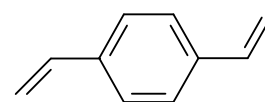
utilizados é o EGDMA (etilenoglicol dimetacrilato), que desempenha diversas funções: controla a morfologia da matriz polimérica (macro porosa, gel, micro-gel), estabiliza as ligações impressas (ligações molde-monômero funcional) e gera a estabilidade mecânica ao polímero. Este reagente geralmente está em excesso (cerca de 80%),⁷⁰ e seu caráter funcional deve corresponder ao do MF, principalmente quando são realizadas mistura de monômeros.⁴⁴ A Figura 9 ilustra as estruturas moleculares dos principais reagentes de ligação cruzada usados na síntese de MIP.



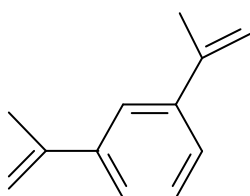
Etilenoglicol dimetacrilato



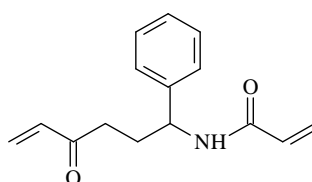
Tetrametileno dimetacrilato



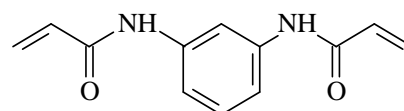
p-divinilbenzeno



1,3 diisoprenil benzeno



N,O,bisacrilóil-L-fenilalaninol



2,6 bisacrilóilamidopiridina

Figura 9. Estruturas químicas de alguns reagentes de ligação cruzada usados na síntese do MIP.⁶⁹

d) **Iniciador radicalar:** reagente químico fornecedor de radicais livres durante a polimerização. Ele gera o primeiro radical por meio de sua decomposição por termólise ou fotólise, e inicia a polimerização pela primeira molécula do agente de ligação cruzada até a última molécula, obtendo o fechamento da cadeia com todos os monômeros e formando um polímero. Iniciadores como o 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) pode ser decomposto tanto por temperatura quanto por fotólise.⁴⁶ A estabilidade da temperatura é muito importante para se obter um polímero bem estruturado, no caso de haver modificações bruscas na temperatura, serão formados radicais de forma descontrolada, bem como os polímeros podem apresentar menores quantidades de cavidades impressas. As estruturas químicas dos principais iniciadores radicalares são demonstradas na Figura 10.

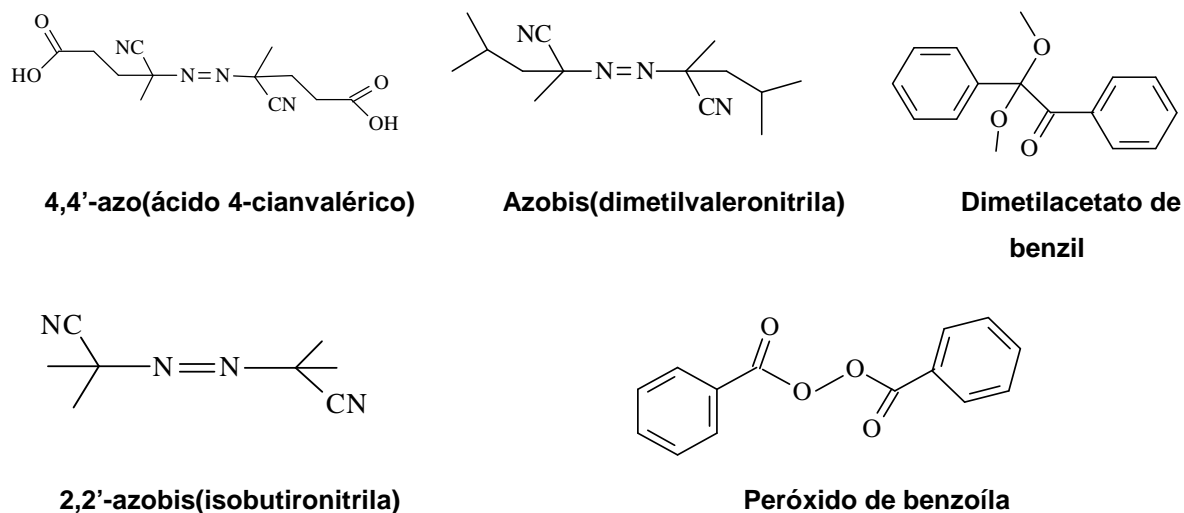


Figura 10. Estruturas químicas dos iniciadores radiculares usados na síntese do MIP.^{69,71}

A caracterização dos polímeros após a síntese é a etapa mais difícil de ser avaliada devido aos processos de impressão ocorrer em nível molecular. Diversos métodos são empregados para a caracterização química do MIP. A micro-análise elementar da porcentagem em massa de carbono, hidrogênio, nitrogênio, cloreto, etc., é um método usado, permitindo a verificação de copolímeros, mas não permite a quantificação de traços de moléculas molde. O uso da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared*) também pode ser aplicada para verificação de ligações químicas e mudanças funcionais do MIP. Para a caracterização morfológica, onde se verifica tamanho e a quantidade dos poros, distribuição na área superficial, etc. podem ser explorados métodos como o de porosimetria com sorção de nitrogênio, experimentos com solventes e microscopia eletrônica por varredura (MEV).⁵² A caracterização do comportamento de reconhecimento molecular tem sido a mais difícil de realizar, mas análises por titulação com Ressonância Magnética Nuclear demonstraram a ligação dos monômeros funcionais em volta da molécula molde.⁷² Estudos envolvendo absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis) e diferenças de temperatura na eluição por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também podem ser explorados.⁷³

A síntese dos MIP requer então um elevado controle dos parâmetros envolvidos. A falta de conhecimento da interdependência destes parâmetros pode gerar polímeros com altas variações na impressão molecular com poucos sítios de

ligação específicos. A vasta literatura sobre MIP disponível atualmente, descreve diversos procedimentos envolvidos antes e depois da síntese, relatando teorias e fundamentos potencialmente úteis quando estão sendo almejados novos polímeros.^{24,45,52-54,57.}

2.3.1.1. MIP para quercetina aplicados a SPE

Alguns trabalhos na literatura têm relatado a eficiência do uso de polímeros impressos para quercetina com melhoria nas etapas de *clean-up* de amostras complexas e como extrator em fase sólida previamente a separação cromatográfica e detecção UV.^{74,75} Entretanto, a grande maioria dos grupos de pesquisa focam o procedimento de preparo e a caracterização dos materiais de reconhecimento molecular, sendo que apenas recentemente tem sido explorado sua aplicação como SPE.^{76,77-79}

Song et al.,⁷⁸ prepararam um MIP usando a quercetina (MM), acrilamida (MF), EGDMA (LC) em quatro diferentes tipos de solventes porogênicos: 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, acetona e acetonitrila. Os resultados indicaram que o MIP preparado com tetrahidrofurano foi o que apresentou maior adsorção em relação aos outros polímeros sintetizados. Segundo os autores, o material apresentou seletividade satisfatória frente aos análogos, rutina e catecol, demonstrando seu potencial para a aplicação e pré-concentração de amostra de extrato de *cacumen platycladi* por CLAE. Contudo, comparando os MIP sintetizados com polímero controle (NIP) a partir do fator de impressão (IF, do inglês *Imprinting Factor*), definido como a razão da adsorção do MIP em relação ao NIP, foram obtidos valores próximos de 1, mostrando que o efeito de reconhecimento molecular não foi efetivo no material sintetizado. Além disso, os autores não apresentam resultados da reutilização do cartucho SPE produzido.

Molinelli et al.⁷⁵ descreveram a síntese do MIP com quercetina usando 4-vinilpiridina (MF), EGDMA (LC) e solvente porogênico acetona. As partículas obtidas apresentaram tamanho menor que 25 µm e o polímero foi aplicado na extração de quercetina em uma amostra de vinho tinto. Os autores obtiveram excelente seletividade frente aos análogos rutina, morina e catequina e um eficiente *clean up* e pré-concentração da amostra de vinho tinto analisada. Além disso, segundo os

autores, foi obtida uma ótima recuperação de 98,2 %. Contudo, o cálculo realizado pelos autores considera apenas a recuperação da quercetina que ficou adsorvida no MIP após o processo de dessorção. Caso todo o processo tivesse sido considerado pelos autores, a recuperação real obtida seria apenas de 53,1 %. Cabe destacar ainda que não foi demonstrado que o cartucho pode ser reutilizado.

López et al.⁷⁹ sintetizaram um MIP de quercetina (MM) utilizando 4-vinylpiridina (MF), etilenoglicol dimetacrilato (LC) em acetona/acetonitrila. Diferentes composições foram avaliadas, sendo selecionada a proporção (1:4:20) de (Quer : MF : LC). O material foi aplicado em amostras de chás vermelho, preto, branco e verde para *clean up* e pré-concentração de catequinas. Os resultados mostraram que a capacidade de adsorção do MIP foi muito maior para catequina e epicatequina em comparação com quercetina, que pode ser explicado pela similaridade das estruturas. Por outro lado, a quercetina apresentou uma especificidade superior aos outros compostos (catequina, epicatequina, epigallocatequina gallate, tocoferol). As recuperações obtidas variaram entre 60% e 100% para os diferentes chás naturais, enquanto que para o NIP foram obtidas recuperações abaixo de 50%. Assim como no trabalho citado anteriormente, não foi destacada pelos autores se a reutilização do MIP em SPE é possível.

Nas últimas décadas, consideráveis esforços vêm sendo realizados por diversos grupos de pesquisa na obtenção de adsorventes orgânicos seletivos (MIP) baseados em monômeros acrílicos. Mahony et al.,⁸⁰ ressaltam algumas vantagens do polímero impresso, como por exemplo, facilidade da síntese, baixo custo dos reagentes usados, alta seletividade e robustez. Apesar destas vantagens, essa estratégia ainda possui algumas restrições, como por exemplo, a dificuldade de remover toda a MM de forma adequada,⁵⁹ problemas na síntese do MIP em meio aquoso devido a solubilidade limitada de alguns agentes de ligação cruzada,⁸¹ impressão de moléculas grandes como molécula molde,⁶¹ existência de sítios de ligação não específicos devido ao excesso de MF adicionado na síntese⁴⁹ e a necessidade de melhorar a reprodutibilidade do MIP como SPE.⁵⁴ Portanto, neste mesmo segmento surge o interesse por novos materiais adsorventes e uma elegante alternativa foi a combinação de compostos inorgânicos e orgânicos, com destaque para sílica organicamente modificada (ORMOSILS, do inglês *organically modified silicates*),^{82,83} baseado no processo sol-gel (PSG).

2.3.2 Síntese do MIS baseado no PSG

Inicialmente, o PSG foi reportado por Ebelman em 1845, sendo a síntese baseada numa reação de hidrólise lenta de éster e ácido silícico que formou um material transparente de alcóxido metálico. Com a descoberta desta tecnologia, quase um século depois (1930), surgiu o interesse por Geffcen e Berger da companhia vidreira alemã Schott em produzir vidros em escala industrial. Os vidros produzidos sob reações controladas de hidrólise e condensação a baixas temperaturas, apresentaram elevada pureza, homogeneidade e permitia a incorporação de camadas delgadas de óxidos metálicos atribuindo aos vidros propriedades ópticas.⁸⁴ A partir desta época o PSG vem sendo investigado, aperfeiçoado e aplicado por vários grupos de pesquisa, para as diversas áreas tecnológicas, como por exemplo: óptica (coletores solares, laser, amplificadores), eletrônica (capacitores, sensores, filmes supercondutores), biomédica (implantes, tecidos vivos) e química (catalisadores, membranas, filmes, fibras, cerâmicas e fases sólidas).^{84,85}

De uma maneira geral, o PSG consiste na formação de uma rede tridimensional inorgânica por meio de reações químicas que ocorrem em solução à baixa temperatura. Experimentalmente é uma rota de síntese que forma sólidos que são originados da transição do sistema *sol* para um sistema *gel*. O termo *sol* é definido como uma suspensão coloidal de partículas sólidas em meio líquido, enquanto que o *gel* refere-se a uma estrutura sólida, rígida, porosa e interconectada originada de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) encapsulado numa matriz líquida.⁸⁶

A Figura 11 ilustra uma série de etapas do PSG que são divididas basicamente na formação do *sol*, gelificação, envelhecimento e secagem. Devido à versatilidade do PSG, podem ser obtidos materiais com uma variedade de formas, conforme o processo de secagem, tais como: pós, filmes, fibras, cerâmicas e monolitos.⁸⁷

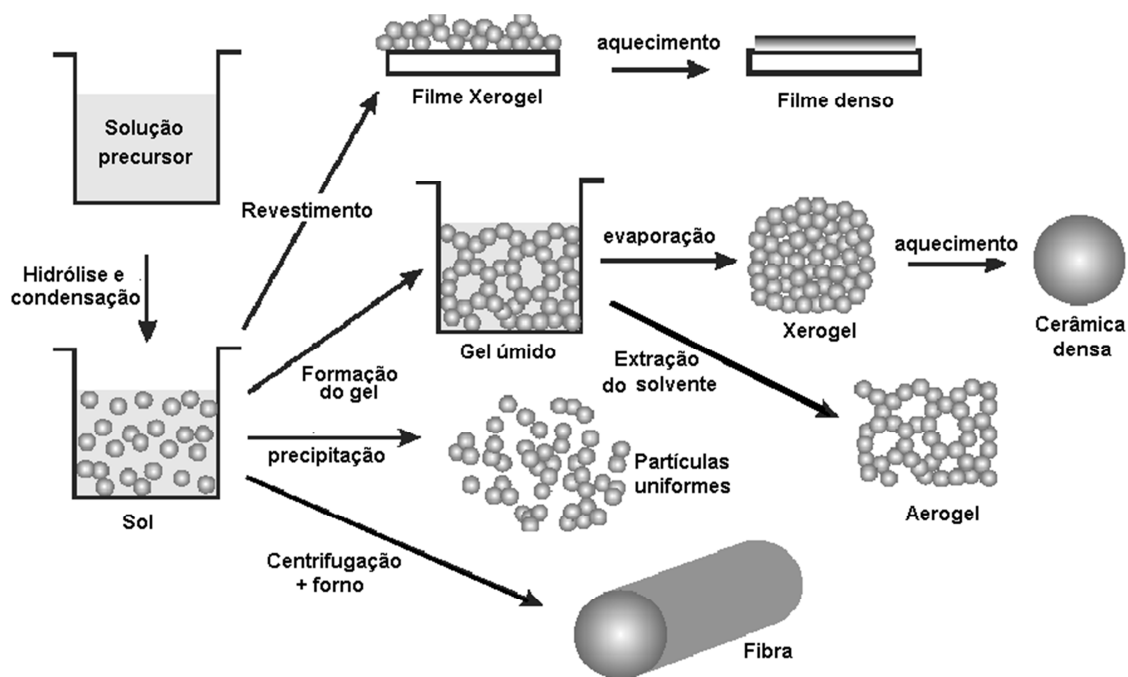


Figura 11. Etapas do processo sol-gel e suas aplicações conforme processo de secagem (adaptado de Niederberger *et al.*).⁸⁷

O estudo reportado por Kakihana⁸⁸ expõe uma subdivisão de algumas das rotas do PSG em: i) reação sol-gel não hidrolítico, ii) dispersão coloidal, iii) hidrólise e condensação de metal alcóxido⁸⁸ iv) híbrido orgânico-inorgânico.⁸⁹

O PSG é uma estratégia que altera as propriedades dos materiais e podem conferir boa estabilidade térmica e química, muitas vezes superior às propriedades originais dos componentes individuais. Portanto, considera-se o ORMOSILS altamente promissor para obtenção da sílica impressa molecularmente (MIS, do inglês *molecularly imprinted sílica*), devido principalmente a facilidade no preparo.

No geral, a reação do PSG pode ser dividida em duas etapas i) hidrólise do precursor e ii) condensação dos grupos hidrolisados.^{83,87} Os precursores inorgânicos utilizados no PSG podem ser de dois tipos, os baseados em sais metálicos (cloreto, nitrato ou sulfato) e os alcóxidos metálicos, sendo este último o precursor mais amplamente empregado no processo devido a sua facilidade em reagir com água e pela sua versatilidade. O precursor alcóxido metálico é membro da família dos compostos organometálicos, e apresenta a fórmula geral $M(OR)_4$, onde o M representa um metal (ex.: silício, titânio, zircônio) e o R um grupo alquil, sendo estes de constituição mais simples e de baixo custo.⁹⁰

Dentre os precursores alcóxidos mais explorados para os estudos dos MIS destacam-se: 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS),⁹¹ feniltrimetoxissilano (PTMOS),⁹² metacriloxipropiltrimetoxissilano (MPTMS),⁹³ tetrametoxissilano (TMOS), feniltrióxissilano (PTEOS) e tetraetoxissilano (TEOS),⁹⁴ sendo este último o mais usado na síntese do MIS.

A Figura 12 apresenta as principais reações envolvidas no PSG, a de hidrólise (Equação A) e de condensação (Equações B e C) com o precursor alcóxido de silício.^{84,87}

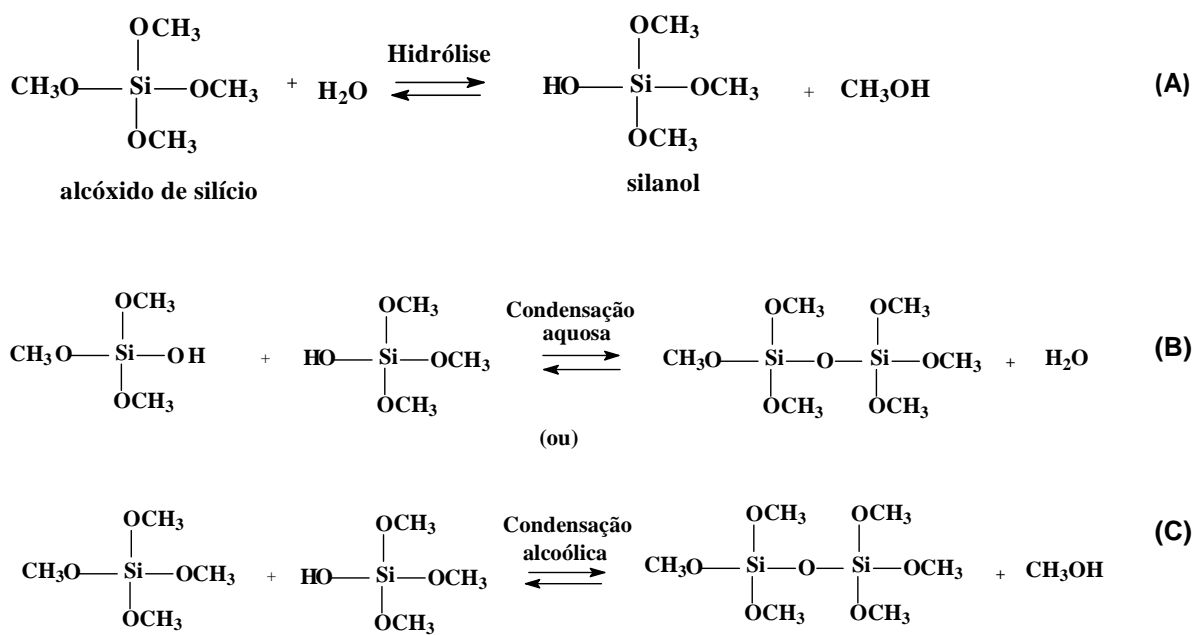


Figura 12. Reações de hidrólise do alcóxido de silício (A) de condensação aquosa (B) e condensação alcoólica (C) pelo PSG.

A Figura 12A ilustra a reação de hidrólise do precursor alcóxido de silício que por meio da reação direta com a água sofre hidrólise e forma grupos reativos do tipo silanóis (Si-O-H) e conseqüentemente libera álcool. Antes de completar a reação de hidrólise inicia-se a reação de condensação, que forma o grupo siloxano (Si-O-Si) em duas etapas. A primeira condensação, Figura 12B, envolve a reação de oxolação, em que dois grupos silanóis reagem entre si e liberam a água. A Figura 12C mostra a etapa de condensação por alcoxolação, em que ocorre a reação química entre um alcóxido e um hidróxido que forma o grupo siloxano, que conduz à forma final da sílica

amorfa e libera o subproduto álcool.^{88,87} Até a obtenção final da sílica o precursor alcóxido passa pela sequência: oligômero, colóide (sol), gel, xerogel.⁹⁰

Corriu⁹⁵ ressalta que a sequência reacional do PSG é mais complexa do que a descrita pelas reações apresentadas na Figura 12, e que a etapa de condensação se inicia antes da etapa de hidrólise ser concluída, o que dificulta o entendimento deste mecanismo, ainda pouco esclarecido. Além disso, diversas variáveis afetam a taxa de hidrólise e condensação das reações, como por exemplo,^{93,95} i) razão água:alcóxido, ii) pH, iii) tipo do precursor, iv) temperatura, vi) concentração e natureza dos reagentes e v) tipo e natureza do catalisador (ácido ou básico). Logo, esses parâmetros alteram a estrutura e as propriedades dos materiais, levam a formação de cadeias lineares, entrelaçadas, clusters ou partículas coloidais.

Na catálise ácida, por exemplo, a condensação ocorre nas extremidades dos oligômeros formando géis predominantemente de cadeias lineares com baixos volumes de poros devido à velocidade da reação de condensação ser maior que da hidrólise (reação eletrofílica). No caso da catálise básica, a condensação ocorre preferencialmente no centro dos oligômeros, e os géis formados são particulados e possuem uma grande porosidade devido a velocidade da hidrólise ser maior que a condensação (reação nucleofílica).^{88,90,95}

O PSG possui inúmeras vantagens em relação a síntese orgânica, como por exemplo: i) simplicidade no procedimento experimental, ii) boa estabilidade térmica e química, iii) obtenção de sílica com diferentes propriedades físicas (forma de partículas, área superficial, tamanho dos poros, grau de incorporação orgânica sendo controladas pelas condições reacionais e escolha do precursor a ser usado), iv) atmosfera não precisa ser controlada. Ainda é possível incorporar biomoléculas à rede inorgânica em temperaturas brandas,^{96,97,98} e íons metálicos.⁸⁹ Em relação às desvantagens do processo é possível destacar o elevado custo de alguns precursores e que a síntese em alguns casos pode ser longa e comprometer a reprodutibilidade dos materiais.⁹⁸

2.3.2.1. MIS para quercetina aplicado a SPE

Embora o PSG seja conhecido há bastante tempo, apenas na última década tem sido explorado na produção de MIS. Como foi mencionado anteriormente na

seção 2, os primeiros polímeros impressos baseados em sílica gel ainda em meados de 1950, mas devido às limitações observadas na época esses materiais não foram considerados promissores. Contudo, a partir de 2001, nota-se um elevado crescimento no número de publicações com MIS nas diversas áreas da ciência, conforme ilustrado na Figura 13.

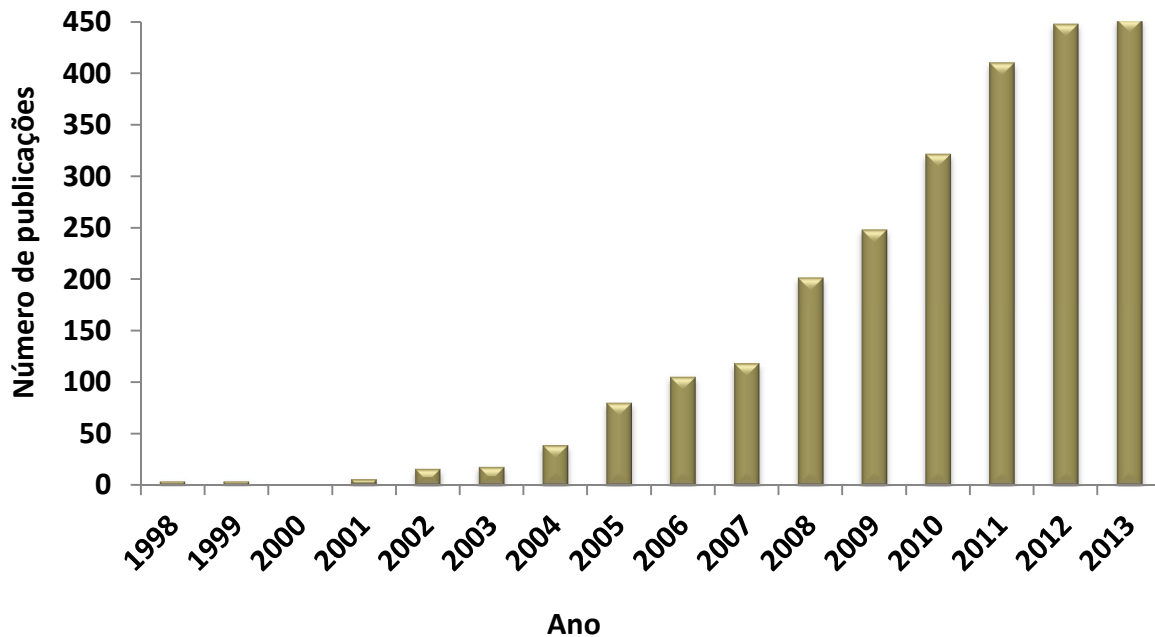


Figura 13. Número de publicações científicas sobre MIS nas diversas áreas da ciência a partir de 1997. Fonte: Web of Science. (Palavras-chaves: molecularly and imprint and silica and sol-gel).

Na literatura são descritos diferentes procedimentos para síntese do MIS baseado no PSG que pode ser preparados por meio do uso do precursor (alcóxidos metálicos) impressos com uma molécula molde (ex.: molécula orgânica, íons metálicos)^{89,99,100} em presença de monômeros orgânicos com precursores inorgânicos⁸⁹ e a sílica gel modificada.¹⁰¹ É importante destacar que os procedimentos baseados em polímeros impressos por PSG, ainda não possuem um procedimento bem estabelecido na maneira em que são adicionados a MM (composto orgânico) e os tipos e as quantidades de precursores usados, diferente do que é observado para as sínteses de polímeros impressos à base de acrilato. Logo, os tipos de interações envolvidas entre a MM e o precursor podem ser ligações covalentes, não-covalentes

e as ligações com metais de coordenação, sendo o último bastante explorado para a extração e pré-concentração de íons metálicos.⁶⁷

Na síntese do MIS não covalente (Figura 14), a MM pode ser solubilizada em um solvente apropriado antes de se iniciar a reação de hidrólise e condensação. No caso do uso de um precursor apolar, ao ser colocado em presença de um solvente polar (como etanol, por exemplo), os sítios específicos de impressão são gerados por ligação de van der Waals, ligações de hidrogênio, eletrostática, entre outras.⁶⁷ À medida que as reações de hidrólise e condensação avançam os MF ou LC, que neste caso são os precursores, reagem entre si através das ligações entre os grupos terminais, ocorre o entrecruzamento da MM nas cavidades do material, o crescimento dos polímeros e o aumento da viscosidade. Conseqüentemente, é formado agregado de dimensões macroscópicas, o gel, e após essa etapa prossegue-se com o envelhecimento do gel. Na etapa final o subproduto gerado, o álcool ou a água é evaporado e o MIS obtido é submetido à etapa de remoção da MM com um solvente apropriado, conforme descrito em detalhe na seção 2.2.1. Por fim, obtém-se um material, MIS, que possui sítios específicos de impressão que são disponibilizados na extração do analito de interesse.

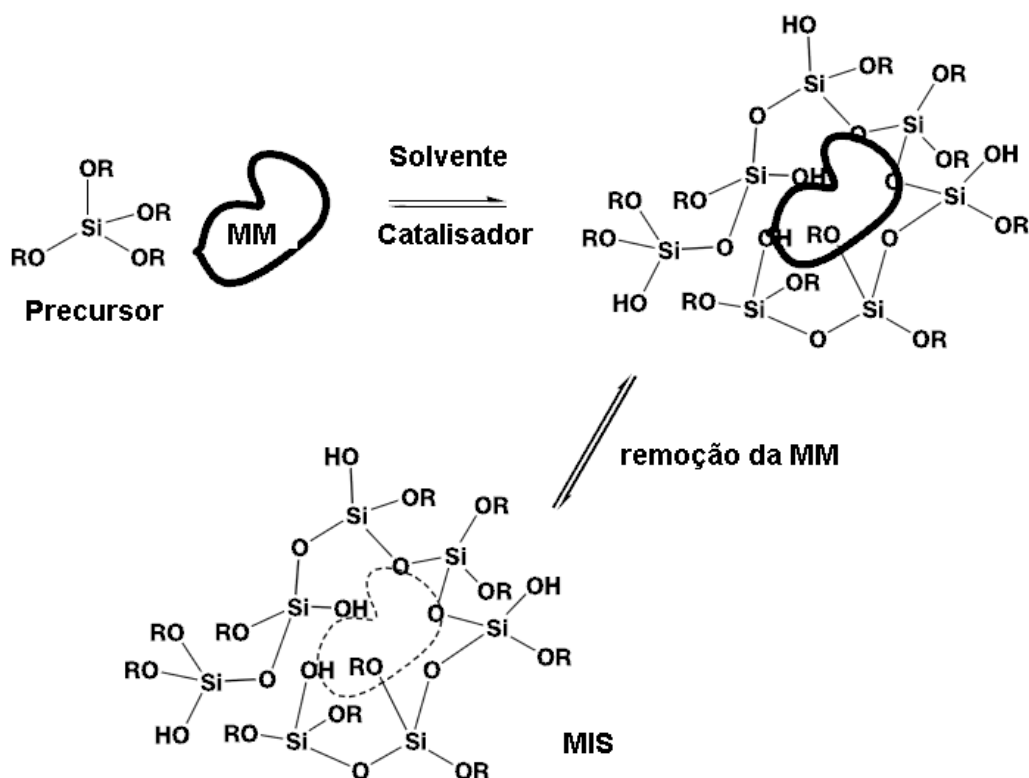


Figura 14. Sílica impressa molecularmente não covalente por PSG (adaptado de Díaz-García et al.⁶⁷).

Com relação à aplicação de MIS para a determinação de quercetina, apenas o trabalho de Yang et al.,¹⁰¹ foi realizado. Nesse trabalho os autores prepararam um MIS em uma superfície de sílica gel com quercetina (Figura 15). A síntese foi conduzida inicialmente com a ativação da superfície da sílica gel com ácido clorídrico 10% em refluxo por 12 h. Separadamente foi preparada uma mistura de quercetina, APTMS (MF) e TEOS (LC) solubilizadas em metanol sob agitação constante por 30 min. Em seguida foi acrescentada sílica gel ativada, recém preparada, e adicionada a solução de ácido acético ao meio reacional e a mistura foi agitada por 15 h a temperatura ambiente. A molécula molde foi removida com metanol, metanol/amônia e água deionizada. Os resultados descritos indicaram que o MIS apresentou capacidade de adsorção superior ao NIS e seletividade satisfatória frente ao seu análogo (gemisteína) obtendo um fator de impressão (IF) de 2,4. Sendo este um importante fator para avaliar o reconhecimento molecular do MIS em relação ao NIS.

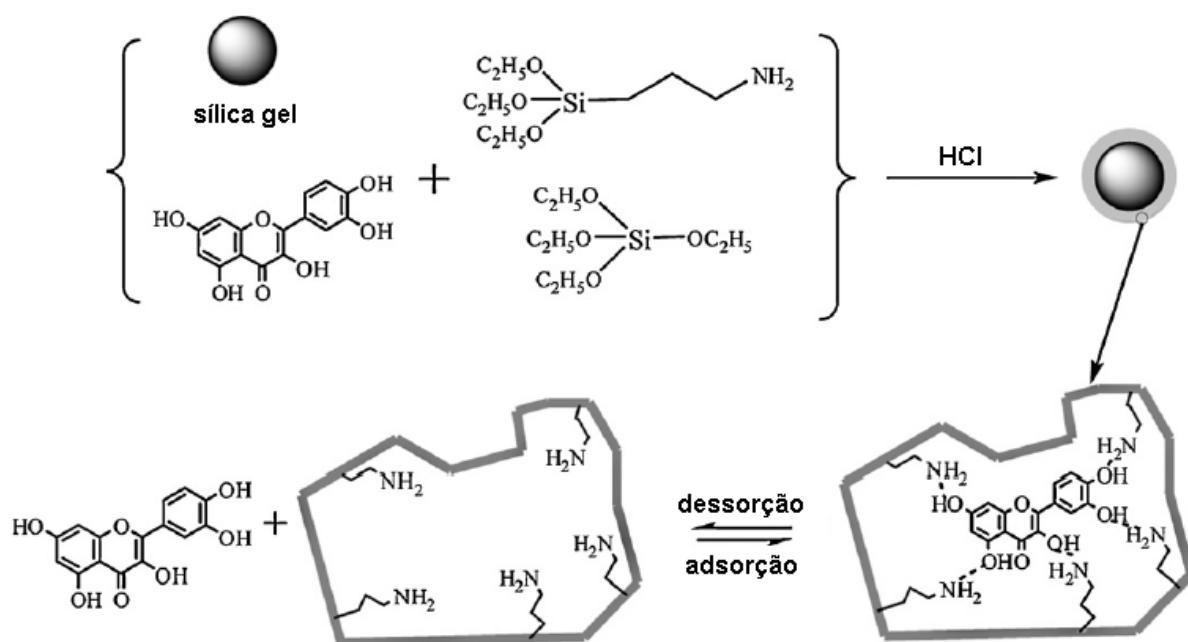


Figura 15. Preparação da sílica impressa molecularmente para quercetina por PSG (adaptado de Yan et al.⁹⁹)

Diversas aplicações de MIS com outras moléculas orgânicas foram ressaltadas na literatura, pode-se destacar os trabalhos que empregaram o precursor TEOS e este combinado com outros precursores.^{99,100,102}

Tsai e Syu⁹⁹ sintetizaram um MIS para creatinina (metabólito usado como biomarcador da função renal). Foi utilizado o precursor TEOS que foi hidrolisado em

presença de água, proporcionando a formação de grupos silanóis (Si(OH)_4) disponíveis para formar ligações de hidrogênio com os grupos funcionais da creatinina (MM). A temperatura de 60 °C foi usada para evaporar o etanol, sendo este um subproduto gerado da etapa de hidrólise. Na sequência foi adicionado ácido clorídrico diluído para ativar a etapa de policondensação. As partículas obtidas apresentaram tamanho variando entre 74 - 52 μm e na etapa de remoção da MM foi empregado o metanol. O resultado da análise de adsorção da creatinina em meio aquoso mostrou-se cinco vezes maior que em meio metanólico. A seletividade frente aos seus análogos estruturais (creatina, *N*-hidroxisuccinimida e 2-pirrolidona) foi testada a partir de soluções binária e terciária e o MIS sintetizado pelo PSG confirmou o seu potencial de aplicação, sendo altamente seletivo para creatinina.

Wei et. al.,¹⁰⁰ sintetizaram e caracterizaram uma nanosílica impressa molecularmente para determinação de traços de bisfenol A (monômero usado na fabricação de plásticos de policarbonato) em amostra de peixe, seguido de análise por CLAE com detector de fluorescência. A nanosílica foi inicialmente preparada a partir de TEOS em solução de amônia, sendo obtidas partículas com diâmetro de 200 nm. Em seguida, as nanosílicas impressas foram dispersas em metanol e suspensas em bisfenol A, TEOS, APTES e ácido acético. Na sequência foram misturados à temperatura ambiente por 18 h. A remoção da MM foi realizada com metanol e ácido clorídrico 6 mol/L (1:1, v/v). Os ensaios com a nanosílica impressa mostraram alta capacidade de adsorção e seletividade quando comparada a C18 utilizada em SPE comercial. Foi obtida uma recuperação de $92,0 \pm 12,2\%$ com a reutilização do cartucho por seis vezes sendo o suficiente para determinar traços de bisfenol A em amostras de peixe.

Farrington e Regan,¹⁰² prepararam um MIS de ibuprofeno, um medicamento anti-inflamatório não esteroideal muito usado como analgésico. A síntese foi conduzida utilizando a combinação do ibuprofeno, em presença de três precursores: TEOS, APTES e PTMOS. Foram produzidos três diferentes polímeros sol-gel combinados com a molécula molde, TEOS/APTES, TEOS/PTMOS e TEOS/APTES/PTMOS. Após obtenção dos polímeros impressos e removidas a MM das cavidades, estes foram inseridos num cartucho de SPE e aplicado na análise de uma amostra de urina coletada de um paciente, após 6 h de ingestão de um fármaco contendo 200 mg de ibuprofeno. Os resultados mostraram que o MIS combinado com

TEOS/APTES/PTMOS foi o que apresentou maior seletividade ao analito, eficiência de *clean up* e pré-concentração do ibuprofeno presente na urina quando comparado às outras combinações. Neste caso foi adquirido um cromatograma mais limpo e livre de interferentes (metabólitos da urina) após passagem pelo MIS.

Diante dos estudos baseados no PSG para obtenção de um MIS torna-se esta uma alternativa viável para extração de quercetina, visto que apresenta vantagens em relação à síntese orgânica, tais como, a produção de materiais de baixa densidade, baixo custo de produção, flexibilidade, além da boa estabilidade química e física^{89,103} e a reutilização do MIS como SPE.¹⁰⁰

**CAPÍTULO I - Síntese e caracterização de polímero
impresso molecularmente (MIP) mediados por íons para
extração de quercetina**

1. Introdução

A quercetina é um dos flavonóides mais abundantemente encontrados no reino vegetal e vem sendo objeto de pesquisa em diversas áreas. Diante da complexidade das matrizes, tais como, frutas, vinhos, fitoterápicos, a quantificação da quercetina é dificultada devido a sua similaridade com outras moléculas de flavonóides que estão presentes na amostra. Desta forma, seria interessante prover um polímero impresso mais seletivo para sua separação, entretanto, interações mais específicas entre a quercetina e o monômero funcional devem ser estabelecidas. Esse tipo de interação pode ser conseguido por meio de uma das atividades antioxidantes da quercetina, a formação de complexo quelato com íons metálicos.⁶⁸ Esta interação se deve aos três possíveis sítios quelantes em sua estrutura (Figura 16), grupos 5 e 3-hidroxicromona e 3',4'-o-dihidroxil.⁵⁶ Devido a essa característica, a quercetina tem sido muito usada como reagente para determinação de metais por fluorescência e por espectrofotometria.^{104,105} O método espectrofotométrico se baseia na formação de um complexo estável da quercetina com Al^{3+} (Figura 16), resultando em um desvio batocrômico de 372 nm para 430 nm com máximo de absorção em metanol. Essa reação é bastante seletiva, uma vez que apenas os flavonóides que possuam hidroxilas nessas posições irão formar complexos com Al^{3+} . Desta forma, aplicando-se essa interação específica no equilíbrio químico entre MM e o MF, pode-se almejar a síntese de um MIP específico para quercetina.

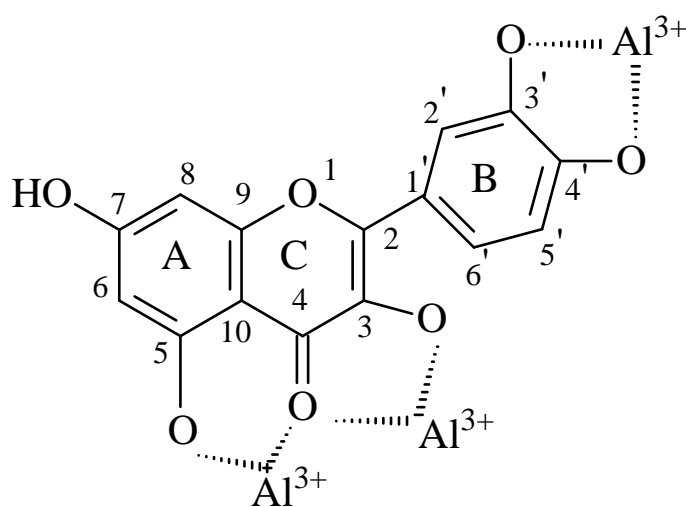


Figura 16. Estrutura do complexo (Quer- Al^{3+})

Dentre as possibilidades de inserção de um metal no procedimento de síntese do polímero impresso, uma hipótese seria a preparação de um MF contendo metal (do inglês “metal-containing monomer”)¹⁰⁶ para se obter um reconhecimento da MM mediado por um íon metálico. Algumas estratégias envolvendo o uso de metais na impressão molecular de quercetina têm sido reportadas na literatura, as quais são baseadas na formação do complexo previamente à síntese, com adição de íons (Co^{3+}),⁷⁶ (Cu^{2+}),¹⁰⁷ (Zn^{2+})⁵⁷ na solução contendo a MM. Em seguida, prossegue-se com a síntese em bulk tradicional e na etapa de lavagem do MIP, todo o complexo formado é retirado deixando as cavidades tridimensionais impressas no polímero. Entretanto, para a extração do analito de interesse por MIP baseada nessa estratégia, deve-se adicionar mais uma etapa de tratamento da amostra, a adição de um metal para a formação do complexo. É importante observar que poucos trabalhos na literatura apresentam a síntese de MIP para moléculas baseado em MF contendo metais^{57,76,108} e que os mesmos permanecem na cavidade impressa para extração. Desta forma, torna-se altamente promissor a confecção do MF contendo metal (Al^{3+} , por exemplo) para uma posterior interação química com a quercetina de um modo mais seletivo. Dentre os reagentes mais usados, o AlCl_3 se destaca em meio ácido para formar complexo com os grupos hidroxila nas posições 3-OH ou 5-OH e desloca o espectro de absorção da quercetina. Já para os que não contém esses grupos, não há formação de complexos com Al^{3+} e assim seus espectros não são alterados. Dependendo do reagente usado para complexação, pode-se inferir o tipo de flavonóide: AlCl_3 em solução neutra forma complexos com os três grupos quelantes, ácido bórico forma complexo somente com o grupo 3,4 o-difenil, também chamado de ortodihidroxi ou catecol.¹⁰⁹

Desta forma, essas interações entre metais e grupos hidroxila da quercetina podem ser aplicadas nos polímeros impressos, por meio de processos de síntese mediado por íons, para melhorar sua especificidade. Essa estratégia parece ainda não ter sido proposta, salientando o caráter inovador dessa pesquisa. Portanto, este estudo foi desenvolvido objetivando sintetizar um polímero impresso mediado por íons (Al^{3+} e Cu^{2+}) para extração de quercetina. Para avaliar o material sintetizado, foram realizados teste de eficiência de adsorção, reprodutibilidade e seletividade. Foi aplicado o método espectrofotométrico buscando simplicidade e rapidez nas medidas e a cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar a seletividade dos polímeros.

2. Metodologia

2.1. Reagentes

- Cloreto de alumínio (AlCl_3), pureza 99,0 %, Cinética
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), pureza 99,0%, Reagen
- Carbonato de cobre (CuCO_3), pureza $\geq 99,0$ %, Cinética
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), pureza 99,9 %, Scharlau
- Metanol (CH_3OH), pureza 99,0 %, Tedia
- Acetona ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), pureza 99,5 %, Dinâmica
- Acetonitrila (CH_3CN), pureza 99,9 %, Tedia
- Dimetilsulfóxido ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), pureza 99,9 %, Tedia
- Hidróxido de sódio (NaOH), pureza 97,0 %, Reagen
- Ácido nítrico (HNO_3), pureza 65 %, Quimesc
- Acetato de sódio (CH_3COONa), pureza 99,0 %, Vetec
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), pureza 99,0 %, Merck
- Ácido metacrílico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$), pureza 99,0 %, Fluka
- Ácido acético glacial (CH_3COOH), pureza $\geq 99,0$ %, Cinética
- Dimetacrilato de etilenoglicol ou EGDMA, pureza 98,0 %, Aldrich
- 2,2-azobisisobutironitrila ou AIBN ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4$), pureza 98,0 %, Aldrich
- Quercetina Anidra ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), pureza ≥ 95 %, Aldrich
- Rutina hidratada ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot x\text{H}_2\text{O}$), pureza ≥ 94 %, Aldrich
- Morina Anidra ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), pureza ≥ 95 %, Aldrich

2.2. Equipamentos

- Balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001 g
- Banho ultra-som, Unique, modelo 1400
- Mesa agitadora horizontal, ethiotechnology, modelo Ethik
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Modelo JEOL JSM-7001F
- Surface Area e Pore Size Analyser, Quantachrome, modelo Nova 2200c
- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Varian, Modelo 640-IR

- Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (FRX/EDX), Shimadzu, modelo EDX-720
- Espectrofotômetro UV-Vis, Agilent, modelo 8453.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), PerkinElmer, composto de uma bomba de alta pressão, modelo Flexar LC Pump; Detector Flexar PDA (Photodiode Array Detector), válvula de injeção (alça de amostragem de 20 µL); Software Chromera, PerkinElmer
- Coluna cromatográfica Bownlee Analytical C₁₈ diâmetro médio de 5 µm, 250 x 4,6 mm, PerkinElmer
- Sistema de deionização da água, Milli-Q, Millipore
- Bomba peristáltica, Ismatec, modelo IPC High precision multichannel dispenser
- Agitador magnético com aquecimento Go-Stirrer MS-H-S Go-Lab
- Tubo Tygon, Viton, 1,42 mm;
- Seringa de polipropileno de 3 mL
- Banho maria SL 150, Solab

2.3. Síntese do monômero funcional modificado com íons metálicos

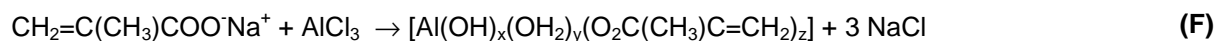
As sínteses dos monômeros funcionais modificados com íons metálicos (Al³⁺ e Cu²⁺) foram baseadas em dois diferentes procedimentos experimentais descritos por Dam et al.,¹¹⁰ e Vilchis-Nestor et al.¹¹¹

O primeiro procedimento de síntese empregou uma reação de ácido metacrílico com carbonato de cobre solubilizado em diclorometano, conforme Equação (D). Nesta reação, o íon Cu²⁺ foi utilizado, conforme descrito na literatura.¹⁰⁹



A síntese foi realizada em um bécker de 250 mL, no qual adicionou-se 4,35 g CuCO₃ (19,7 mmol) dissolvidos em 50,0 mL de diclorometano e em seguida 3,33 mL de ácido metacrílico (39,34 mmol). Essa mistura foi homogeneizada e ficou 2 dias em repouso a temperatura ambiente. O precipitado azul de metacrilato de cobre foi então filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 60 °C.

O segundo procedimento¹¹⁰ envolveu a formação de metacrilato de alumínio por meio das reações de ácido metacrílico com bicarbonato de sódio, conforme Equação (E), seguindo da adição de cloreto de alumínio, conforme Equação (F).



Nesse segundo experimento, em um bécker de 250,0 mL adicionou-se 9,91 g NaHCO_3 (117,9 mmol) em água suficiente para a dissolução do sal e 10,0 mL (117,9 mmol) de ácido metacrílico e agitou-se por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 5,24 g (39,34 mmol) de AlCl_3 em água e agitou-se por 1 hora a 60 °C. O precipitado branco de metacrilato de alumínio foi filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 60 °C.

Os monômeros funcionais modificados com íons Al^{3+} e Cu^{2+} , MF- Al^{3+} e MF- Cu^{2+} , respectivamente foram caracterizados por FTIR para averiguar as modificações estruturais.

2.4. Estudos de interação Quercetina e Monômero Funcional

Com o objetivo de verificar a condição mais eficiente para síntese do MIP com e sem presença de íons metálicos, diferentes condições experimentais de interação entre quercetina (Quer) e monômero funcional (MF, MF- Al^{3+} e MF- Cu^{2+}) foram avaliadas. Os parâmetros estudados são descritos a seguir e foram monitorados utilizando um espectrofotômetro UV-Vis em comprimentos de onda 372 nm e 430 nm, que corresponde à região de máxima absorção para Quer e para o complexo formado, respectivamente.

2.4.1. Avaliação dos solventes

Após a síntese dos monômeros funcionais com íons metálicos (MF- M^{n+}) foram realizados estudos de interação com a molécula de Quer. O objetivo deste estudo foi avaliar a solubilidade e interação da Quer e do MF- M^{n+} em quatro diferentes solventes: acetona, acetonitrila, acetonitrila:DMSO (3:2) e metanol.

Soluções de Quer ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L) e dos MF-Al³⁺ e MF-Cu²⁺ ($2,0 \times 10^{-4}$ mol/L) foram preparados nos diferentes solventes. Os ensaios foram realizados em balão volumétrico de 10 mL mantendo-se a proporção (1:8 mmol) de Quer e MF-Mⁿ⁺ e completando-se o balão com o solvente correspondente. Em seguida, os balões foram conduzidos ao banho ultra-som por 1 h para melhoria da interação Quer-MF-Mⁿ⁺ e leituras de absorbâncias foram realizadas para verificar a presença do complexo formado em 430 nm. Em paralelo, medidas de interação entre Quer e MF (ácido metacrílico) foram realizadas.

2.4.2. Estudo cinético

Nesta etapa foi avaliada a cinética de interação entre Quer e MF-Mⁿ⁺ no solvente escolhido anteriormente. Foram preparadas as soluções de Quer e MF-Mⁿ⁺ ou MF nas mesmas concentrações e proporções descritas na seção 2.4.1, as quais foram conduzidas ao banho de ultra-som por 5 h e alíquotas foram coletadas de hora em hora para a leitura. Logo, pode-se avaliar o tempo necessário no ultra-som para atingir o equilíbrio químico e obter a formação do complexo desejado.

2.4.3. Efeito da concentração de quercetina

O objetivo deste estudo foi variar a quantidade de Quer em relação à quantidade fixa do monômero funcional (MF, MF-Al³⁺ e MF-Cu²⁺) nas proporções (Quer : MF-Mⁿ⁺) (mmol) (0,25:8), (0,5:8), (1:8), (4:8) e (6:8).

As soluções dos monômeros funcionais ($1,6 \times 10^{-4}$ mol/L) e de Quer (5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , $2,7 \times 10^{-5}$, 4×10^{-5} mol/L) foram preparadas em metanol. O procedimento foi o mesmo descrito na seção 2.4.1 e os balões foram inseridos ao banho ultra-som no tempo selecionado na seção 2.4.2 e realizada a leitura em 430 nm, objetivando-se investigar a formação do complexo a partir das diferentes proporções de Quer.

2.4.4. Efeito da concentração do monômero funcional

De acordo com estudos reportados^{74,75,112,113} a síntese de MIP baseado em processo de interação não covalente, geralmente emprega excesso de MF em

relação a quantidade de MM para garantir a total interação química entre MM e o MF. Entretanto, com o intuito de verificar a proporção mais adequada do monômero modificado com íons para interagir com a Quer foram estudadas as proporções de (Quer : MF-Mⁿ⁺) (mmol) (1:4), (1:8), (1:12) em metanol sob agitação constante no ultra-som por 2 h e foi mantida a quantidade de Quer selecionada na seção 2.4.3.

Neste ensaio, definiu-se a proporção mais adequada do MF-Mⁿ⁺ que interagiu com Quer para formar sítios de ligações específicas para formação do complexo.

2.5. Síntese dos polímeros impressos molecularmente

Para a síntese do MIP foram empregados dois tipos de monômeros funcionais: o sem modificar com íons (MF) para obtenção do polímero impresso (MIP) e o modificado com íons (MF-Mⁿ⁺), neste caso os MF-Al³⁺ e MF-Cu²⁺, para aquisição dos polímeros impressos MIP-Al³⁺ e MIP-Cu²⁺, respectivamente.

Após definir os parâmetros avaliados nas seções de 2.4.1 a 2.4.4 (tipo do solvente, tempo de interação Quer-MFⁿ⁺, concentração de Quer e do monômero funcional), as sínteses dos MIP e MIP-Mⁿ⁺ foram realizadas. As quantidades dos outros reagentes não avaliados na seção 2.2, como dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN) e o volume de solvente foram mantidos os mesmos reportado por Molinelli et al.⁷⁵

A Tabela 1 mostra a composição/quantidade dos reagentes envolvidos nas sínteses e para este estudo especificamente as quantidades dos reagentes foram reduzidos proporcionalmente com base na literatura.⁷⁵

Tabela 1. Composição dos MIP e NIP sintetizados com base na proporção molar (mmol) (MM : MF : EGDMA) (1: 8 : 40).

	MM ^a (g)	MF ^b	CH ₃ OH (mL)	EGDMA (μL)	AIBN (g)
NIP	-	83,5μL (MF)	3,75	943	6,25 x10 ⁻³
MIP	3,78 x 10 ⁻²	83,5μL (MF)	3,75	943	6,25 x10 ⁻³
NIP-Al³⁺	-	7,1 x 10 ⁻² g (MF-Al ³⁺)	3,75	943	6,25 x10 ⁻³
MIP-Al³⁺	3,78 x 10 ⁻²	7,1 x 10 ⁻² g (MF-Al ³⁺)	3,75	943	6,25 x10 ⁻³
NIP-Cu²⁺	-	7,1 x 10 ⁻² g (MF-Cu ²⁺)	3,75	943	6,25 x10 ⁻³
MIP-Cu²⁺	3,78 x 10 ⁻²	7,1 x 10 ⁻² g (MF-Cu ²⁺)	3,75	943	6,25 x10 ⁻³

^aMolécula molde (Quer)

^bMonômero funcional

Para a obtenção do polímero foi empregada uma ampola de vidro (17 X 160 mm), com capacidade de 18,9 mL, conforme ilustrado na Figura 17. Primeiramente, foi adicionado em cada ampola 0,0378 g de Quer e 3,75 mL de metanol, completando-se a solubilização no banho ultra-som por cerca de 10 min. Posteriormente, adicionou-se individualmente 83,5 μL, 0,0071 g e 0,0071 g de MF, MF-Al³⁺ e MF-Cu²⁺, respectivamente, em cada ampola e foram conduzidos ao ultra-som para completar a solubilização com o tempo definido na seção 2.4.2.

Em seguida, adicionou-se 943 μL de EGDMA e homogeneizou-se as misturas. Após as misturas dos reagentes, as ampolas foram inseridas em um banho de gelo e foi adicionado a cada uma 0,0063 g de AIBN. Antes de iniciar a síntese em bulk, purgou-se o interior da ampola com gás inerte (N₂) para a retirada do oxigênio e imediatamente vedou-se a ampola com uma tampa. Em seguida, a ampola foi mergulhada em um banho termostatizado a 60 °C por 24 h para proceder à polimerização e ao final desse intervalo de tempo foram obtidos os polímeros em bloco (MIP, MIP-Al³⁺ e MIP-Cu²⁺).

O mesmo procedimento foi realizado para seus respectivos polímeros controles (NIP) sem a presença da molécula molde e com cada tipo de monômero funcional obtendo-se os polímeros (NIP, NIP-Al³⁺ e NIP-Cu²⁺). Após a finalização das sínteses, as ampolas foram quebradas, os polímeros macerados, peneirados para definir o

tamanho de partícula e submetidos ao procedimento de lavagem para remoção da MM da cavidade do polímero impresso.

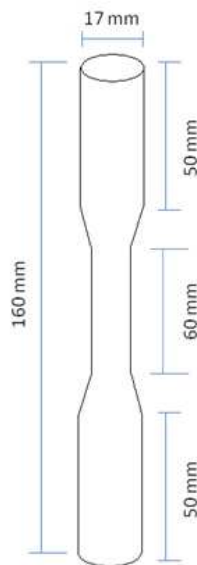


Figura 17. Ampola de vidro usada na síntese do MIP.

2.5.1. Etapa de remoção da molécula molde do MIP

A etapa de remoção da MM é essencial para garantir que os sítios ativos do MIP fiquem disponíveis para uma eficiente adsorção do analito de interesse na etapa de extração. Na literatura são reportados metanol¹¹⁴ e mistura de metanol : ácido acético glacial nas proporções (4:1)⁷⁵ e (9:1),^{77,78} (v/v) para remoção da MM (Quer). Para esta etapa de remoção da MM nos polímeros obtidos (MIP, MIP-Al³⁺ e MIP-Cu²⁺) foi escolhida a mistura de metanol : ácido acético glacial (9:1) sendo esta uma das condições mais exploradas.

Para remoção, utilizou-se uma seringa de plástico comercial de 3 mL, acoplado-se um fritz de polipropileno em sua base de saída. Em seguida foi realizado o enchimento das seringas individuais com 50 mg de MIP e MIP-Al³⁺, e alíquotas de 2 mL de metanol:ácido acético glacial (9:1) foram percoladas e o eluato de cada alíquota coletado e analisado no espectrofotômetro UV-Vis até não detectar a presença da Quer. Em seguida, o MIP foi seco em estufa (60 °C) até peso constante e estocado em frascos de vidro até seu uso. O mesmo procedimento foi realizado para o polímero controle (NIP).

Para averiguar a presença de íons Al^{3+} no MIP- Al^{3+} após a remoção da MM e secagem do polímero, realizou-se a análise de FRX/EDX, sendo comparados os resultados do teor de Al^{3+} no MIP- Al^{3+} antes e depois de passar pelo processo de remoção.

Para complementar o processo de remoção da MM do MIP- Al^{3+} outras soluções de lavagem foram testadas: etanol, metanol, acetonitrila, ácido acético (0,5 mol/L), ácido nítrico (0,5 mol/L), hidróxido de sódio (0,5 mol/L), tampão acetato de sódio 0,01 mol/L em pH 4,5 e tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L em pH 7,5 e 8,5. Por fim, duas estratégias para a remoção da MM foram analisadas, de acordo com a Tabela 2. As misturas de solventes nas proporções selecionadas e os dois procedimentos, o tradicional de lavagem percolando a solução pelo cartucho e o sistema Soxhlet foram empregados nos ensaios.

Tabela 2. Procedimento e mistura de solventes para a remoção da MM do MIP- Al^{3+} .

MISTURAS DE SOLVENTES	PROCEDIMENTO
metanol : tampão pH 4,5 (50: 50)	tradicional
metanol : tampão pH 4,5 (50:50) + ácido acético : metanol (1:20)	tradicional
metanol: tampão pH 4,5 (75:25)	Soxhlet (12h)
metanol : tampão pH 4,5 (75:25) + ácido acético : metanol (1:20)	Soxhlet (12h)

2.6. Caracterização química e estrutural dos polímeros

A caracterização morfológica da superfície dos polímeros impressos e não impressos foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo JEOL JSM-7001F), pertencente ao Laboratório do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Cada amostra foi previamente metalizada com ouro, a fim de tornar-se condutora, utilizando atmosfera inerte de Argônio e as superfícies foram registradas com ampliações de 1000 e 5000 vezes.

A porosidade e a área superficial específica dos polímeros foram avaliadas através de ensaios de porosimetria de sorção de nitrogênio. Este ensaio consistiu na exposição de massa fixa do polímero a 100°C por 3 h a vácuo e em seguida foi submetido a diferentes pressões de nitrogênio. Em seguida, a sorção física e dessorção de gás nitrogênio nos poros da amostra sólida foi medida em função da pressão do mesmo. Foram obtidas as isotermas de sorção pelos métodos BET (Brunauer, Emmett and Teller) e o BJH (Barret, Joyner and Halen) para aquisição da área superficial, volume e tamanho dos poros. O ensaio foi conduzido em um equipamento Surface Area e Pore Size Analyser, a 100 °C pertencente ao Laboratório de Materiais e Combustíveis (LMC) do IQ-UnB.

Para avaliar os grupamentos existentes nos polímeros utilizou-se a espectroscopia de absorção no infravermelho. Para as medidas dos espectros IV os polímeros foram macerados em KBr na proporção de 1% (m/m) a temperatura ambiente. Os ensaios foram conduzidos em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Modelo 640-IR (Varian) com resolução de 4 cm⁻¹ e medidas entre 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ e 64 varreduras. Para a identificação e quantificação dos íons metálicos aderidos aos polímeros empregou-se o Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (FRX/EDX) da Shimadzu, modelo EDX-720, que analisa a faixa de elementos que vai desde o sódio (¹¹Na) ao Urânio (⁹²U), com tubos de raio X com alvo de ródio (Rh), mas, sendo analisado neste estudo especificamente apenas a linha de energia do Al. Todas as análises foram feitas por meio de um programa do próprio equipamento: EDX software, DXP-700E versão 1.00. Ambos os equipamentos são pertencentes ao Laboratório da central analítica do IQ-UnB.

2.7. Estudo de desempenho dos polímeros

Para estimar a capacidade de reconhecimento e da adsorção do MIP e NIP, estudos de adsorção e isoterma de adsorção foram realizados.

Para o estudo de adsorção foi preparada uma solução de Quer 6 mg L⁻¹ em metanol e foi usado 10 mg de cada polímero. Os polímeros previamente pesados foram transferidos para um frasco com tampa e adicionados 5 mL da solução de Quer recém preparada, sendo cada ensaio realizado em triplicata. Em seguida, os frascos

foram lacrados e agitados por 2 h em um agitador horizontal. Ao término deste período, filtrou-se as misturas e a quantidade de analito que permaneceu livre em solução foi determinada por espectrofotometria UV-Vis.

A capacidade de adsorção dos polímeros foi avaliada pela diferença da concentração de Quer antes e depois da adsorção e foi estimada pela Equação G, proposta por Zeng et al.¹¹⁵

$$Q = \frac{(C_0 - C_s) \times 1000 \times V}{m} \quad (\text{G})$$

onde: Q ($\mu\text{g g}^{-1}$) é capacidade de adsorção por unidade de massa dos polímeros, C_0 (mg L^{-1}) a concentração inicial da solução do analito, C_s (mg L^{-1}) a concentração do analito livre no equilíbrio, V (L) volume da solução de Quer e m (g) da massa do polímero.

O fator de impressão (IF) foi determinado com base na Equação H, sendo este definido pela razão da resposta do MIP versus NIP.¹¹⁴

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (\text{H})$$

Para a construção da isoterma de adsorção em batelada, transferiu-se 10 mg de cada polímero para um frasco com tampa e acrescentou-se 5 mL da solução de Quer em metanol em 6 níveis de concentrações, na faixa de 0,5 a 15,0 mg L^{-1} . Em seguida os tubos foram agitados por 24 h a 150 rpm em um agitador horizontal, e após o tempo estabelecido, as alíquotas do sobrenadante (analito livre) foram analisadas no espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados da capacidade de adsorção ($\mu\text{g g}^{-1}$) foram calculados com base na Equação G e o ajuste dos modelos (Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich) de isoterma de adsorção foi realizado no software Origin (versão 8.0).

2.8. Avaliação da seletividade dos polímeros

A avaliação da seletividade dos polímeros foi feita mediante estudo de adsorção, conforme descritos por Li et al.,¹¹⁶ onde misturas contendo Quer, rutina (Rut) e morina (Mor) de 20 mg L^{-1} foram dissolvidas em metanol.

Os estudos de adsorção foram realizados em triplicatas com o MIP e NIP. Foram adicionados 5 mL das soluções contendo Quer, Rut e Mor em frasco com 100 mg do polímero, os quais foram lacrados e agitados durante 2 h no agitador horizontal a 150 rpm. Ao término deste período, alíquotas foram filtradas e analisadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector PDA e os resultados foram calculados com base nas Equações G e H, descritos na seção 2.7.

3. Resultados e discussões

3.1. Caracterização do monômero funcional modificado com íons metálicos

Foram realizadas as sínteses dos monômeros funcionais a base de ácido metacrílico (MF) e modificado com Al^{3+} e Cu^{2+} obtendo o MF- Al^{3+} e MF- Cu^{2+} , conforme descrito na seção 2.3. A escolha dos íons Al^{3+} e Cu^{2+} foram objetivadas devido às suas diferenças em estado de oxidação, configuração eletrônica e tamanho, as quais promoveriam diferentes interações com o MF. As Figuras 18B e 18C apresentam os respectivos espectros no IV para o MF, MF- Al^{3+} e MF- Cu^{2+} .

Pode-se observar que o espectro do MF (Figura 18A), apresenta uma ampla banda entre $3300\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$, referente à vibração de estiramento do grupo O-H. Essa banda foi reduzida quando o metal foi adicionado à estrutura do ácido metacrílico, conforme pode ser observado nos espectros das Figuras 18B e 18C, resultado de uma substituição do H do grupo OH pelo metal. A literatura apresenta alguns espectros similares aos obtidos nesse experimento,⁶⁸ onde comprova a formação do MF- Al^{3+} e do MF- Cu^{2+} . Interpretações mais profundas acerca das posições estruturais do metacrilato metálico podem ainda ser discutidas, como a forte banda presente em 1697 cm^{-1} na Figura 18A, que corresponde a vibração de estiramento do grupo COOH, a qual não foi observada no espectro da Figuras 18B e 18C. Isso demonstra que o complexo final pode ser um quelato bidentado formado entre o metal e o ácido metacrílico.⁶⁸

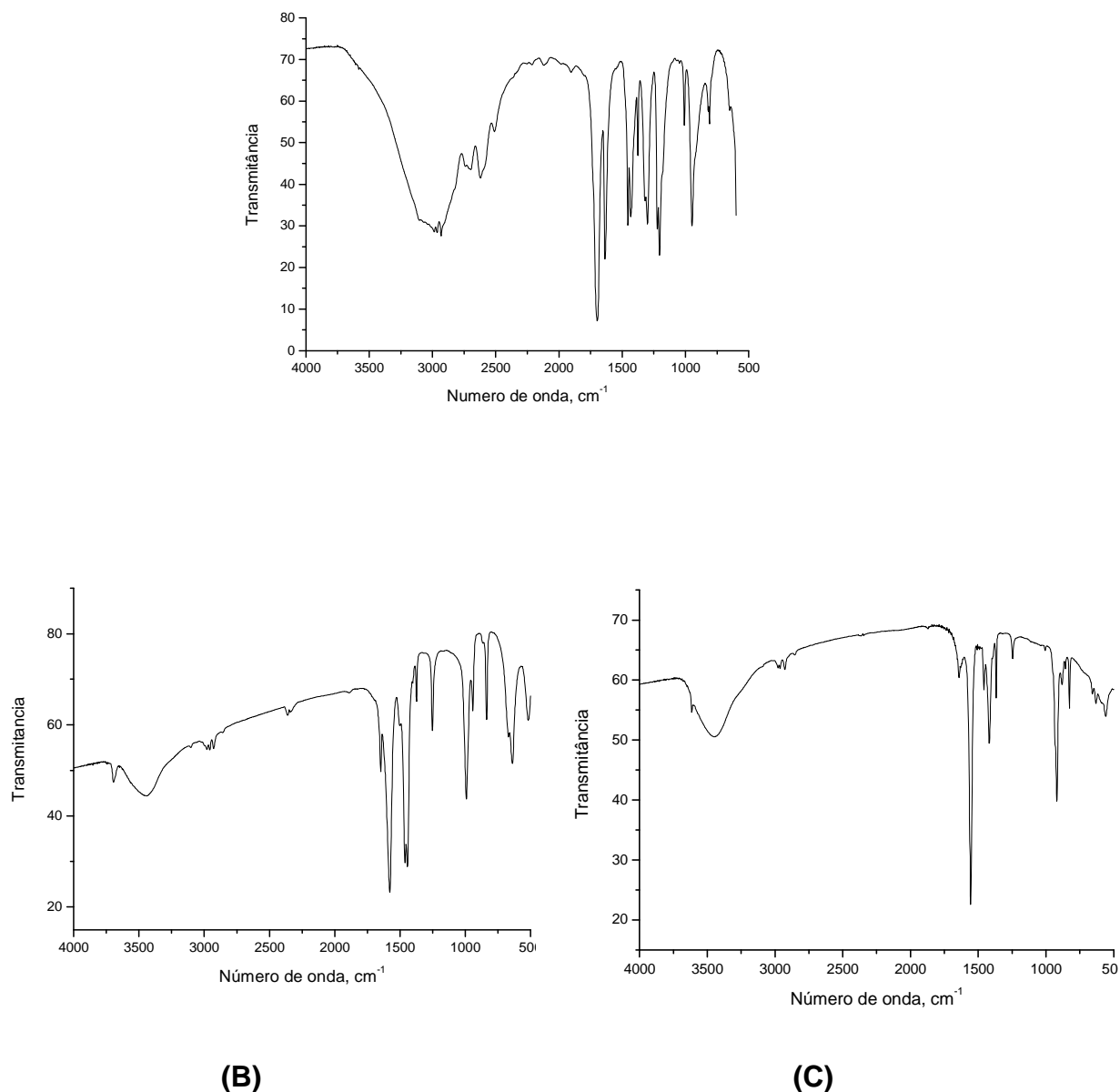


Figura 18. Registros dos espectros no IV. MF (A), MF-Al³⁺ (B) e MF-Cu²⁺ (C).

3.2. Estudo de interação Quercetina e Monômero Funcional

3.2.1. Avaliação dos solventes

A influência dos diferentes solventes na interação entre Quer e MF-Mⁿ⁺ estão ilustradas nas Figuras 19A a 19D, as quais apresentam os espectros de absorção na região do UV-VIS em metanol, acetonitrila, acetonitrila:DMSO e acetona, respectivamente. Pode-se observar duas bandas de absorção características da molécula de Quer sendo uma com um máximo de absorção em 372 nm que

corresponde a transição eletrônica π - π^* do grupo 3',4'-dihidroxil (anel B) e a outra com um máximo de absorção em 256 nm (anel A)⁵⁸ (Figura 16, seção 1). Na maioria dos solventes (exceto em acetona) as duas bandas foram observadas, sendo que apenas em metanol foi observada a formação do complexo entre Quer e MF-Mⁿ⁺ em comparação com o MF (monômero controle), evidenciado pelo aparecimento da banda de absorção em 430 nm.

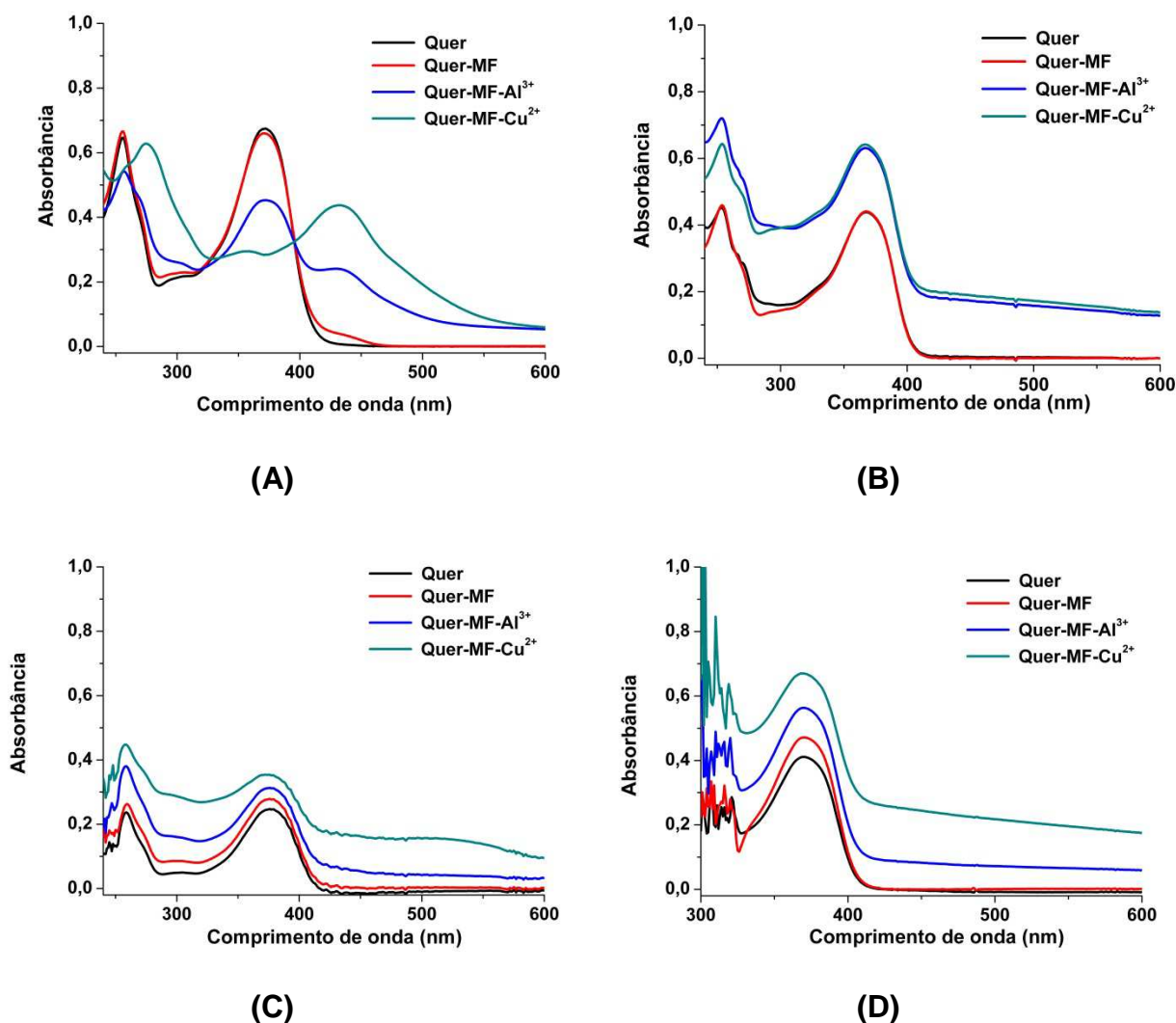


Figura 19. Espectros UV-Vis em metanol (A), Acetonitrila (B), Acetonitrila : DMSO (C) e Acetona (D).

A formação do complexo metal-ligante ocorreu devido ao compartilhamento dos pares de elétrons disponíveis dos átomos de oxigênio presentes na estrutura química da Quer que apresenta um comportamento de agente quelante. Ao compartilhar os elétrons disponíveis do átomo de oxigênio (base de Lewis) com os

íons metálicos Al^{3+} ou Cu^{2+} disponíveis no MF (ácido de Lewis) ocorreu à formação de um complexo quelato que proporciona um desvio batocrômico (deslocamento da banda para comprimento de onda maior).

Na Figura 19A, verifica-se o desvio batocrômico de 372 nm para 430 nm da interação entre Quer-MF- Al^{3+} e Quer-MF- Cu^{2+} em metanol. Observa-se uma diminuição da intensidade da banda em 372 nm e um aumento na intensidade da banda em 430 nm, sendo mais pronunciado para Quer-MF- Cu^{2+} . O deslocamento batocrômico (256 nm para 275 nm) da banda do anel (A) também foi verificado em presença dos MF- M^{n+} .

Nas Figuras 19B e 19C, nenhuma mudança espectral das bandas específicas da Quer foi observada pela interação com os monômeros funcionais. Em relação ao estudo de interação em acetona (Figura 19 19D), verifica-se apenas uma banda de absorção em 372 nm (Anel B) da Quer. Nesse solvente não foi possível observar banda em 256 nm (Anel A) devido à absorção da acetona em comprimentos de onda menores que 300 nm, como mostra a Figura 19D. Ainda, observa-se que não houve formação do complexo com nenhum dos monômeros funcionais em acetona.

De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que o efeito de solvatação⁵ dos diferentes solventes (acetona, acetonitrila e acetonitrila : DMSO) inibiu a formação do complexo quando comparado ao metanol. Portanto, o metanol foi selecionado como solvente porogênico para dar sequência nos estudos.

3.2.2. Estudo cinético

A primeira etapa para a síntese do MIP é a interação entre a MM e o MF, que dependendo do solvente utilizado pode exigir tempo muito longo para atingir o equilíbrio químico. Para verificar o tempo de interação para formação do complexo entre Quer e MF- M^{n+} em metanol foram realizados estudos cinéticos, conforme descrito na seção 2.4.2. A seguir, são apresentados os espectros no UV-VIS obtidos nos diferentes tempos (Figuras 20A a 20C).

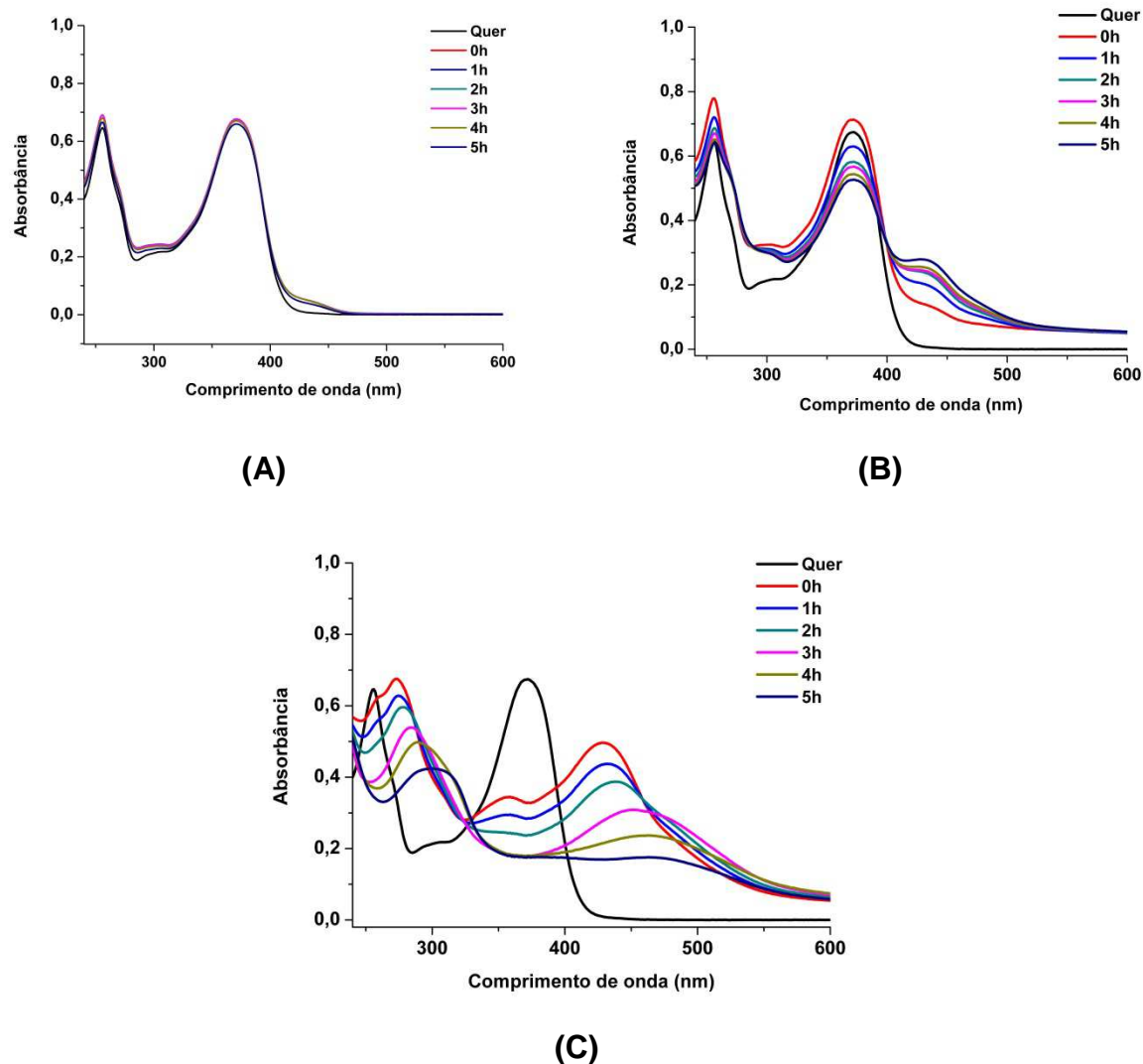


Figura 20. Espectros UV-Vis em metanol: Quer-MF (A), Quer-MF-Al³⁺ (B), Quer-MF-Cu²⁺ (C).

Para o MF (Figura 20A) não houve variação perceptível no espectro de absorção referente à interação entre Quer e MF, no período de 5 horas. Entretanto, interações entre Quer-MF baseada em ligações de hidrogênio podem ter se formado, as quais não são visualizadas por espectrofotometria na região do UV-VIS. Para MF-Al³⁺ (Figura 20B) constatou-se o surgimento da banda em 430 nm que corresponde ao complexo formado no momento da mistura dos reagentes. Após, duas horas de interação entre Quer e MF-Al³⁺ observou-se a estabilização do complexo formado.

No ensaio entre Quer com MF-Cu²⁺, o deslocamento das bandas 256 nm e 372 nm foram mais pronunciados (Figura 20C) com o aparecimento do deslocamento

batocrômico desde o primeiro momento da interação resultando na formação do complexo Quer-MF-Cu²⁺. Após cinco horas de interação observou-se o desaparecimento da banda em 372 nm e 430 nm, provavelmente devido à inibição da formação do complexo ou pela competição com o íon metacrílico (C₃H₅COO⁻)⁷³ ou mesmo a degradação da Quer. Outro fato que pode ser salientado foi que o MF-Cu²⁺ também interagiu com os grupos funcionais do anel (A) da Quer, fato observado pelo deslocamento batocrômico de 256 nm para 274 - 304 nm.

Diante dos resultados apresentados, selecionou-se o tempo de duas horas no ultra-som para promover a interação entre Quer e os monômeros funcionais (MF, MF-Al³⁺ e MF-Cu²⁺) para dar continuidade nos estudos.

3.2.3.Efeito da concentração da quercetina

Os estudos de interação dos monômeros funcionais com diferentes quantidades de Quer foram realizados a partir das concentrações descritas na seção 2.4.3. e o tempo de interação de 2 h no ultra-som definido na seção 3.2.2.

A Figura 21A ilustra os espectros resultantes da interação entre MF e Quer em diferentes proporções, onde observa-se um aumento nas intensidades das bandas em 256 nm (anel A) e 372 nm (anel B), sendo diretamente proporcional ao aumento da concentração de moléculas de Quer. Isso já era esperado, uma vez que MF não apresenta íons metálicos em sua composição para interagir com a MM e não proporciona o deslocamento das bandas específicas da molécula.

Na Figura 21B, observa-se um pequeno deslocamento batocrômico de 372 nm para 430 nm em quantidades superiores a 1 mmol de Quer, não sendo tão nítido o deslocamento da banda. Uma possível explicação para o menor deslocamento obtido é o fato das concentrações ensaiadas de Quer, com exceção do nível mais alto, e da concentração de MF-Al³⁺ terem sido menores que na seção anterior.

Na Figura 21C, verifica-se a formação do complexo (Quer-MF-Cu²⁺) em todas as proporções avaliadas. Observa-se que o desvio batocrômico ocorreu nas duas bandas de absorção (256 nm e 372 nm) sendo mais pronunciado o deslocamento das

bandas quando a interação ocorreu entre Quer-MF-Cu²⁺ do que em relação a Quer-MF-Al³⁺ (Figura 21B).

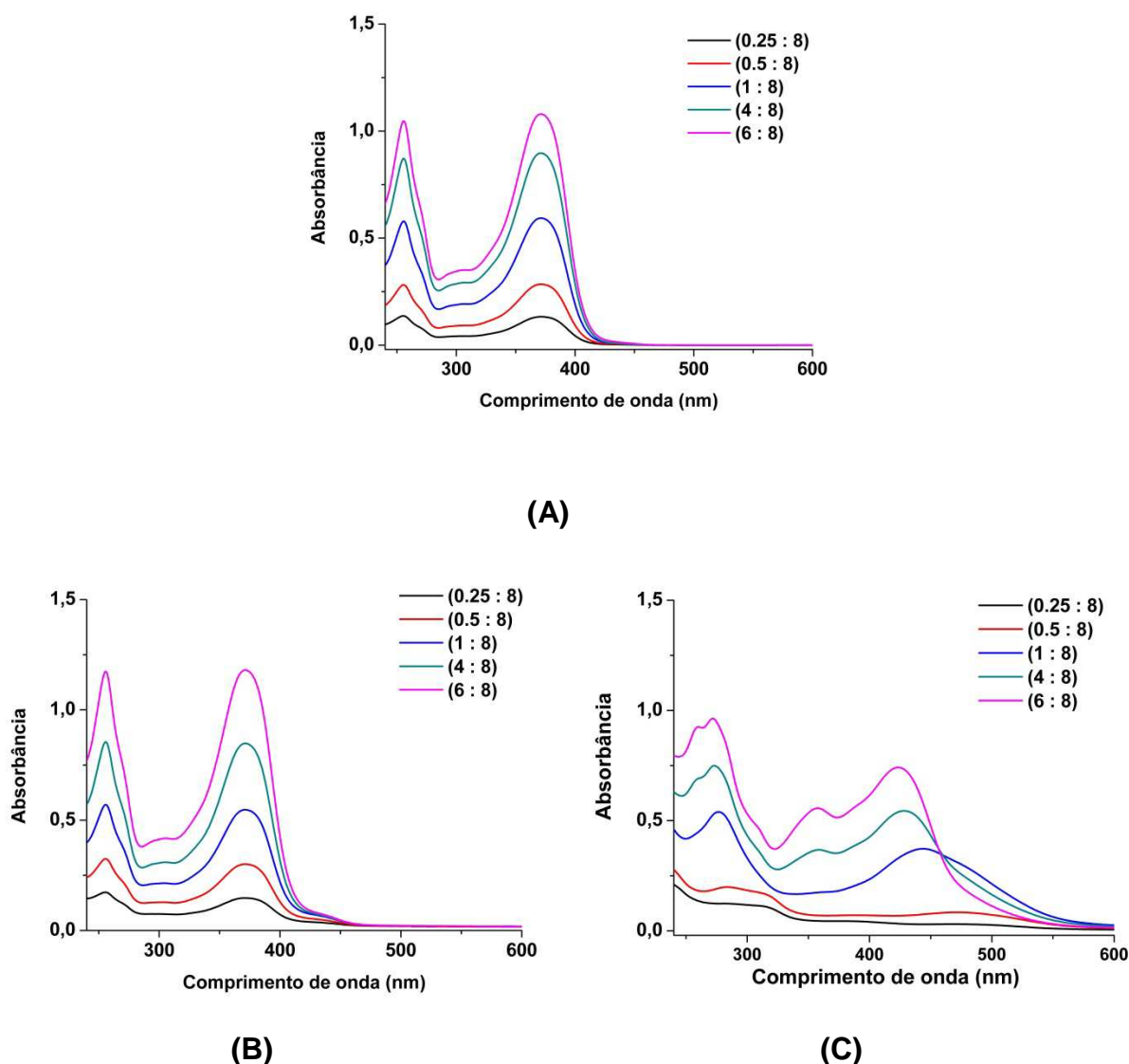


Figura 21. Espectro de absorção UV-Vis da mistura de Quer e o MF com a concentração fixa de MF em diferentes concentrações de Quer em mmol. (A) Quer:MF (B) Quer : MF-Al³⁺ e (C) Quer : MF-Cu²⁺.

3.2.4. Efeito da concentração do monômero funcional

Como o MF-Cu²⁺ já apresentou uma alta interação na proporção de Quer:MF-Cu²⁺ (1:8) decidiu-se manter essa condição para esse monômero e estudar a variação da proporção apenas para MF-Al³⁺. As proporções de Quer:MF-Al³⁺ (1:4), (1:8), (1:12)

foram avaliadas, mantendo-se sempre a quantidade de monômero em excesso com relação a MM de acordo com a literatura.^{74,108}

Para esta etapa decidiu-se trabalhar com as mesmas concentrações estudadas na seção 2.4.1, $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Quer e $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de monômeros funcionais as quais permitiram obter bandas de absorção mais nítidas para a formação do complexo (Quer-MF- Al^{3+}). Mesmo estabelecido o tempo de 2 h na seção 3.2.2., propôs-se nesta etapa estudar novamente o tempo até 5 h para garantir toda a interação entre Quer e o excesso do MF. As Figuras 22A a 22C mostram os respectivos espectros UV-Vis nas proporções descritas no parágrafo anterior.

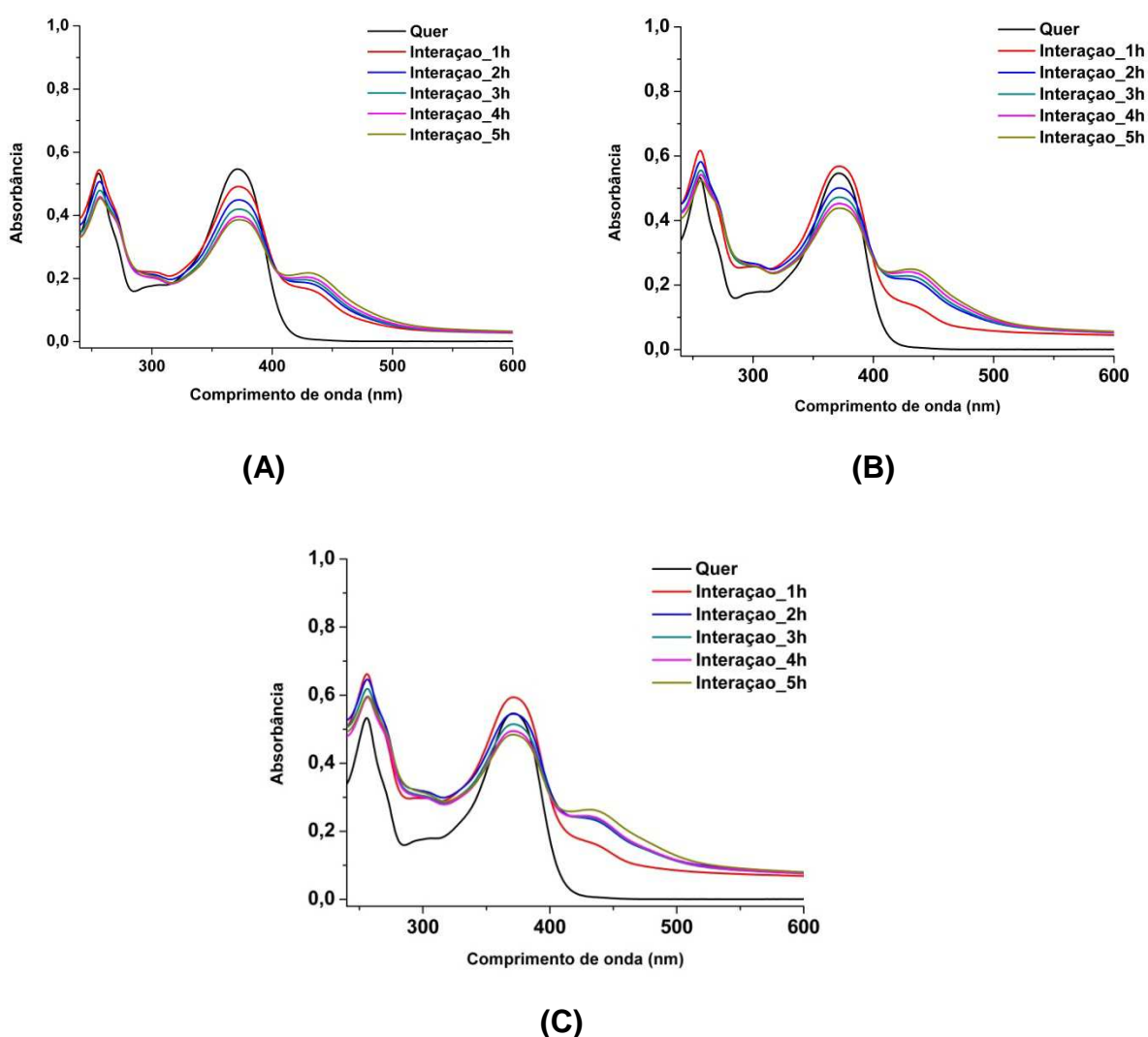


Figura 22. Espectro de absorção UV-Vis da interação Quer e MF- Al^{3+} nas proporções (1:4) (A), (1:8) (B) e (1:12) (C) nos tempos de interação.

Pode-se verificar nas Figuras 22A, B e C que existe similaridade nos espectros gerados e que não houve o deslocamento da banda de 256 nm que corresponde às transições eletrônicas no anel A da molécula de Quer. Notou-se uma mudança espectral na banda referente ao anel B em 372 nm, que diminuiu sua intensidade e o aparecimento da banda em 430 nm (deslocamento batocrômico), sugerindo a interação Quer-MF-Al³⁺, como verificado nas etapas anteriores.

A Figura 23 apresenta um gráfico (absorbância vs tempo), que foi gerado a partir dos espectros de absorção da interação Quer e MF-Al³⁺ nas proporções avaliadas. Para construção do gráfico selecionou-se o comprimento de onda de 430 nm que corresponde ao máximo da banda do complexo formado em relação ao tempo de interação. Pode-se verificar que as proporções (1:8) e (1:12) (mmol) apresentaram valores de absorbância próximas no tempo de 2 horas de interação, sendo inferior para a proporção 1:4 (mmol). Portanto, a proporção (1:8 mmol) foi escolhida como uma condição apropriada para a realização da síntese do MIP.

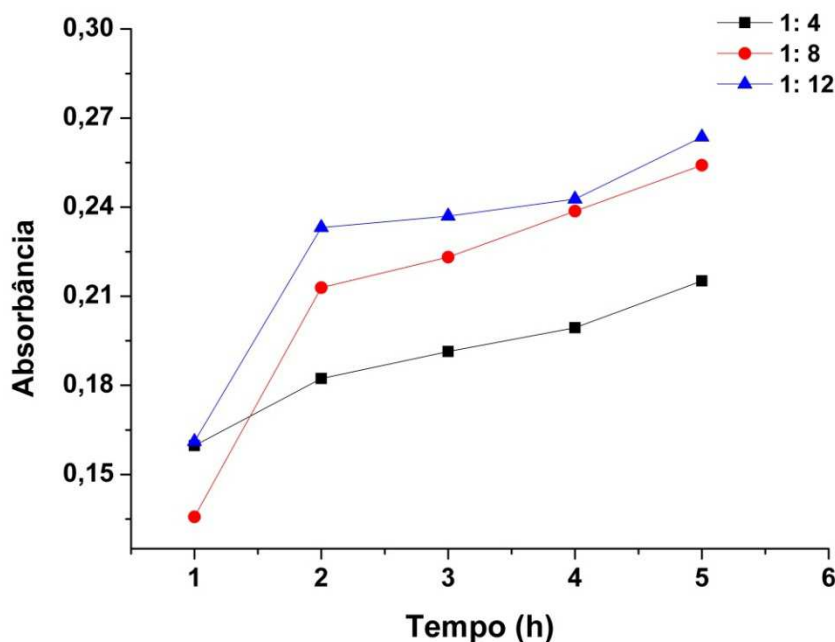


Figura 23. Estudo de interação Quer e MA-Al³⁺ em meio metanólico em três diferentes proporções (1:4), (1:8) e (1:12).

Observa-se ainda na Figura 23 que nas proporções de 1:8 e 1:12 o único aumento significativo na absorbância ocorreu na mudança de 1 para 2 horas. Após 2

horas ainda observa-se uma tendência crescente, mas que não foi considerada significativa.

A partir destes estudos de interação entre Quer e monômero funcional foram definidos os parâmetros envolvidos para a síntese do polímero impresso. Nesse sentido, selecionou-se o metanol como solvente porogênico, tempo de interação entre Quer e monômero funcional de 2 horas e proporção (1:8) (mmol) de MM:MF. Com relação à escolha do MF foi decidido avaliar a síntese empregando os três monômeros funcionais (MF, MF-Al³⁺ e MF-Cu²⁺).

3.3. Síntese do polímero impresso molecularmente

Com as condições experimentais definidas na seção 3.2.1 a 3.2.4, realizou-se a síntese dos polímeros impressos (MIP, MIP-Al³⁺ e MIP-Cu²⁺). Detalhes da composição/quantidade dos reagentes foram descritos na Tabela 1 (seção 2.5). Os polímeros controles (NIP, NIP-Al³⁺ e NIP-Cu²⁺) também foram sintetizados seguindo o mesmo procedimento, mas sem a presença da MM.

Os polímeros MIP e MIP-Al³⁺ (Figura 24) apresentaram cor amarela, sendo mais intensa para o polímero contendo o MF-Al³⁺. Esta diferença na coloração provavelmente ocorreu devido à formação do complexo (Quer-Al³⁺), não sendo observado para o polímero baseado no MF sem íons metálicos. Foi verificado que tanto o NIP como o NIP-Al³⁺ apresentaram coloração branca devido à ausência da MM.

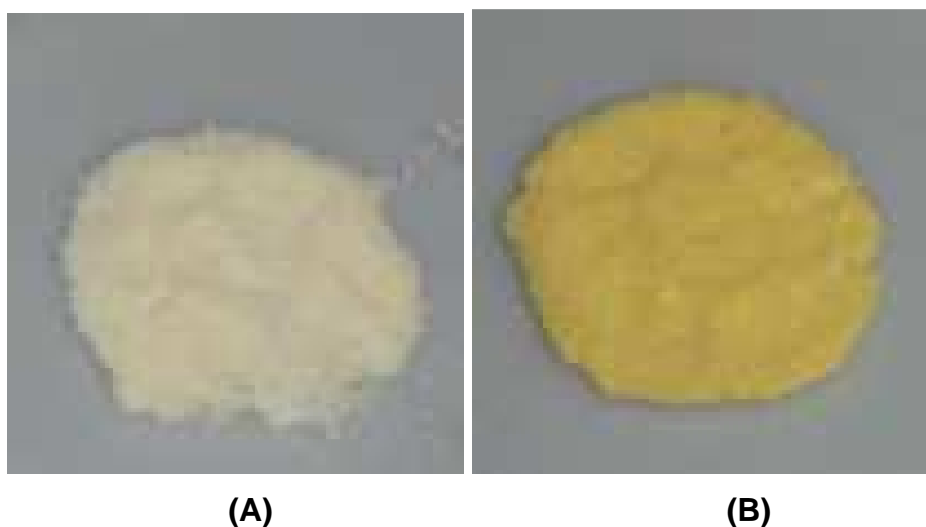


Figura 24. Fotografias dos polímeros MIP (A) e MIP-Al³⁺ (B).

Durante a síntese do MIP-Cu²⁺ verificou-se que não ocorreu a polimerização desejada, pois observou-se a formação de um líquido viscoso de coloração preta. Sugere-se que esta coloração pode ser resultado da reação química do Cu²⁺ com os átomos de oxigênio presentes na molécula de Quer, o que gerou, possivelmente, a formação do óxido de cobre (CuO).¹¹⁷ O polímero controle (NIP-Cu²⁺) também apresentou polimerização incompleta, mas de coloração azul devido à presença do MF-Cu²⁺ e ausência da Quer. Portanto não foi possível prosseguir o estudo com MIP-Cu²⁺.

Após obtenção dos polímeros (MIP e MIP-Al³⁺) e seus respectivos polímeros controle, os mesmos foram macerados e peneirados, até granulometria inferior a 53 µm. Para a realização do procedimento de remoção da MM, 50 mg dos polímeros impressos foram colocados separadamente em seringas de 3,0 mL e lavados várias vezes com solução metanol:ácido acético glacial (9:1). Para verificar a eficiência da remoção da MM, alíquotas do eluato foram coletadas e lidas no espectrofotômetro UV-VIS até não ser detectada presença do analito.

Os espectros obtidos para o MIP (Figura 25A), mostraram que após a quinta adição de 5 mL da solução metanol:ácido acético (9:1), não foi detectada a MM no MIP, sendo comprovada pelo desaparecimento das bandas em 256 nm (anel A) e 372 nm (anel B). Esse resultado indica a remoção eficiente da MM do MIP, ao menos até o limite de sensibilidade do espectrofotômetro UV-Vis. Contudo, para o MIP-Al³⁺, após exaustivas lavagens com a mesma mistura (Figura 25B), cerca do dobro da usada no MIP, ainda pode-se notar a detecção da molécula de Quer para o MIP-Al³⁺, isto possivelmente se deve à forte ligação entre MF-Al³⁺ e Quer. Portanto, a mistura metanol:ácido acético glacial (9:1) foi eficiente apenas para o MIP, já para o MIP-Al³⁺ esta mistura não conseguiu eluir completamente a MM. Além disso, pelos ensaios de FRX/EDX ficou evidente que a solução empregada na remoção da MM também não era adequada, pois promoveu a retirada de 79,2 % e 95,4 % dos íons Al³⁺ aderidos ao NIP-Al³⁺ e MIP-Al³⁺, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 3.

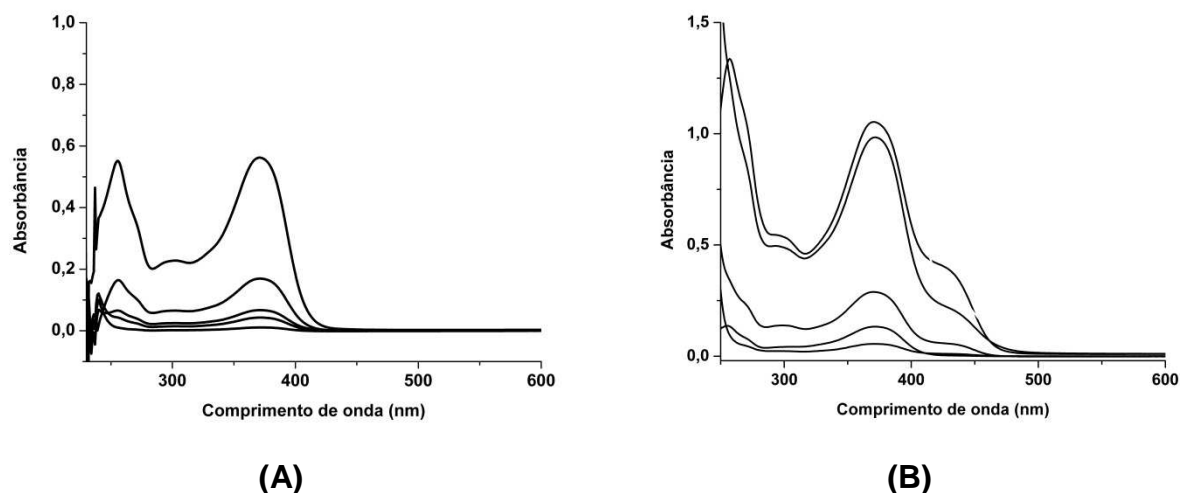


Figura 25. Espectros UV-Vis obtidos após remoção das MM do MIP (A) e MIP-Al³⁺ (B) com mistura metanol : ácido acético (9:1).

Tabela 3. Resultados da análise de FRX/EDX dos polímeros com íons Al³⁺.

Polímeros	Íon Al (%)
*NIP-Al ³⁺	100,0
NIP-Al ³⁺	20,8
*MIP-Al ³⁺	95,5
MIP-Al ³⁺	4,4

* antes do procedimento de remoção da MM.

Diante dos resultados obtidos, outros solventes foram avaliados para remover a MM do MIP-Al³⁺ e ao mesmo tempo manter os íons metálicos incorporados nas cavidades do MIP-Al³⁺ para disponibilizá-los, posteriormente, na etapa de extração.

As soluções e solventes escolhidos foram ácido acético (0,5 mol L⁻¹), ácido nítrico (0,5 mol L⁻¹), hidróxido de sódio (0,5 mol L⁻¹), tampão acetato de sódio (0,01 mol L⁻¹) em pH 4,5 e tampão fosfato de sódio (0,01 mol L⁻¹) pH 7,5 e 8,5, acetona, metanol e acetonitrila.

Foi verificado que mesmo após exaustivas lavagens com as soluções/solventes avaliados na remoção da MM, altas concentrações da Quer ainda foram detectadas no espectrofotômetro UV-Vis, com exceção das soluções tampão em pH 4,5; 7,5 e 8,5. Portanto, decidiu utilizar misturas das soluções tampão e metanol, conforme procedimento descrito na Tabela 2 (seção 2.5.1). O metanol foi escolhido

por ser o solvente ideal para solubilizar a Quer. As misturas testes usadas foram soluções de acetato de sódio pH 4,5 : metanol, tampão fosfato de sódio pH 7,5 :metanol e tampão fosfato de sódio pH 8,5 : metanol, todos na proporção (50:50).

Antes de executar a etapa de remoção da MM dos polímeros usando um cartucho de SPE foram realizados ensaios com o MIP-Al³⁺ em frascos com tampa sob agitação e foi empregado um maior tempo de contato para verificar se as misturas testes eram adequadas para remover a MM da cavidade e manter os íons Al³⁺ aderidos ao polímero. Primeiramente, foram colocados 50 mg do MIP-Al³⁺ em três frascos com tampa e adicionado a cada um 5 mL das misturas teste. Em seguida os frascos foram lacrados e deixados sob agitação constante por uma hora. Após o tempo determinado, a solução foi filtrada e as alíquotas foram lidas no espectrofotômetro UV-Vis.

A Figura 26 mostra os espectros obtidos após contato do MIP-Al³⁺ com as misturas testes. Observou-se que a mistura tampão pH 7,5:metanol (50:50), proporcionou a remoção da Quer com o íon metálico, pois notou-se no espectro um deslocamento para comprimento de onda inferior em relação a banda de Quer (desvio hipsocrômico, 372 nm para 325 nm) e um pequeno deslocamento para λ superior (desvio batocrômico, 372 nm para 382 nm). Fato também observado para a banda com máximo em 256 nm com desvio batocrômico. Observa-se que nessas soluções foram obtidos deslocamentos de bandas diferentes dos apresentados na Figura 20 da seção 3.2.4. Essas diferenças se devem às mudanças das condições de pH do meio.

A mistura de tampão pH 8,5:metanol (50:50) também apresentou um deslocamento da banda de Quer com desvio hipsocrômico mais pronunciado na banda de 372 para 325 nm. Assim, pelos resultados obtidos há evidência de que tanto as misturas de metanol em tampão pH 7,5 e pH 8,5, proporcionaram a remoção da Quer com o íon metálico, o que impossibilita sua aplicação na remoção da MM do MIP-Al³⁺.

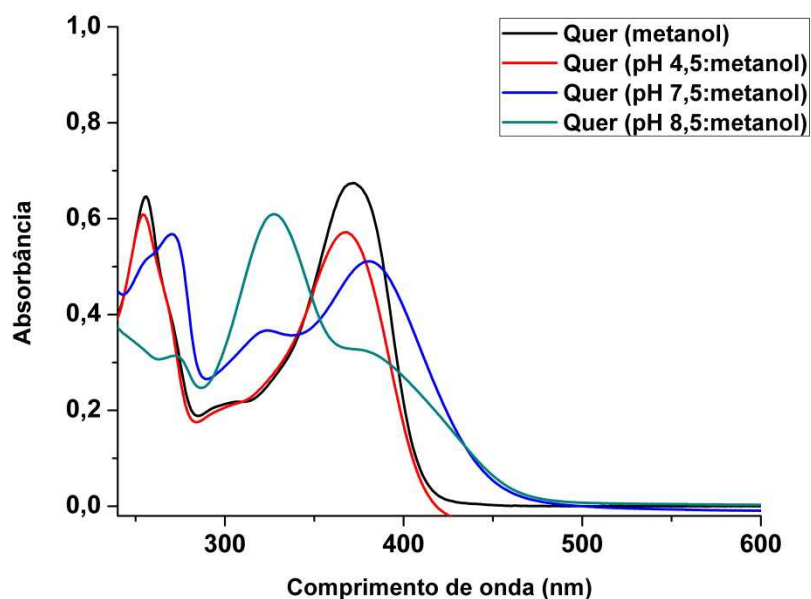


Figura 26. Espectro de Quer em diferentes misturas de solução tampão e metanol.

No ensaio com a mistura tampão pH 4,5:metanol (50:50), não foi verificada nenhuma mudança perceptível no espectro de absorção da Quer, pois a banda em 256 nm e 372 nm manteve-se constante quando comparada ao espectro da Quer em metanol puro, o que indicava que esta mistura, possivelmente, seja a mais adequada para remoção apenas da Quer. Logo, a solução tampão pH 4,5:metanol que apresenta um meio levemente ácido, provavelmente provocou um aumento na concentração de H^+ do meio e esse excesso do H^+ competiu com os íons metálicos adsorvidos no polímero. Verifica-se pelo espectro (linha vermelha) da (Figura 26) que a molécula de Quer foi eliminada da cavidade do polímero e manteve-se os íons Al^{3+} no polímero, pois não foi verificado deslocamento batocrômico indicando a formação do complexo.

Deste modo, selecionou-se para esta etapa de remoção da MM do $MIP-Al^{3+}$ a mistura de metanol : tampão acetato de sódio pH 4,5 na proporção (50:50, v/v). Também decidiu-se avaliar na proporção (75 : 50, v/v) e foram realizados dois procedimentos de remoção, sendo o tradicional passando a solução através da seringa contendo $MIP-Al^{3+}$ e utilizando o sistema Soxhlet (Tabela 2, seção 2.5.1), cujo intuito foi avaliar a eficiência da remoção da MM e que mantivesse a maior proporção de íons Al^{3+} no polímero.

As alíquotas coletadas após percolação das misturas selecionadas pelo cartucho contendo $MIP-Al^{3+}$ foram submetidos à leitura no espectrofotômetro UV-Vis.

Em todos os ensaios ainda foram detectados traços de Quer. Ao submeter novamente os mesmos polímeros ao procedimento de lavagem no dia seguinte, ainda foram detectados traços de Quer. Estes resultados mostraram que nenhuma das misturas avaliadas garantiram a total eliminação da MM do MIP-Al³⁺. Pelos resultados obtidos de FRX/EDX, Tabela 4, pode-se observar que em torno de 75 % de Al³⁺ ainda permaneceram ligados ao MIP-Al³⁺ nos ensaios 1, 2 e 3, quando comparado ao MIP-Al³⁺ que não passou pelo processo de remoção da MM (polímero controle).

Tabela 4. Resultados obtidos para os teores de alumínio no MIP-Al³⁺ após os diferentes procedimentos de lavagem utilizando a técnica de FRX/EDX.

Ensaio	Solução de lavagem/ proporção/ procedimento	Al (%)
Controle	Sem lavagem	100,0
1	CH ₃ OH: tampão pH 4,5 (50:50)	73,9
2	CH ₃ OH: tampão pH 4,5 (50:50) e ácido acético: metanol (1:20)	77,4
3	CH ₃ OH:tampão pH 4,5 (75:25) com soxhlet por 12 h	78,7
4	CH ₃ OH:tampão pH 4,5 (75:25) com soxhlet por 12 h + ácido acético:metanol (1:20)	50,5

Diante dos resultados obtidos não foi obtido êxito na remoção da MM do MIP-Al³⁺ em todos os procedimentos testados. Logo, considera-se que o MIP-Al³⁺ sintetizado não apresentou o comportamento esperado e que o mesmo não é viável para prosseguir o andamento da pesquisa. Portanto, decidiu-se dar continuidade nos estudos apenas com a utilização do MIP e NIP, sendo investigada a caracterização, a capacidade adsorptiva e a seletividade destes polímeros.

3.4. Caracterização da síntese

Para investigar a morfologia do MIP e NIP, os mesmos foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 27 ilustra as imagens dos polímeros com aumento de 1.000 e 10.000 vezes.

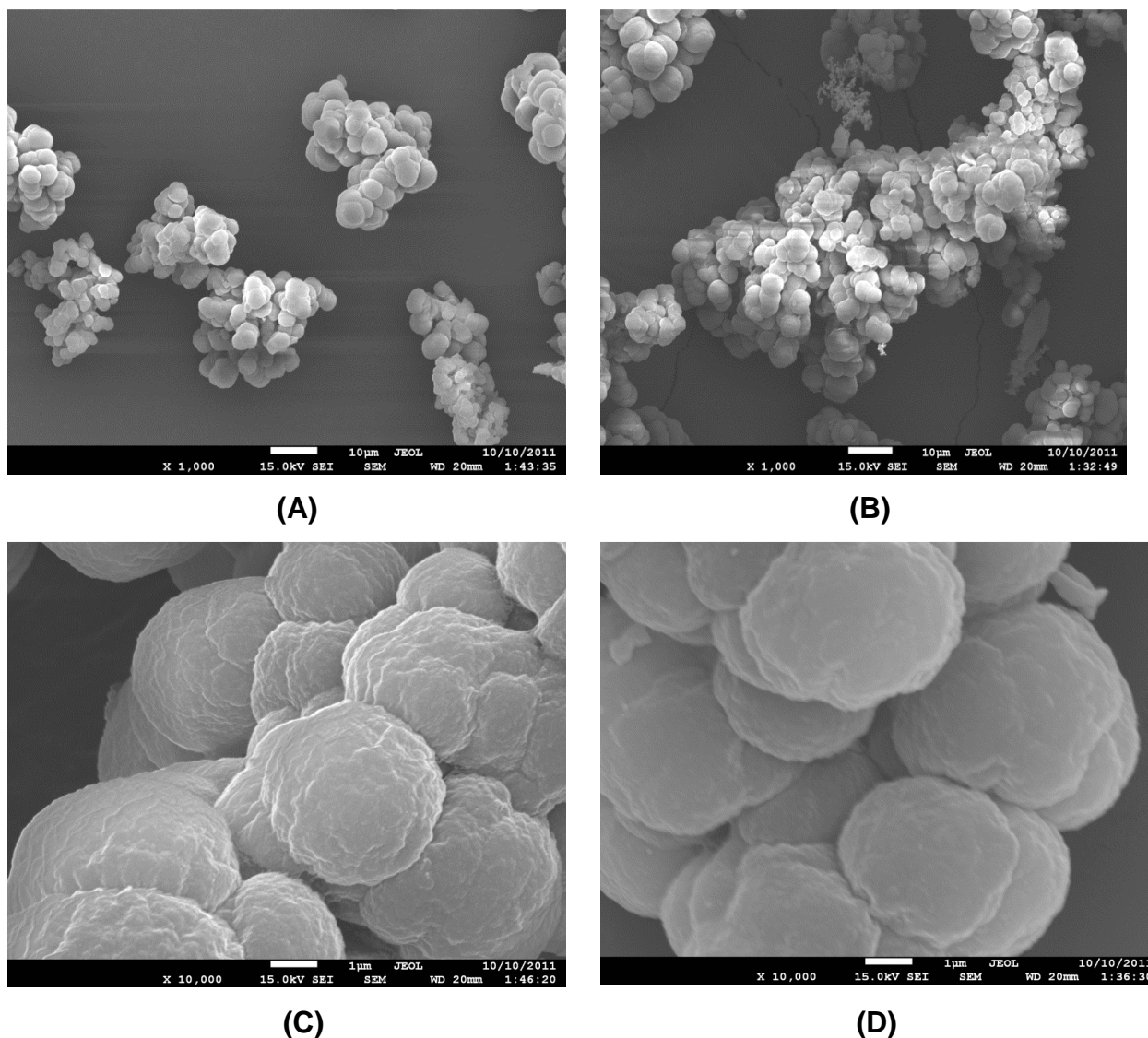


Figura 27. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e NIP (B) com aumento de 1.000 vezes e MIP (C) e NIP (D) com aumento de 10.000 vezes

Conforme pode ser visualizado nas Figuras 27A e 27B (aumento de 1.000 vezes), tanto o MIP quanto o NIP, respectivamente, apresentou homogeneidade no tamanho das partículas e formas arredondadas. Já nas Figuras 27C e 27D, apreciáveis porosidades superficiais são observadas em ambos polímeros. Portanto, estas imagens revelam uma diferença significativa se comparadas com as sínteses já estudadas na literatura que empregaram outros tipos de solventes, como por exemplo, acetonitrila, acetona,⁷⁸ tetrahidrofurano¹¹⁶ e N,N-dimetilformamida¹¹⁸ na polimerização, exibindo polímeros com estruturas irregulares,¹¹⁶ mais densos^{116,78} e com pequenos poros^{78,116} quando comparadas ao MIP e NIP obtidos no presente estudo.

Os resultados obtidos para a área superficial, volume e diâmetro dos poros pelo método BET e BJH são descritos na Tabela 5. Observa-se que o MIP apresentou área superficial e volume de poros maiores que do NIP. Foi observado que em relação ao diâmetro médio dos poros nenhuma variação significativa foi evidenciada entre o MIP e o NIP.

Tabela 5. Porosimetria do MIP e NIP, em metanol.

Sínteses	MIP	NIP
Área superficial (m ² /g)	97,092	64,538
Volume de poros (cm ³ /g)	0,185	0,103
Diâmetro médio dos poros (nm)	1,7078	1,6806

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)¹¹⁹ a distribuição do diâmetro dos poros dos materiais sólidos podem variar em distintas faixas: macroporosos (50 a 1000 nm), mesoporosos (2 a 50 nm) e microporosos (0,6 a 2 nm). Em relação à área superficial dos polímeros impressos com Quer, a literatura descreve uma área compreendida entre 200 a 334 m²/g.⁷⁷ Entretanto, os resultados obtidos na Tabela 5 mostram que as áreas superficiais de ambos os polímeros são inferiores ao descrito na literatura (< 100 m²/g) e que podem ser considerados microporosos (< 2 nm). Provavelmente, estas características foram adquiridas devido à quantidade e natureza do solvente usado (metanol), e a porcentagem de monômero funcional empregado nas sínteses, sendo estes fatores responsáveis pelo controle do tamanho e a distribuição dos poros do polímero o que mostra que os polímeros obtidos apresentam características diferentes das descritas na literatura.

Em relação à caracterização estrutural dos polímeros, os espectros de FTIR obtidos em pastilhas de KBr, são mostrados na Figura 28. Observa-se que os espectros do MIP e NIP apresentaram uma banda em 3458 cm⁻¹, atribuída à vibração de estiramento do grupo O-H referente ao COOH monomérico do MF (ácido metacrílico). As duas bandas em 2949 e 3000 cm⁻¹ referem-se à vibração de estiramento C-H e OH do grupo alceno e do ácido carboxílico, respectivamente,

atribuídas ao MF. A banda em 1740 cm^{-1} indica o estiramento C-O do grupo éster presente no LC (EGDMA). As bandas nas faixas 1480 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} e 960 cm^{-1} podem ser atribuídas aos grupos alquil (C-H) e vinil (C=CH₂) presentes no LC e MF.

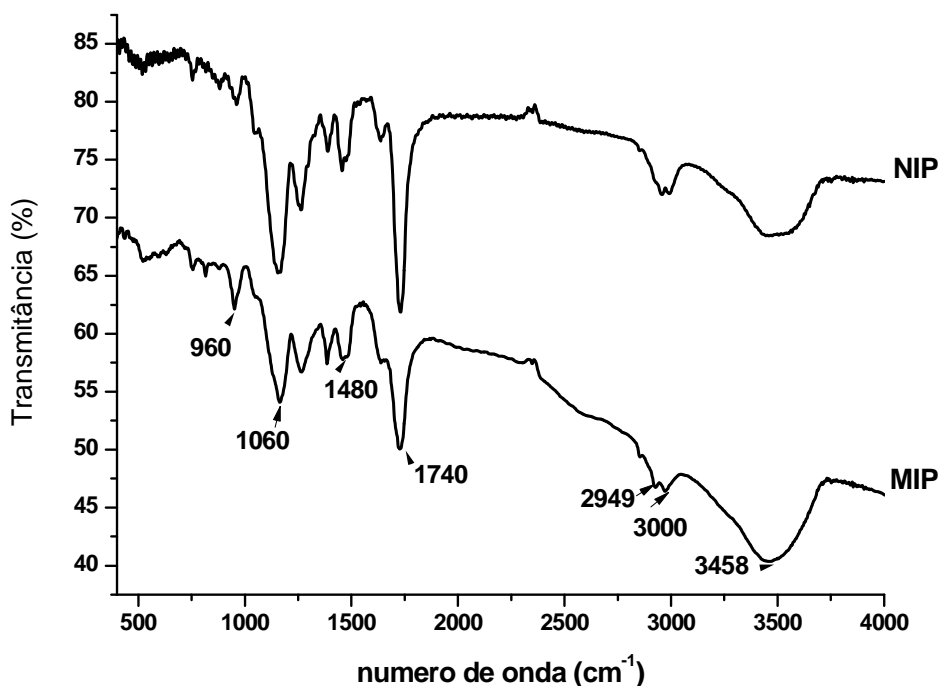


Figura 28. Espectro de FTIR para o MIP e NIP em pastilhas de KBr.

Diante dos espectros analisados observa-se que as sínteses do MIP e NIP apresentam pequenas diferenças na intensidade dos picos de absorção na região do espectro entre 750 a 3500 cm^{-1} , e que nenhuma mudança pode ser verificada na composição química dos polímeros através do FTIR. Estes resultados eram esperados devido à mesma forma de preparo das sínteses e apenas a ausência da MM que foi inserida no preparo do MIP, mas que foi removida na etapa de lavagem conforme os resultados dos espectros UV-Vis apresentado na Figura 25A.

3.5. Estudo do desempenho da adsorção

O estudo de adsorção, conforme descrito na seção 2.7, foi realizado com o intuito de verificar a capacidade de reconhecimento molecular da Quer pelos MIP e NIP após 2 horas de agitação constante.

Na Tabela 6, observa-se que a adsorção do analito pelo MIP foi 53 % maior do que o obtido no NIP, provavelmente devido ao efeito da memória da molécula e do solvente metanol que foi empregado na etapa de preparo da síntese. De acordo com Caro et al.,¹²⁰ a adsorção da molécula é favorecida quando o ambiente da síntese é reproduzido. Na Tabela 6, destaca-se também o fator de impressão IF (definido pela razão da resposta MIP versus NIP) que neste estudo foi de 2,1, comprovando que a eficiência de adsorção do MIP pela Quer foi o dobro em relação ao NIP.

Entretanto, verificou-se que uma considerável adsorção pelo NIP foi obtida, isto pode ser devido aos sítios não específicos da ligação que são originados do excesso de monômero funcional durante o processo de síntese. Pode-se verificar ainda que o NIP apresentou um maior desvio padrão em relação ao MIP e isso possivelmente seja devido à presença de sítios não específicos que tenham dificultado a reprodutibilidade desta síntese e a homogeneidade do material obtido.

Tabela 6. Avaliação da capacidade de adsorção de Quer pelas sínteses.

Síntese	Q (µg/g) ^a	IF ^b
NIP	101,1 ± 32,7	2,1
MIP	215,3 ± 7,9	

^amédias e desvios padrão de ensaios em triplicata.

^bIF = Fator de impressão (razão da resposta MIS versus NIS)

Visto que ambos os polímeros apresentaram adsorção do analito, foi realizado um estudo de isoterma de adsorção em batelada para avaliar o comportamento do MIP e NIP frente às diferentes concentrações da solução padrão de Quer.

O estudo de isoterma de adsorção em batelada foi conduzido conforme procedimento descrito na seção 2.7. Após decorrido o tempo de agitação de 24 h, as soluções foram filtradas e lidas diretamente no espectrofotômetro UV-Vis. Observou-se que não foi possível a quantificação do teor de Quer que ficou livre na solução sobrenadante devido ao aparecimento de outras bandas que se sobrepunham às bandas da Quer (Figura 29). Provavelmente, o tempo de contato da solução de Quer com o polímero possibilitou a lixiviação de subprodutos do MIP e gerou novas bandas de absorção. Portanto, decidiu-se realizar o mesmo procedimento utilizando um tempo de 2 h de contato do polímero com a Quer, sob agitação constante. Após

decorrido esse menor tempo de contato foram realizadas as leituras dos espectros UV-Vis, que apresentaram bandas diferentes das observadas para a molécula de Quer. Em seguida foram plotadas as isotermas de adsorção.

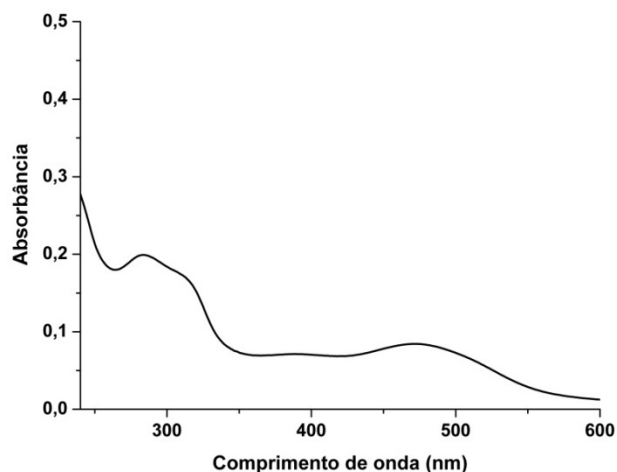


Figura 29. Espectro do subproduto gerado ao longo de 24 h de agitação entre MIP e Quer.

A Figura 30 mostra os gráficos das isotermas obtidas para MIP e NIP, respectivamente, em relação à capacidade de adsorção (Q) em $(\mu\text{g g}^{-1})$ em função da concentração de Quer livre (C_s) (mg L^{-1}) no equilíbrio.

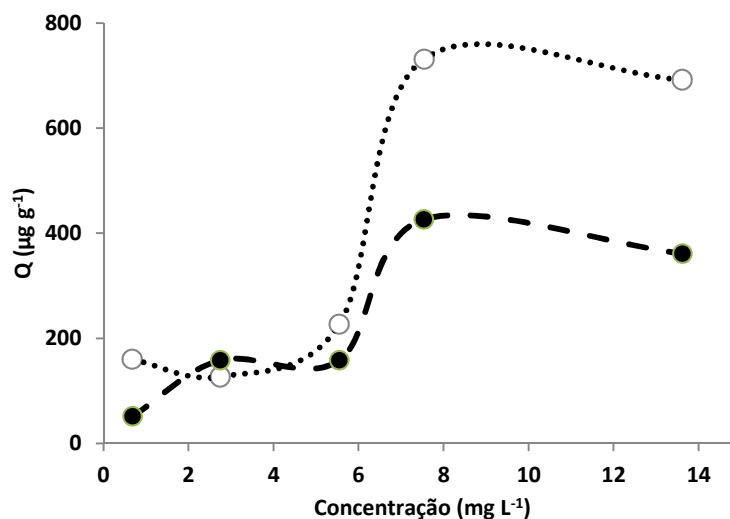


Figura 30. Isotermas de adsorção do MIP (---o---) e NIP (---●---).

No geral, existem diferentes modelos para descrever os processos de isoterma de adsorção, ou seja, compreender a natureza da ligação entre adsorbato (fase

sólida, MIP) e adsorvente (substância que adsorve na superfície do adsorbato, neste caso a Quer).

Pode-se observar que os gráficos da Figura 30, apresentaram duas regiões distintas e um mesmo tipo de perfil da curva que segue uma tendência à isoterma de sorção do tipo S (curva sigmoidal). Segundo Sposito et. al.,¹²¹ este tipo de curva apresenta no início uma interação mais forte entre os adsorbatos do que a interação entre adsorbato-adsorvente (MIP-Quer). Outra característica evidenciada é a competição do solvente com a Quer pelos sítios disponíveis do MIP. Como as características dos adsorbatos podem ser diversificadas, diferentes tipos de isotermas podem ser ajustadas a partir de modelos matemáticos. Com destaque aos modelos de Langmuir e Freundlich que são bastante usados em isotermas de polímeros impressos.¹²² Verifica-se que os resultados das isotermas dos polímeros (Figura 30) não se ajustaram adequadamente aos modelos matemáticos. Portanto, em relação aos perfis apresentados pelos gráficos da Figura 30, observa-se que a primeira região, entre 1 e 6 mg L⁻¹, sugere baixa afinidade do MIP ou NIP pela Quer, ou seja, é uma região de sub-saturação onde a concentração do analito não atingiu o equilíbrio com o polímero.

Pode-se verificar também que tanto MIP quanto o NIP apresentam capacidades de adsorção próximas quando a concentração foi inferior a 6 mg L⁻¹. Verifica-se nitidamente que a mudança no comportamento da curva ocorreu na segunda região, a partir de 8 mg L⁻¹, cuja região é de saturação, ou seja, a região de equilíbrio polímero-Quer, onde os sítios específicos e não específicos do polímero encontram-se ocupados e a concentração do analito ligado permanece aproximadamente constante. Portanto, nesta região os resultados evidenciam uma maior capacidade adsorptiva para o MIP, cujo valor de Q na região de saturação foi 52,2 % superior ao NIP (Figura 30). Este resultado mostra também que concentrações acima de 8 µg L⁻¹ promovem uma competição entre analito e solvente pelo MIP que pode dificultar as interações desejadas com o analito de interesse e pode comprometer a reprodutibilidade das análises

Vale ressaltar que as curvas exibidas pelo MIP e NIP apresentaram um perfil distinto dos polímeros impressos descritas na literatura. No geral, os polímeros impressos baseados em ácido metacrílico e em solvente aprótico apresentam

isotermas com tendência crescente, evidenciando uma afinidade entre o polímero e Quer.⁷⁷ Com base no perfil da curva de isoterma do MIP e NIP obtido, possivelmente, o uso do solvente prático na síntese pode ter comprometido as interações específicas do MIP. Contudo, decidiu-se avaliar a seletividade e reprodutibilidade dos polímeros.

3.6. Estudo de seletividade dos polímeros

A seletividade do MIP e NIP foi investigada empregando as soluções de Quer e seus análogos estruturais rutina (Rut) e morina (Mor). Neste ensaio foi usada à cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis para determinação dos analitos, detalhes do procedimento foram descritos na seção 2.8.

As curvas analíticas para Quer, Rut e Mor apresentaram comportamentos lineares no intervalo de concentração de 5 a 50 mg L⁻¹, cujas equações obtidas foram: $A = 1744[\text{Quer}] + 286,23$; $A = 1344,1[\text{Rut}] - 1084,8$ e $A = 2190,9[\text{Mor}] - 686,2$ utilizando 375, 254 e 254 nm, respectivamente. Os coeficientes de correlação foram de 0,9947; 0,9911 e 0,9980, respectivamente para Quer, Rut e Mor.

Os resultados obtidos da seletividade são mostrados na Tabela 7. Observa-se que tanto o MIP quanto o NIP apresentaram afinidade pela molécula de Quer e seus análogos, pois as concentrações dos três compostos diminuíram dos 20 mg L⁻¹ iniciais para valores de 11 a 19 mg L⁻¹ no caso do MIP. Destaque principalmente para a Mor que obteve uma elevada afinidade por ambos polímeros. Sendo a Mor uma molécula similar em tamanho e estrutura da MM (Quer) possuindo apenas uma pequena diferença em uma das posições da hidroxila ligada ao anel (B) o que provavelmente gerou uma competição com a molécula alvo. No caso da Rut a afinidade pelos sítios específicos do MIP foi menor, provavelmente devido ao grupo glicosídeo ligado ao anel C (Figura 3) que dificultou o seu acesso na cavidade.

Diante dos resultados obtidos, as informações comprovam a baixa seletividade do MIP em relação a Quer e a heterogeneidade dos polímeros sendo, portanto evidenciadas pelos desvios padrão relativamente altos. Vale destacar que, em estudos reportados na literatura com a Quer especificamente, os resultados de adsorção não apresentam informações sobre os desvios padrão, o que pode levar a interpretação de que não foram realizadas triplicatas das análises,^{77,113,115} gerando

dúvidas quanto à reprodutibilidade dos materiais poliméricos sintetizados e já reportados na literatura.

Tabela 7. Estudo de seletividade do MIP e NIP frente à Quer e seus análogos.

Sínteses	Quer		Rut		Mor	
	Cs (mg L ⁻¹)	Q ^a (µg g ⁻¹)	Cs (mg L ⁻¹)	Q ^a (µg g ⁻¹)	Cs (mg L ⁻¹)	Q ^a (µg g ⁻¹)
MIP-1	19,4	30,8	19,5	27,4	19,2	39,3
MIP-2	11,2	441,1	14,8	258,1	5,6	718,0
MIP-3	15,5	226,8	20,7	*	16,6	167,6
Média	15,3	232,9	18,3	95,2	13,8	308,4
DP	2,4	118,5	1,8	81,8	4,2	208,2
NIP-1	12,4	379,9	20,8	*	8,3	584,6
NIP-2	18,1	95,6	16,9	153,2	11,2	441,6
NIP-3	17,9	104,2	19,0	509,6	14,1	293,8
Média	16,1	193,2	18,9	68,0	11,2	441,6
DP	1,9	93,4	1,1	45,0	1,7	293,8

*sem adsorção do analito.

^a $Q = (C_0 - C_s) \times 1000V/m$, $m = 0,1$ g de massa de MIP ou NIP, $V = 0,005$ L, $C_0 = 20$ mg L⁻¹.

Para a finalização deste estudo foi empregado o teste Q no nível de 95 % de confiança para avaliar se os valores discrepantes das medidas contidas na Tabela 7 poderiam ser descartados como anomalias. Em todos os casos, verificou-se que o $Q_{\text{calculado}}$ foi menor que o Q_{Tabelado} , não sendo possível a rejeição dos valores suspeitos. Portanto, diante destes resultados ficou nitidamente comprovado que os polímeros sintetizados não apresentaram comportamento adequado para o desenvolvimento do cartucho de extração em fase sólida, pois apresentaram elevado desvio padrão e baixa seletividade, o que pode comprometer a veracidade dos resultados, principalmente se aplicados em amostras reais.

4. Considerações Finais

A síntese do monômero funcional com íons Al^{3+} e Cu^{2+} utilizando o ácido metacrílico (MF) mostrou ser um método simples e eficaz para obtenção dos MF-Al^{3+} e MF-Cu^{2+} . A caracterização por FTIR confirmou a presença dos íons metálicos na estrutura do MF-M^{n+} pela redução da banda específica do ácido metacrílico (MF).

Os estudos iniciais de interação entre quercetina e MF-M^{n+} indicaram as condições ideais para formação do complexo desejado, levando em consideração as quantidades/proporções dos principais parâmetros (solventes, tempo de interação, razão MM:MF) envolvidos na síntese do MIP. Entre os monômeros funcionais avaliados o MF-Al^{3+} formou um complexo mais estável com a quercetina em metanol quando comparado ao MF-Cu^{2+} nos solventes acetona, acetonitrila e acetonitrila : DMSO.

Os polímeros de impressão foram sintetizados a partir da presença dos monômeros funcionais (MF, MF-Al^{3+} e MF-Cu^{2+}), etilenoglicol dimetacrilato, 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila, quercetina como molécula molde e o solvente porogênico metanol obtendo os polímeros, MIP e MIP-Al^{3+} . Não foi possível a formação do MIP-Cu^{2+} devido a reatividade do Cu^{2+} na formação de CuO o que pode ter impossibilitado a formação do polímero.

Na etapa de remoção da MM do MIP e MIP-Al^{3+} a solução de ácido acético : metanol (9:1) foi eficiente apenas para o MIP. Entretanto, outras condições de remoção foram aplicadas ao MIP-Al^{3+} , diferentes soluções/solventes e procedimentos. Por fim foi confirmado a não retirada completa da molécula molde da cavidade do MIP-Al^{3+} devido as fortes ligações químicas (metal-ligante) existentes, mesmo após o exaustivo número de lavagens com CH_3OH : tampão acetato de sódio pH 4,5. Portanto, considerou-se o MIP-Al^{3+} inadequado para prosseguir as próximas etapas e apenas os polímeros não mediados por íons foram explorados.

Para avaliar a eficiência da adsorção do MIP e NIP estudos de adsorção foram realizados e ficou constado que os sítios de ligação específicos do MIP permitiram adsorção da quercetina em maior extensão quando comparada ao NIP (polímero controle) com um fator de impressão de 2,1. Em relação à isoterma de adsorção o perfil da curva segue uma tendência à isoterma de sorção do tipo S (curva sigmoidal),

cuja interação no início da adsorção, entre MIP-Quer é de menor afinidade e possivelmente também pode ter ocorrido uma competição do solvente e da quercetina pelos mesmos sítios disponíveis do MIP.

Os materiais sintetizados em metanol apresentaram afinidade tanto para a molécula alvo quanto para seus análogos estruturais, principalmente morina, evidenciando baixa seletividade a quercetina e inclusive os polímeros apresentaram elevado desvio padrão, ou seja, uma baixa precisão aos materiais. O que pode ser destacado em termos de seletividade é o tamanho da molécula molde que influencia fortemente na obtenção de um MIP. Como a quercetina é uma molécula relativamente “grande” formou sítios específicos no MIP que permitiu reter em sua cavidade além da quercetina, outros flavonóides contendo grupos similares, como por exemplo, a morina.

Por fim, outro parâmetro que pode ser levado em consideração no preparo da síntese é a escolha do solvente, que neste caso foi usado o metanol, sendo este um solvente prático pouco explorado na síntese de polímero impresso baseado em ácido metacrílico. Por ser o solvente ideal na solubilização da quercetina (MM) e por formar o complexo desejado entre MF e MM foi usado neste estudo. Possivelmente, este solvente pode ter interferido na formação das ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas envolvidas entre o analito-monômero, interferindo no tamanho e no controle dos poros. Portanto, diante das limitações, baixa seletividade e precisão conferidas aos polímeros, os mesmos não foram aplicados à amostra real.

Capítulo II - Síntese e caracterização da Sílica impressa molecularmente (MIS) mediado por íons para extração de quercetina em fitoterápico *Ginkgo biloba* L.

1. Introdução

Historicamente, desde o surgimento da síntese sol-gel, pesquisadores de diferentes áreas vêm explorando a multifuncionalidade dos materiais obtidos por este processo. Diante dos vários processos químicos existentes o PSG oferece um acesso versátil na produção dos materiais com propriedades diversificadas desde os mais simples aos mais complexos, tais como, pós, fibras, cerâmicas, monolitos.^{84,85,87}

O PSG pode ser preparado pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos com o objetivo de melhorar as propriedades físicas, químicas, mecânicas, e com isso possibilitar o controle da porosidade, cristalinidade, estabilidade térmica, resistência à ação química, entre outras.^{96,97} Portanto, este processo se torna uma elegante alternativa na obtenção de um sorvente de sílica impressa molecularmente (MIS) aplicado como SPE para determinação de quercetina em fitoterápico *Ginkgo biloba* L.

O extrato de *Ginkgo biloba* L se destaca por ser um dos medicamentos fitoterápicos de maior comercialização. O extrato contém vários princípios ativos de ação terapêutica, destaque para os ginkgoflavonóides e os terpenolactonas. A dose diária recomendada é de 80 a 240 mg de extrato padronizado sendo indicado de 2 ou 3 vezes ao dia por administração oral. Este medicamento fitoterápico é prescrito para tratamento e prevenção de edema cerebral, tontura, casos de vertigem e deficiência auditivas, atua como captador de radicais livres e entre outros.^{3,22}

Diante da complexidade da amostra é um desafio analítico desenvolver estratégias seletivas de preparo de amostras para separação e detecção de uma molécula específica, como a quercetina. Diante do resultado não satisfatório com o MIP de quercetina baseado em síntese orgânica no capítulo anterior, pretende-se neste Capítulo II, desenvolver um novo material híbrido orgânico-inorgânico, cujo intuito é explorar o potencial do MIS com quercetina empregando o PSG mediado por íons metálicos (Al^{3+}) para uma extração seletiva de quercetina presente em extrato de *Ginkgo biloba* L. de 40 mg e 80 mg.

2. Metodologia

2.1. Reagentes

- 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), pureza 97%, Sigma-Aldrich
- Tetraetoxissilano (TEOS), pureza $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich
- Cloreto de alumínio (AlCl_3), pureza 99,0 %, Cinética
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), pureza 99,9 %, Scharlau
- Metanol (CH_3OH), pureza 99,0 %, Tedia
- Acetona ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), pureza 99,5 %, Dinâmica
- Ácido fosfórico (H_3PO_4), pureza 85,0 %, Vetec
- Ácido acético glacial (CH_3COOH), pureza $\geq 99,0$ %, Cinética
- Quercetina Anidra ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), pureza ≥ 95 %, Aldrich
- Rutina hidratada ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot x\text{H}_2\text{O}$), pureza ≥ 94 %, Aldrich

2.2. Equipamentos

- Balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001 g
- Banho ultra-som, Unique, modelo 1400
- Mesa agitadora horizontal, Ethikechnology
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Modelo JEOL JSM-7001F
- Surface Area e Pore Size Analyser, Quantachrome, modelo Nova 2200c
- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Varian, Modelo 640-IR.
- Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (FRX/EDX), Shimadzu, modelo EDX-720.
- Espectrofotômetro UV-Vis, Agilent, modelo 8453.
- Análise termogravimétrica - 2960 Simultaneous DSC-TGA da TA Instruments
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), PerkinElmer, composto de uma bomba de alta pressão, modelo Flexar LC Pump; Detector Flexar PDA, válvula de injeção (alça de amostragem de 20 μL); Software Chromera, verison 3.4.0.5712, PerkinElmer
- Coluna cromatográfica Bownlee Analytical C_{18} diâmetro médio de 5 μm , 250 x 4,6 mm, PerkinElmer
- Sistema de deionização da água, Milli-Q, Millipore

- Bomba peristáltica, Ismatec, modelo IPC High precision multichannel dispenser
- Tubo Tygon, Viton, 1,42 mm ID
- Seringa de polipropileno de 3 mL
- Agitador magnético com aquecimento Go-Stirrer MS-H-S Go-Lab

2.3. Síntese da Sílica Impressa Molecularmente (MIS)

Foram sintetizados 3 diferentes polímeros usando Quer como molécula molde, os precursores APTMS como monômero funcional e TEOS como agente de ligação cruzada e Al^{3+} como íons metálicos. A síntese do polímero de sílica impressa molecularmente (MIS) foi baseado no processo sol-gel descrito por Zhang et al.,¹²³ com pequenas modificações.

O procedimento da síntese do MIS consistiu na mistura de 50 mg do padrão de Quer em 10 mL de APTMS em um béquer até completa solubilização. Em seguida, foram adicionados 20 mL de TEOS e 30 mL de água destilada ou solução aquosa de AlCl_3 0,01 mol L⁻¹ ou 0,1 mol L⁻¹. As misturas foram levadas ao agitador magnético por 10 min até completar a reação de hidrólise e policondensação, sendo obtidas as sílicas impressas com Quer sem e com íons Al^{3+} , que foram nomeadas de MIS, MIS-0,01 e MIS-0,1. Os polímeros impressos foram secos a 105 °C por 2 h, macerados e peneirados (< 50 µm). Em seguida, os mesmos foram submetidos a um processo de extração para remoção da MM, os quais foram colocados em um funil de vidro com papel de filtro. A solução metanol/ácido acético (20:1) foi percolada (~ 100 mL) pelo polímero. Para completar a remoção da MM, os polímeros foram colocados em 50 mL de acetona e foram deixados em repouso por 6 h. Por fim, a solução foi filtrada e o sobrenadante analisado por espectrofotometria na região UV-Vis para verificar se ainda havia a presença da MM. Os polímeros impressos foram secos a 60 °C até peso constante e estocados em frascos de vidro até o seu uso. As sílicas não impressas molecularmente (NIS) foram sintetizadas simultaneamente sem presença da MM e realizados todos os procedimentos descritos anteriormente, sendo obtidos o NIS, NIS-0,01 e NIS-0,1.

2.4. Caracterização Química e estrutural

Para avaliar a morfologia das sílicas impressas e não impressas foi realizado ensaio no Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo JEOL JSM-7001F), pertencente ao Laboratório de MEV do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Cada amostra foi fixado em um porta amostra e metalizadas com ouro em ambiente inerte (Argônio) por 1 h, a fim de tornar essas superfícies condutoras. As microscopias dos polímeros foram registradas com ampliações de 100 e 10.000 vezes.

A porosidade e a área superficial específica dos polímeros foram avaliadas através de ensaios de porosimetria de sorção de nitrogênio. Este ensaio consistiu na exposição de massa fixa do polímero a 100 °C por 3 h a vácuo e em seguida foi submetido a diferentes pressões de nitrogênio. Foram obtidas isotermas de sorção pelo método BET (Brunauer Emmett and Teller) e o método BJH (Barret, Joyner and Halenda) para determinar a área superficial, o volume e diâmetros dos poros. O ensaio foi conduzido em um Equipamento de Surface Area e Pore Size Analyser, pertencente ao Laboratório de Materiais e Combustíveis (LMC) do IQ-UnB.

Para avaliar os grupamentos existentes nos polímeros e possíveis modificações desses grupos e ligações utilizou-se a espectroscopia de absorção no infravermelho. Para as medidas dos espectros IV os polímeros foram macerados em KBr na proporção de 1% (m/m) a temperatura ambiente. Os ensaios foram conduzidos em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com resolução de 4 cm⁻¹ e medidas entre 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ e 64 varreduras. Outra técnica empregada foi a FRX/EDX para uma avaliação da razão Si/Al presentes nos materiais, sendo esses ensaios realizados em quadruplicata. Os dois equipamentos são pertencentes a Central Analítica do IQ-UnB.

2.5. Estudo de desempenho das sílicas impressas molecularmente

2.5.1. Estudo de adsorção em diferentes solventes

Para avaliar a capacidade de reconhecimento molecular das sílicas impressas e não impressas foram realizados estudos de adsorção com Quer solubilizada em metanol e em etanol:água.¹²⁴

Inicialmente foram inseridos 20 mg de cada uma das sílicas (MIS, MIS-0,01 e MIS-0,1) e seus respectivos NIS em frascos individuais contendo tampa e adicionados 5 mL de solução de Quer 2,5 mg L⁻¹ preparada em metanol. O mesmo procedimento foi realizado usando solução de Quer solubilizada em etanol:água (60:40, v/v). Os frascos foram lacrados e deixados sob agitação por 1 hora em uma mesa agitadora horizontal. Ao final desse tempo, filtrou-se as soluções e os sobrenadantes foram analisados por espectrofotometria UV-Vis para determinação da Quer. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A partir destes resultados foi escolhida a sílica impressa e o solvente que mostrou melhor eficiência de adsorção para prosseguir a próxima etapa.

Para a construção da isoterma de adsorção, transferiu-se 20 mg da sílica impressa ou não impressa selecionadas no ensaio anterior para um frasco com tampa e acrescentou-se 5 mL da solução de Quer em etanol:água em 6 níveis de concentrações, na faixa de 0,5 a 4,0 mg L⁻¹. Em seguida os tubos foram agitados por 24 h a 150 rpm em um agitador horizontal, e após o tempo estabelecido, as alíquotas do sobrenadante (analito livre) foram analisadas no espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados da capacidade de adsorção ($\mu\text{g g}^{-1}$) foram calculados pela Equação (G), descrita na seção 2.7 do capítulo I, e os ajustes dos modelos de isoterma de adsorção foram realizados no software Origin (versão 8.0).

2.5.2. Estudo de seletividade

A avaliação da seletividade foi feita mediante estudo de adsorção, conforme reportado por Li *et.al.*,¹¹⁶ contendo misturas Quer e de Rut solubilizados no solvente selecionado na seção 2.5.1.

Para execução deste estudo 200 mg da sílica impressa e não impressa selecionadas na seção 2.5.1 foram colocadas em frascos individuais e adicionados 5 mL das soluções recém preparadas de Quer e Rut a 30 mg L⁻¹. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. Os frascos foram lacrados e deixados sob agitação constante durante 1 h em uma mesa agitadora horizontal, e ao término deste período, as alíquotas foram filtradas e analisadas em um cromatógrafo (CLAE). As soluções padrão de Quer e Rut para a construção das curvas analíticas que foram preparadas no intervalo de 5 a 30 mg L⁻¹.

O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo com detector PDA e coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm). O método otimizado para separação dos compostos foi fase móvel metanol:água com 0,5 % de ácido fosfórico (40:60), vazão de 1,3 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 375 nm e 364 nm para Quer e Rut, respectivamente. Os resultados obtidos da seletividade foram analisados pela equação (G), descrita na seção 2.7 do capítulo I.

2.5.3. Estudo de dessorção da sílica impressa em SPE

O objetivo deste estudo foi verificar a natureza e o volume do solvente extrator utilizado para a dessorção da Quer na sílica impressa, selecionada na seção 2.5.2, e a quantidade do polímero a ser usado na produção do cartucho de SPE.

Para avaliar a natureza do solvente na dessorção de Quer adsorvida na sílica impressa foram preparados quatro cartuchos de SPE em seringas de 3 mL. Foi colocado na base de cada seringa um disco de polietileno sinterizado fritz, que foi recuperado de cartuchos comerciais usados. Em seguida, foram adicionados em duas seringas 200 mg e em outras duas 400 mg por fim foi inserido outro fritz na parte superior de cada cartucho acomodando a fase sólida.

Na SPE com a sílica impressa foi montado um sistema de suporte, conforme mostrado pela Figura 31, conectando na ponta de saída da seringa um tubo de tygon acoplado a uma bomba peristáltica (1,0 mL/min) para percolar a solução pelo cartucho.

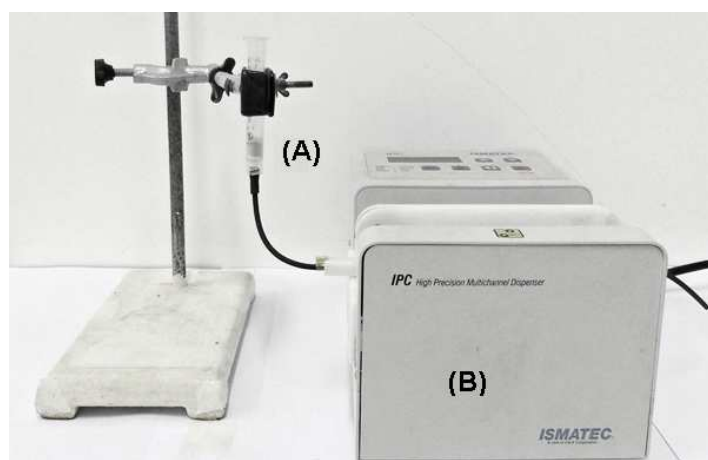


Figura 31. Foto do sistema utilizado para as análises com os cartuchos de SPE contendo sílica impressa (A) e bomba peristáltica (B).

Primeiramente, os cartuchos foram condicionados com 2 x 2,0 mL de etanol:água (60:40 v/v), sendo esta a proporção que apresentou maior eficiência na capacidade de adsorção. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL da solução de Quer (10 mg L⁻¹) e após percolar pela sílica impressa, os solventes extratores, etanol 100% e etanol:água (40:60) foram adicionados individualmente a cada cartucho para avaliar a eficiência de dessorção. O eluato foi coletado e analisado no espectrofotômetro UV-Vis.

Após selecionar o solvente extrator mais adequado para dessorção da Quer, outro ensaio foi realizado usando os mesmos cartuchos do ensaio anterior. Este ensaio foi conduzido em triplicata com o intuito de definir a quantidade de sílica impressa (200 mg ou 400 mg) a ser usada no cartucho de SPE e também avaliar a precisão no reuso dos cartuchos.

A partir da seleção do solvente e da quantidade de sílica impressa a ser usada no SPE, três novos cartuchos foram preparados com a massa escolhida de sílica impressa, e prosseguiu-se com as etapas descritas anteriormente de condicionamento e adsorção. Para a etapa de dessorção foi variado o volume de etanol selecionado na etapa anterior, e alíquotas de 2,0 mL do solvente foram adicionados 4 vezes no cartucho e a cada alíquota eluída foi lida diretamente no espectrofotômetro no UV-Vis para avaliar a recuperação e precisão no processo de dessorção.

2.6. Avaliação preliminar da eficiência do MIS-0,01 e NIS-0,01 em SPE

A amostra selecionada para este estudo foi o extrato de *Ginkgo biloba* L. de 40 mg padronizado contendo 9,6 mg de Ginkgoflavonóide expresso pela soma de quercetina, kaempferol e isorhmnetina. Para preparar a amostra de *Ginkgo biloba* L., inicialmente pesou-se 10 cápsulas de *Ginkgo biloba* L. e determinou-se o peso médio (PM). Em seguida, um PM (0,3447 g) foi pesado em uma balança analítica e foi colocado em um béquer de 50 mL e solubilizado com 10,0 mL de solução etanol:água (60:40, v/v) e agitado por 10 min com auxílio de um agitador magnético. Após a solubilização, a solução foi filtrada em papel de filtro convencional e uma alíquota de

5,0 mL desta solução foi avolumada em um balão volumétrico de 10,0 mL com etanol:água (60:40, v/v). Soluções padrão de Quer foram preparadas nas concentrações de 5 a 40 mg L⁻¹ solubilizadas no mesmo meio da amostra. A amostra e as soluções do padrão foram filtrados com filtro de membrana de 0,45 µm.

Para a extração da Quer presente na amostra foram preparados dois cartuchos de SPE contendo 400 mg da sílica impressa e não impressa que foram selecionadas na seção 2.5.1. Inicialmente, cada cartucho montado, conforme Figura 31, foi condicionado com 2 x 2,0 mL de etanol:água (60:40) e em seguida adicionado 1,0 mL da amostra preparada do extrato de *Ginkgo biloba* L., sendo o eluato da amostra coletada para análise posterior. Na etapa de dessorção da Quer foi adicionado 2 mL do solvente extrator selecionado na seção 2.5.3 e cada alíquota coletada foi analisada diretamente no cromatógrafo.

Em relação às soluções padrão de Quer foram preparadas duas curvas analíticas, uma baseada na leitura direta das soluções padrão de Quer no cromatógrafo e outra onde as soluções padrão foram percoladas pelo SPE contendo a sílica impressa, seguindo o mesmo procedimento de dessorção executado para amostra.

2.7. Avaliação do desempenho analítico do MIS-0,01 em SPE

Para este estudo foram selecionadas amostras de extrato de *Ginkgo biloba* L. de 40 mg e 80 mg. O procedimento de preparo das soluções padrão de Quer e das amostras de 40 mg e 80 mg foram os mesmos descrito na seção 2.6. com apenas algumas alterações na etapa de dessorção que foi usado 8 mL solvente extrator para eluição da Quer adsorvidas no SPE, condição esta definida na seção 2.5.3., seguido de secagem completa do eluato com gás N₂ e redissolução em 1 mL de etanol:água (60:40, v/v).

Para avaliar as perdas de íons Al³⁺ após o reuso do cartucho de SPE contendo o MIS-0,01 foi realizada análise de Termogravimetria (TG). O experimento foi conduzido num 2960 Simultaneous DSC-TGA da TA Instruments pertencente ao laboratório de Catálise da UnB. Foram geradas curvas de TG para o MIS-0,01 antes e após a sua utilização em 5 análises consecutivas de padrões. Os polímeros foram

aquecidos de 25 °C até 1000 °C a 10 °C/min, em ar sintético a 100 mL/min. Os resultados dos resíduos de TG (Al_2O_3 e SiO_2) foram obtidos e calculados com base nos dados adquiridos por FRX/EDX.

3. Resultados e discussões

3.1 Caracterização química e estrutural

A investigação da morfologia das sílicas impressas e não impressas com e sem íons Al^{3+} foi conduzida em um microscópio eletrônico de varredura (MEV). As Figuras 32 a 34 ilustram as fotomicrografias obtidas com aumento de 100 e 10.000 vezes.

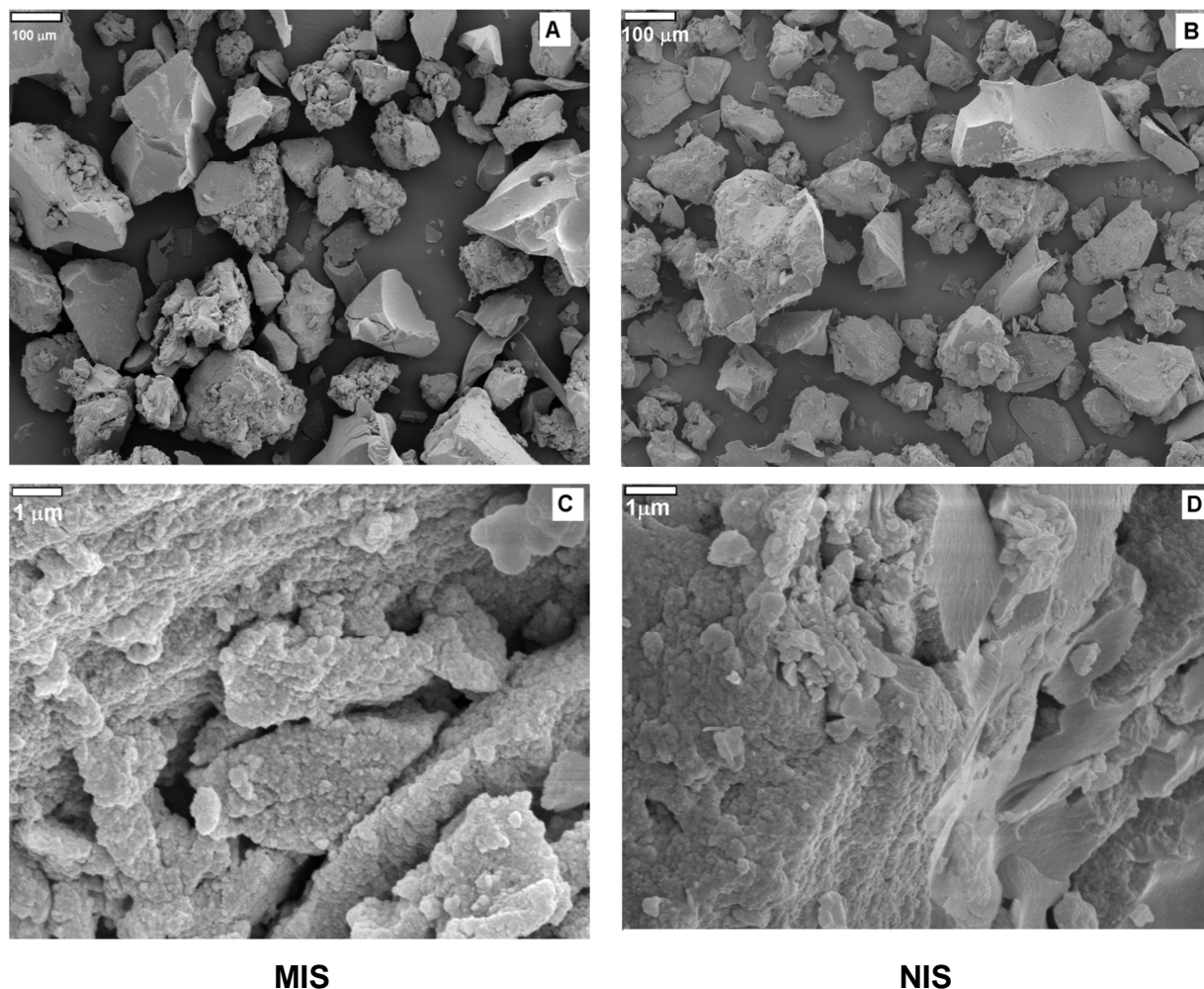
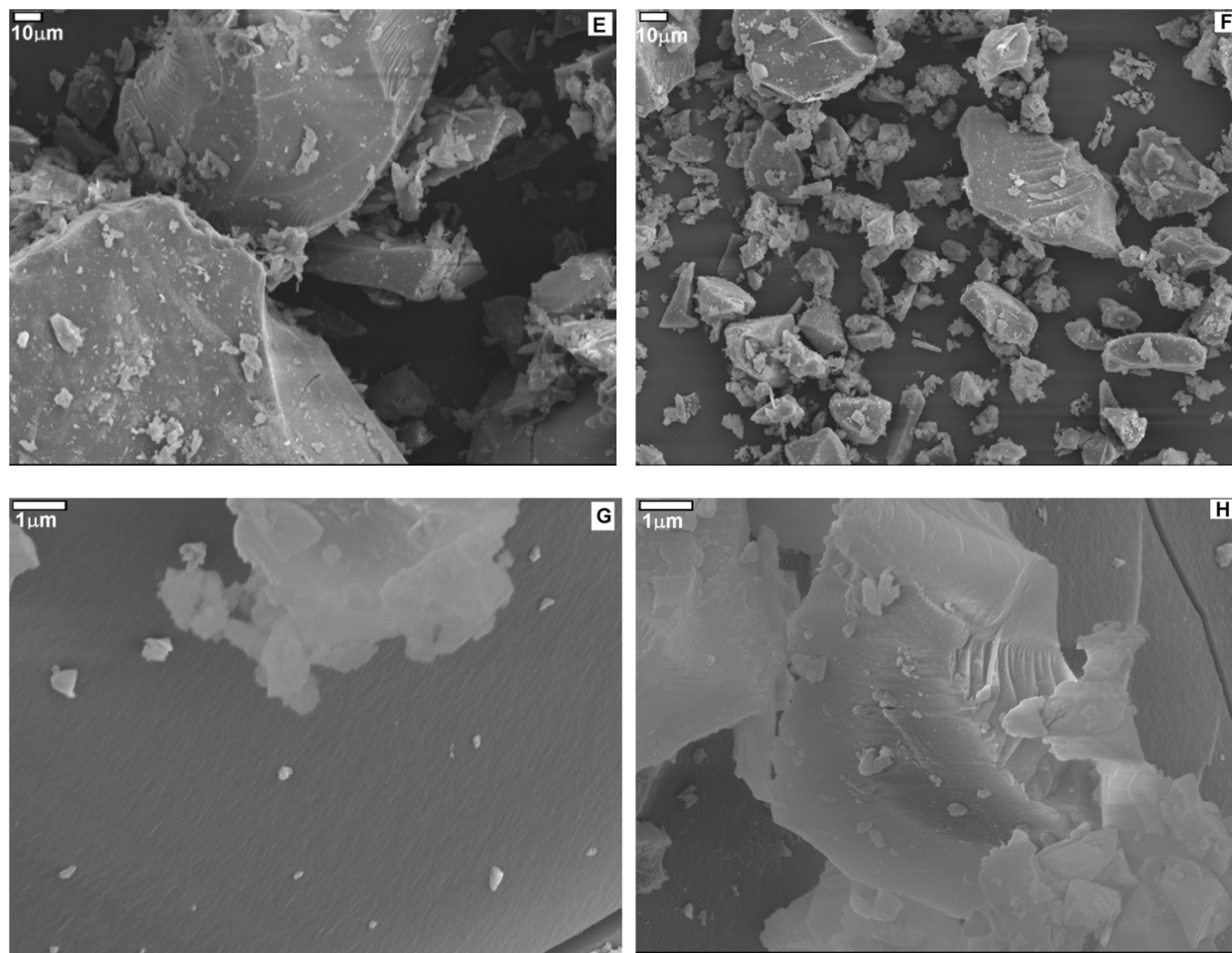


Figura 32. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIS e NIS com aumento de 100 vezes (A) e (B) e 10.000 vezes (C) e (D).



MIS-0,01

NIS-0,01

Figura 33. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIS-0,01 e NIS-0,01 com aumento de 500 vezes (E) e (F) e 10.000 vezes (G) e (H).

As Figuras 32A, 32B, 33A, 33B, 34A e 34B mostram as fotomicrografias com aumento de 100 vezes das sílicas MIS, MIS-0,01 e MIS-0,1 e seus respectivos polímeros controle. Pode ser observado nessas imagens que as partículas não apresentaram poros visíveis, mas formas e tamanhos irregulares devido ao processo de maceração após a síntese dos polímeros. Quando aplicado um aumento de 10.000 vezes, verifica-se que apenas os polímeros de MIS e NIS (Figuras 32C e 32D), apresentaram porosidade perceptível, enquanto que MIS-0,01, MIS-0,1, NIS-0,01 e NIS-0,1 Figuras 33G, 33H, 34L e 34M, respectivamente, evidenciaram uma superfície mais lisa, compacta e com pequenos aglomerados de micropartículas irregulares. Provavelmente estas características são devido à substituição isomórfica dos íons silício por alumínio na estrutura polimérica, o que consiste na substituição de um íon com semelhante raio iônico por outro íon conservando a mesma estrutura química.¹²⁵

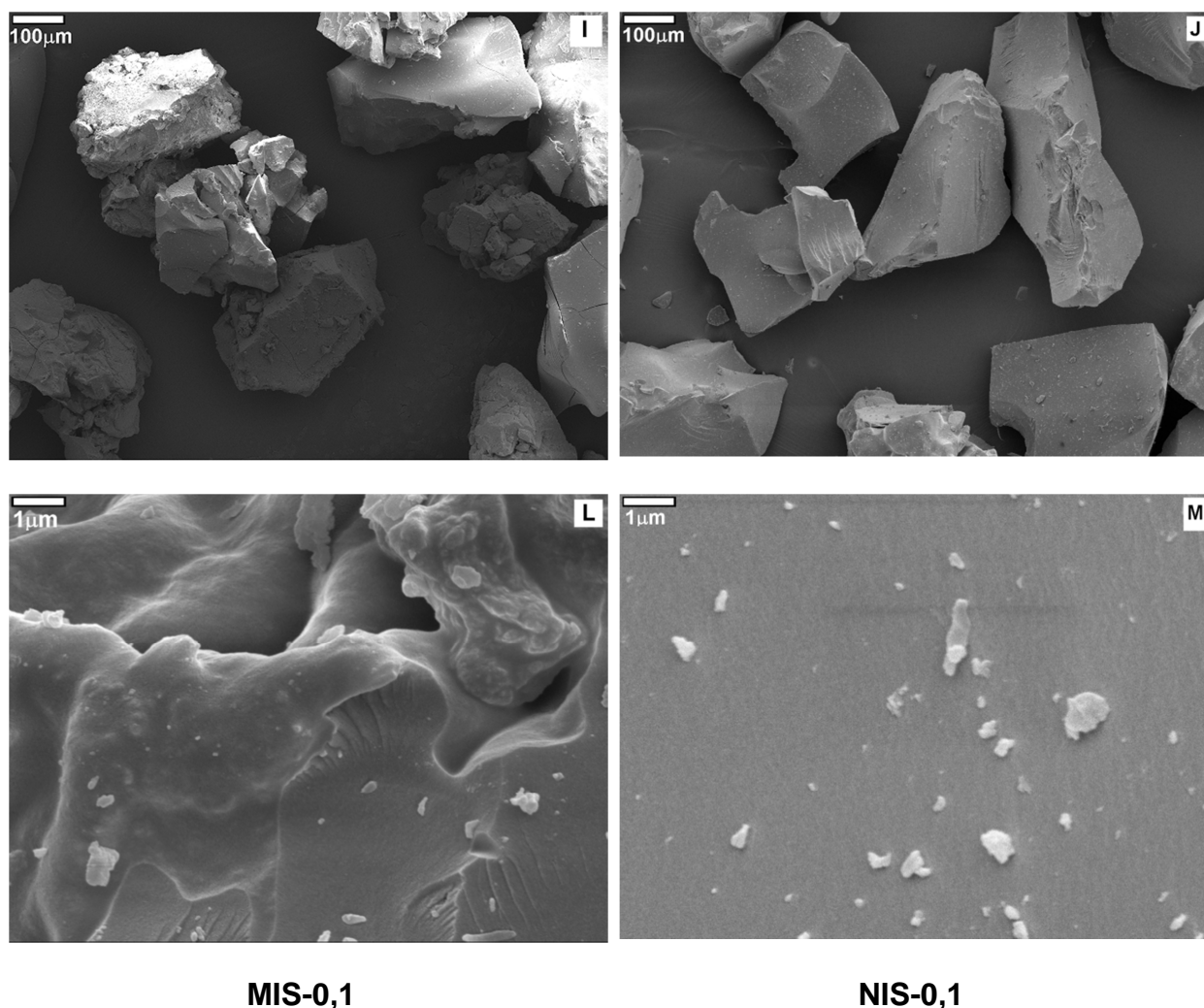


Figura 34. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do MIS-0,1 e NIS-01 com aumento de 100 (I) e (J) e 10.000 vezes (L) e (M).

Com objetivo de investigar a área superficial, volume e diâmetro de poros das sílicas impressas e não impressas, ensaios de porosimetria de adsorção de nitrogênio foram conduzidas para avaliar a influência dos íons Al^{3+} nos polímeros. Os resultados descritos na Tabela 8 mostram que as sílicas impressas apresentaram áreas superficiais e volumes de poros maiores que dos seus respectivos polímeros controle. Pode-se verificar que a diferença entre áreas superficiais das sílicas impressas e não impressas foram de 14,46 % (MIS e NIS), 20,62 % (MIS-0,01 e NIS-0,01) e 22,24% (MIS-0,1 e NIS-0,1), sendo estes valores similares aos encontrados para os volumes de poros. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Raof et al.,¹²⁶ da área superficial e volume de poros de 17,2 % e 29,4 %, respectivamente, quando sintetizado uma sílica impressa por PSG.

Por outro lado, quando comparadas às áreas superficiais entre as sílicas impressas pode-se verificar diferenças de 16,08% entre (MIS e MIS-0,01) e 4,98% entre (MIS e MIS-0,1) e para os volumes de poros foram observadas diferenças de 20,545 % e 9,091%, respectivamente. Portanto, o resultado mostra uma mudança mais significativa entre o MIS-0,01 com relação ao MIS.

Tabela 8. Porosimetria das sílicas impressas e não impressas molecularmente.

Polímero	Área superficial (m ² /g)	Volume de poros (cm ³ /g)	Diâmetro médio dos poros (nm)
MIS	49,266	0,044	1,675
NIS	42,142	0,037	1,532
MIS-0,01	41,343	0,035	1,679
NIS-0,01	32,816	0,028	1,677
MIS-0,1	46,814	0,040	1,704
NIS-0,1	36,401	0,031	1,677

Já em relação ao diâmetro médio dos poros observa-se que nenhuma variação significativa foi evidenciada entre as sílicas impressas e não impressas e que todas enquadram-se como materiais microporosos com diâmetros de poros inferiores a 2 nm, de acordo com a (IUPAC).¹¹⁹ Provavelmente, a proximidade entre os diâmetros médios dos poros descritos na Tabela 8, deve-se ao fato de que os principais fatores responsáveis pelo controle do tamanho e a distribuição dos poros dos polímeros foram os mesmos nas diferentes sínteses, por exemplo: os precursores TEOS e APTMS, a temperatura, tempo de síntese, onde o tamanho e distribuição de poros foram pouco afetados pela adição da solução de Al³⁺ 0,01 e 0,1 mol L⁻¹ para o MIS-0,01 e MIS-0,01 e seus respectivos polímeros controle.

A espectroscopia no infravermelho foi outra importante ferramenta usada para averiguar a estrutura química das sílicas impressas e não impressas obtidas pelo PSG. Os espectros de absorção de IV são apresentados na Figura 35. Observam-se vibrações de estiramento dos grupos hidroxilas através da banda em 3000-3750 cm⁻¹ que podem corresponder aos grupos silanóis, e também, água remanescente adsorvida e em 2931 cm⁻¹ estiramento vibracional do C-H. Em 1650 cm⁻¹ aparece uma

banda que pode ser atribuída às vibrações angulares das moléculas de água e a banda 1380 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da amina primária presente no monômero funcional (APTMS). As bandas em 1050 cm^{-1} e 765 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento assimétrico Si-O-Si e o estiramento simétrico Si-O, respectivamente.¹²⁶

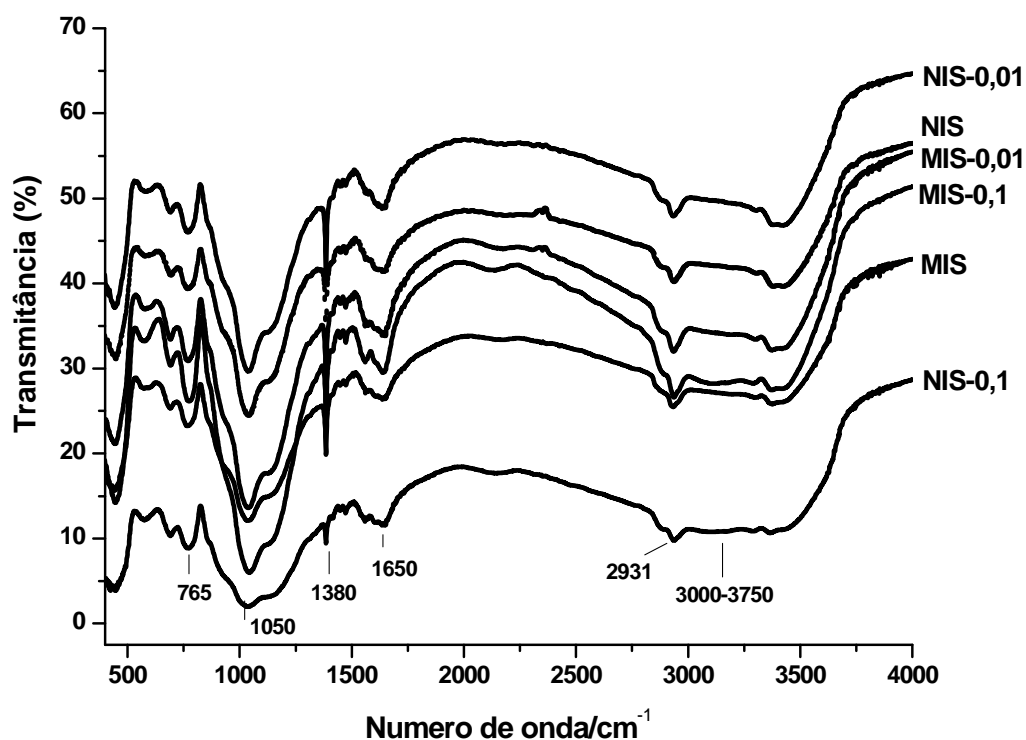


Figura 35. Espectro de FTIR para das sílicas impressas e não impressas molecularmente em pastilhas de KBr.

Diante dos espectros obtidos não foi observada nenhuma mudança significativa entre as bandas de absorção das sílicas impressas e não impressas, sendo a única diferença visível relacionada às variações nas intensidades das bandas. Contudo, a similaridade dos dados espectrais não descarta a possibilidade de ter ocorrido mudanças com a adição de Al^{3+} aos polímeros, uma vez que os resultados obtidos por MEV demonstram claramente mudanças na superfície dos materiais sintetizados.

Para avaliar a proporção de átomos de silício que foram substituídos por alumínio foi empregada à técnica de FRX/EDX. A Tabela 9 mostra os resultados

obtidos da razão das percentagens relativas Si/Al nos polímeros estudados antes e após remoção da MM.

Tabela 9. Valores obtidos da razão Si/Al por FRX/EDX para as sílicas impressas e não impressas molecularmente antes e após remoção da MM.

Polímeros	Razão Si/Al	
	Antes da remoção da MM	Após remoção da MM
MIS	*	*
NIS	*	*
MIS-0,01	56,59 ± 0,91	66,94 ± 0,87
NIS-0,01	51,43 ± 2,35	69,06 ± 5,91
MIS-0,1	32,68 ± 1,52	40,61 ± 0,36
NIS-0,1	31,25 ± 1,05	39,10 ± 0,15

*sem presença de íons Al^{3+} na estrutura do polímero.

Como pode ser observado na Tabela 9, antes e após a remoção da MM dos polímeros, MIS-0,01 e MIS-0,1, os valores para a razão Si/Al foram próximos, fato também observado para os polímeros controle. Pode-se verificar que após o processo de remoção da MM com solução metanol/ácido acético seguida de acetona houve um pequeno aumento da razão Si/Al para todos os materiais, o que mostra que os íons Al^{3+} sem reagir foram lixiviados em pequena proporção tanto para as sílicas impressas como as não impressas.

Observa-se que as razões Si/Al foram maiores para os polímeros baseado em 0,01 mol L⁻¹ de solução de Al^{3+} . De acordo com Ribeiro et al.¹²⁷ materiais que possuem alta razão Si/Al apresentam maior hidrofobicidade devido à grande quantidade de átomos de silício (Si), mais hidrofóbicos, em relação aos átomos de alumínio (Al), mais hidrofílicos, no material. Essa característica é reportada por melhorar a resistência de sólidos, quando estes estão em contato direto com substâncias mais hidrofílicas, como a água. É importante destacar que a substituição de um átomo de Si por um de Al aumentou a acidez dos polímeros, a qual está relacionada com a formação de sítios ácidos de Lewis, além da existência de sítios ácidos de Brønsted, como mostra a Figura 36.

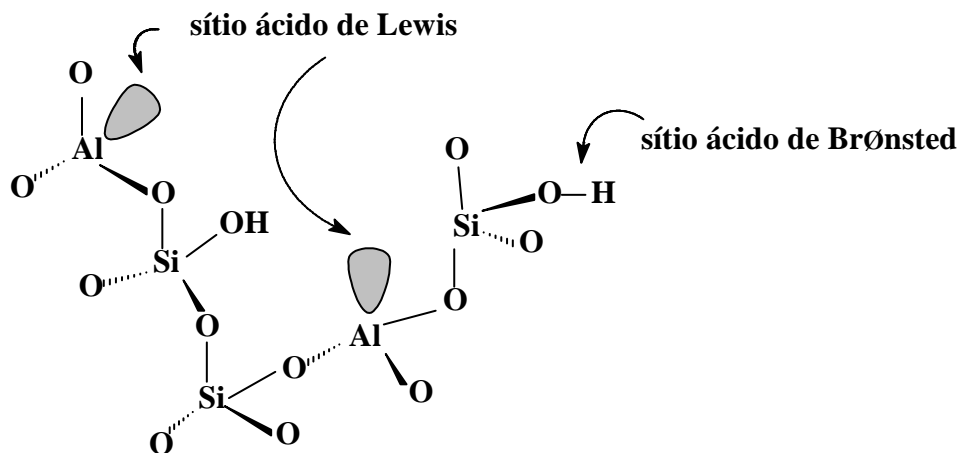


Figura 36. Representação dos sítios ácidos de Brønsted e do ácido de Lewis.⁶⁷

A Figura 37 mostra uma proposta da reação da sílica impressa em presença de íons Al^{3+} . Levando em consideração a regra de Loewenstein:¹²⁸ “sempre que dois tetraedros estiverem ligados por um oxigênio, o centro de apenas um deles poderá ser ocupado por alumínio, o outro tem que ser ocupado por silício ou outro íon pequeno de valência quatro ou maior, ex. fósforo.” Portanto, as cavidades tridimensionais da sílica impressa podem conter ligações do tipo Si-O-Si e Si-O-Al sugerindo possivelmente bifuncionalidade ao polímero e tornando-o mais seletivo.

A estrutura da sílica impressa com íons (Figura 37) pode ser inicialmente formada a partir da presença dos grupos amino do APTMS (MF) que favorece a formação de ligações de hidrogênio com os grupos 5 e 3-hidroxicromona e 3',4'-o-dihidroxil⁵⁶ da Quer. As reações de hidrólise e policondensação prosseguem com o TEOS e com a solução aquosa de Al^{3+} . O TEOS age como um agente de ligação cruzada para formar a matriz polimérica ao redor da Quer, enquanto que os íons Al^{3+} são incorporados na matriz e podem atuar como um ácido de Lewis (Figura 38) tornando o polímero mais seletivo a Quer. Após a transição sol-gel o polímero formado passa pela secagem e eliminação de subprodutos gerados. Em seguida o MIS passa pelo processo de remoção da Quer com solvente apropriado a cavidade de reconhecimento molecular é disponibilizada. Possivelmente, os íons Al^{3+} incorporados na matriz polimérica podem formar sítios específicos/seletivos para Quer e competir com os hidrogênios do APTMS para formar complexo (Quer- Al^{3+}), e com

isso pode favorecer a extração seletiva da Quer na etapa de adsorção e levar o isolamento da Quer na etapa de dessorção.

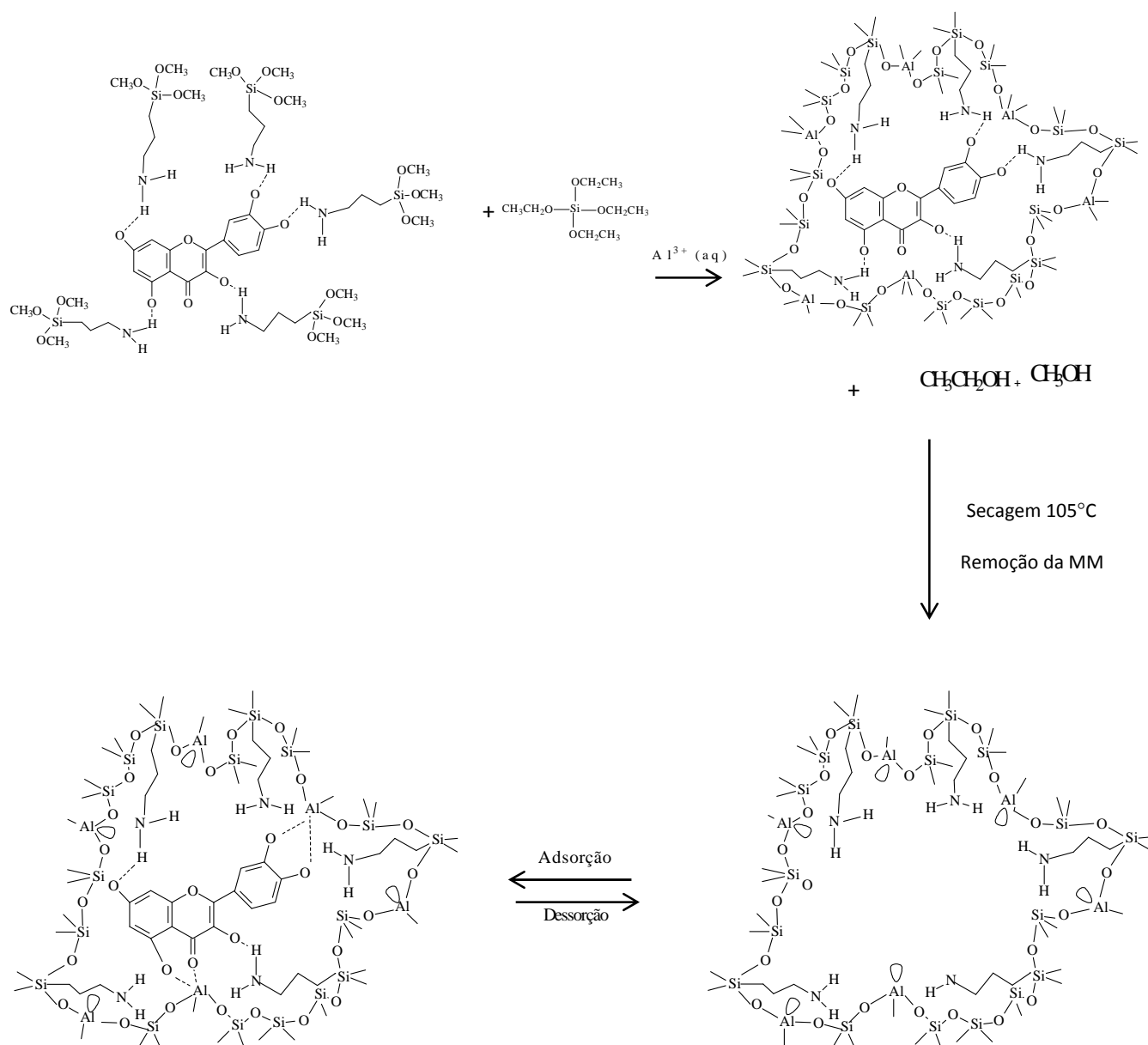


Figura 37. Proposta da reação de hidrólise e policondensação entre APTMS/Quer/TEOS em solução aquosa de Al^{3+} , seguida da remoção da MM (Quer) e dos subprodutos gerados (H_2O , CH_3OH e CH_3CH_2OH) e a etapa de adsorção/dessorção.

3.2. Estudo de desempenho das sílicas impressas molecularmente

Para avaliar o desempenho das sílicas impressas e não impressas, estudos de adsorção e isoterma de adsorção foram realizados de acordo com o procedimento experimental descritos na seção 2.5.1.

A Tabela 10 mostra os resultados do desempenho dos polímeros, onde observa-se que o MIS-0,01 e MIS-0,1 suspensos em solução de Quer em etanol:água (60:40, v/v) apresentaram as maiores capacidades adsorptivas (Q), $248,5 \pm 3,5 \mu\text{g/g}$ e $207,6 \pm 5,0 \mu\text{g/g}$, respectivamente, quando comparada ao MIS, $159,7 \pm 35,0 \mu\text{g/g}$ e os respectivos polímeros controle. Provavelmente, além do efeito de memória da molécula, os MIS sintetizados em presença de íons Al^{3+} podem ter proporcionado uma maior interação com a Quer quando solubilizada em etanol:água (60:40, v/v).

Os resultados dos fatores de impressão (IF) para a solução de Quer em etanol:água confirmam as maiores adsorções das sílicas impressas em relação as sílicas não impressas. Além disso, pode ser verificado que o desvio padrão dos MIS-0,01 e MIS-0,1 foram significativamente menores aos observados para o MIS e os NIS. Estes resultados mostram que os polímeros impressos mediados por íons Al^{3+} provavelmente geraram sítios específicos na sílica conferindo possivelmente uma bifuncionalidade. Através dessa bifuncionalidade provavelmente foram obtidas interações mais fortes entre os grupos funcionais e hidroxilas (bases de Lewis) da Quer com os átomos de Al^{3+} e as ligações de hidrogênio entre os átomos de nitrogênio do APTMS garantindo a formação de cavidades mais seletivas para a espécie de interesse.

Em relação as sílicas impressas e não impressas suspensas em solução de Quer em metanol as adsorções foram mais baixas quando comparadas às suspensas em solução de Quer em etanol:água. Nota-se, neste caso, que as maiores adsorções foram obtidas pelos polímeros controle (NIS, NIS-0,01 e NIS-0,1) em metanol, resultado este oposto ao encontrado quando em etanol:água. Além da baixa capacidade de adsorção dos polímeros pela Quer em metanol, também foi verificada uma baixa precisão, evidenciada pelos elevados desvios padrão.

Visto que adsorção do MIS-0,01 foi a que exibiu maior potencial como material sorvente para a molécula de Quer, ou seja, maior eficiência de adsorção no meio

etanol:água (60:40, v/v) confirmando o resultado obtido de FRX/EDX, decidiu-se prosseguir os próximos ensaios com o MIS-0,01 e o respectivo polímero controle.

Tabela 10. Resultados da adsorção das sílicas impressas e não-impressas em metanol e em etanol:água (60:40, v/v).

Sínteses	C_0 (mg L ⁻¹)	C_s (mg L ⁻¹)		Q (μg g ⁻¹)		IF	
		Etanol:H ₂ O	Metanol	Etanol:H ₂ O	Metanol	Etanol:H ₂ O	Metanol
MIS		1,86 ± 0,14	2,06 ± 0,13	159,7 ± 35,0	109,41 ± 33,44	1,27	0,74
NIS		2,00 ± 0,03	1,91 ± 0,19	125,7 ± 7,4	148,70 ± 48,15		
MIS-0,01	2,5	1,52 ± 0,01	1,93 ± 0,10	248,5 ± 3,5	142,10 ± 24,68	2,06	1,08
NIS-0,01		2,02 ± 0,16	1,97 ± 0,19	120,2 ± 38,9	132,10 ± 48,63		
MIS-0,1		1,67 ± 0,02	2,07 ± 0,09	207,6 ± 5,0	106,33 ± 22,90	1,95	0,71
NIS-0,1		2,07 ± 0,08	1,90 ± 0,22	106,5 ± 20,6	149,60 ± 55,75		

C_0 - concentração inicial da solução de Quer

C_s - concentração do analito livre no equilíbrio

Q - capacidade de adsorção da Quer pelo polímero

IF - Fator de impressão (razão da resposta MIS vs NIS)

A seguir foram realizados estudos de isoterma de adsorção em batelada que foram conduzidos com o MIS-0,01 e NIS-0,01, conforme procedimento descrito na seção 2.5.1. Os resultados das isotermas de adsorção são mostrados nas Figuras 38 e 39.

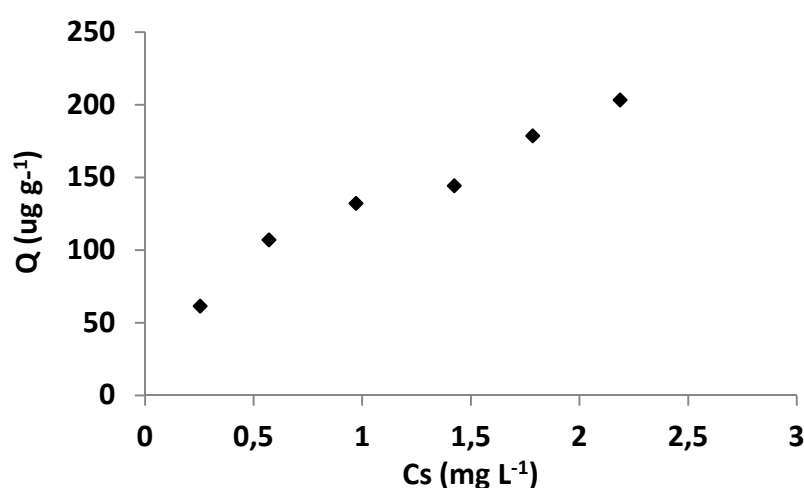


Figura 38. Isoterma de adsorção do MIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25°C.

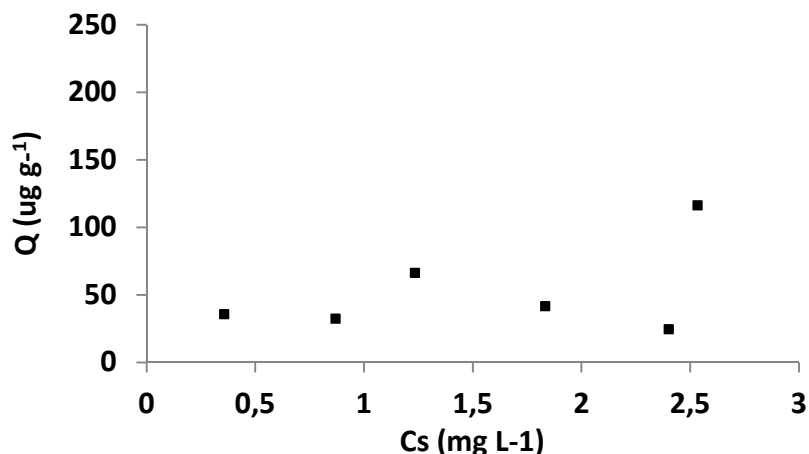


Figura 39. Isoterma de adsorção do NIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25°C.

Pode ser observado na Figura 38 que os pontos da curva para o MIS-0,01 apresentaram uma tendência crescente indicando uma relação de afinidade entre MIS-0,01 e a Quer, resultado este diferente ao observado para o NIS-0,01 (Figura 39). Verifica-se que a capacidade adsorptiva do MIS-0,01 apresentou uma maior afinidade pela molécula de Quer sendo evidenciada pelo maior valor de Q (Figura 38) quando comparada ao NIS-0,01 (Figura 39).

O estudo descrito por Umpleby et al.,¹²² apresenta evidências de que as ligações entre analito e o polímero impresso podem apresentar sítios de ligação do tipo homogêneas e heterogêneas. Modelos homogêneos assumem adsorções em monocamada, ou seja, os sítios de ligação presentes nos polímeros se equivalem, e os dados podem ser ajustados ao modelo teórico de Langmuir. Já os modelos heterogêneos assumem adsorções em multicamadas, ou seja, uma variedade de formas, tamanhos e rigidez dos sítios de ligação estão envolvidas nos polímeros, podendo ser ajustados aos modelos teóricos de Freundlich, Langmuir-Freundlich, entre outros.

O ajuste da equação de Langmuir aos dados de adsorção de Quer pelas isotermas obtidas para o MIS-0,01 e NIS-0,01 não apresentou bons resultados. Desta forma foram empregados os modelos de Freundlich e de Langmuir-Freundlich para a determinação da quantidade de sítios adsorventes e a estabilidade da interação da Quer e dos polímeros.

O modelo matemático de Freundlich descrito para o ajuste dos pontos da isoterma do MIS-0,01 e NIS-0,01 foi feito através da Equação I.¹³⁰

$$Q = \frac{K_F C_S^{(1/c)}}{1000} \quad (I)$$

Onde: Q é a capacidade de adsorção do analito no equilíbrio ($\mu\text{g g}^{-1}$), C_S é a concentração de analito no equilíbrio (mg L^{-1}), K_F é a constante de Freundlich (L g^{-1}) e expoente $(1/c)$ é o índice de heterogeneidade.

Já o ajuste com o modelo de Langmuir-Freundlich foi ajustado através da Equação J.¹²⁹

$$Q = \frac{K_{LF} q_m C_S^c}{1 + K_{LF} C_S^c} \quad (J)$$

Onde: Q capacidade de adsorção do analito no equilíbrio ($\mu\text{g g}^{-1}$), C_S é a concentração de analito no equilíbrio (mg L^{-1}), K_{LF} é a constante de Langmuir-Freundlich (L mg^{-1}), q_m capacidade máxima de adsorção ($\mu\text{g g}^{-1}$) e c o índice de heterogeneidade.

Os resultados dos modelos de Freundlich e o de Langmuir-Freundlich ajustados aos dados podem ser observados nas Figuras 40 e 41. Observa-se que os dados do MIS-0,01 se ajustaram adequadamente aos dois modelos propostos (Figuras 40A e 40B), evidenciando a heterogeneidade do MIS-0,01, ou seja, a adsorção da Quer ocorreu entre os diferentes tipos de sítios e energias de ligações envolvidas no polímero. Já para o NIS-0,01 nenhum dos modelos se ajustou de forma satisfatória (Figura 41A e 41B).

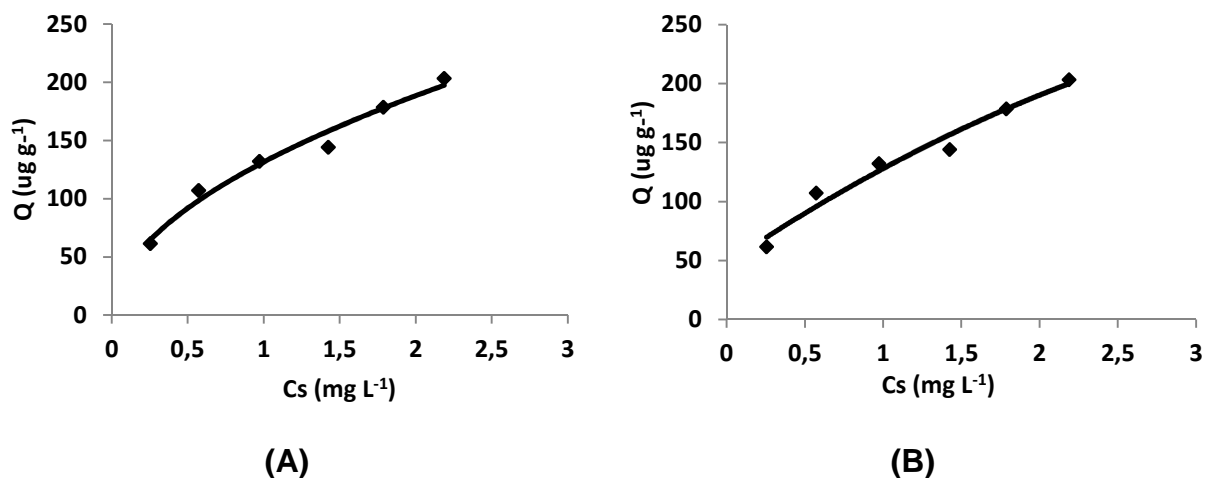


Figura 40. Isotherma de adsorção do MIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25°C ajustadas aos modelos Freundlich (A) e Langmuir-Freundlich (B).

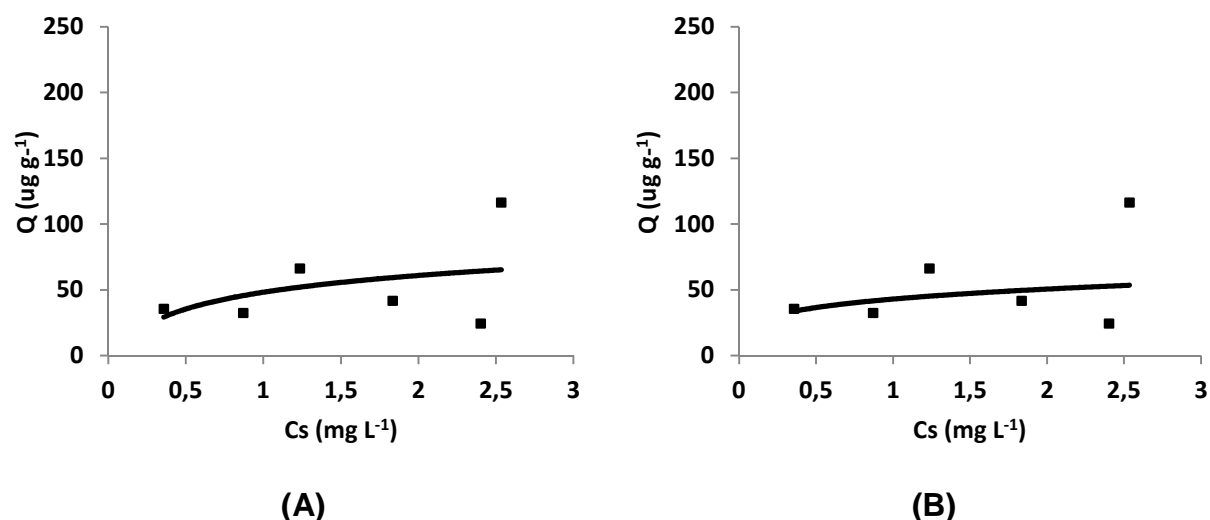


Figura 41. Isotherma de adsorção do NIS-0,01 em etanol:água (60:40) a 25 °C ajustadas aos modelos (A) Freundlich e (B) Langmuir-Freundlich.

A partir dos dois modelos ajustados para os dados do MIS-0,01 foram determinados os parâmetros das ligações de interação entre MIS-0,01 e Quer. Verifica-se na Tabela 11 que o modelo de Freundlich apresentou uma aproximação maior aos dados obtidos experimentalmente, isto pode ser observado pelo coeficiente de determinação de 0,98 que foi um pouco maior ao descrito pelo modelo de Langmuir-Freundlich de 0,96. Já em relação ao NIS-0,01 pode-se confirmar pelos parâmetros que nenhum dos modelos ajustou-se satisfatoriamente, pois baixos coeficientes de determinação 0,074 e 0,23 para os modelos de Freundlich e Langmuir-Freundlich foram obtidos, respectivamente.

Tabela 11. Parâmetros de ajuste dos modelos de Freundlich e Langmuir-Freundlich aplicados aos MIS-0,01 e NIS-0,01.

Síntese	Freundlich			Langmuir-Freundlich			
	K_F (L g ⁻¹)	1/c	r^2	K_{LF} (L mg ⁻¹)	c	q_m (µg g ⁻¹)	r^2
MIS-0,01	131,56	1,93	0,98	10,94	0,52	11,93	0,96
NIS-0,01	49,57	1,86	0,074	6,74	0,54	6,35	0,23

De forma aproximada, os parâmetros descritos na Tabela 11 resultantes do modelo de Freundlich mostram que a constante de Freundlich (K_F) do MIS-0,01 foi

aproximadamente 2,65 vezes maior do que a do NIS-0,01, evidenciando que o MIP-0,01 apresentou um número maior de sítios de adsorção disponíveis. Contudo, essa comparação pode apresentar um erro considerável, tendo em vista a falta de ajuste do modelo de Freundlich ao NIS-0,01.

Em relação ao parâmetro heterogeneidade (c), de acordo com Debrassi et al.,¹²⁹ quando $1/c > 1$ significa que há uma forte afinidade entre o polímero e o analito, o que pode ser notado tanto para o MIP-0,01 quanto o NIP-0,01 com valores de 1,93 e 1,86, respectivamente. Esses resultados também sugerem a existência de energias de adsorção distintas em todos os sítios do MIS-0,01 e NIS-0,01 o que confere a heterogeneidade aos materiais.

3.3. Seletividade

A seletividade do MIS-0,01 e NIS-0,01 foi investigada para os analitos Quer e Rut. Neste ensaio foi usada a cromatografia líquida de alta eficiência na detecção dos analitos, detalhes do procedimento foram descritos na seção 2.5.2.

As curvas analíticas para Rut e Quer apresentaram comportamento linear no intervalo de concentração de 5 a 30 mg L⁻¹, cujas equações obtidas foram: $A = 0,0645[\text{Quer}] - 0,0885$ e $A = 0,0791[\text{Rut}] + 0,1287$, onde A é a área do pico de cada composto e $[\text{Quer}]$ e $[\text{Rut}]$ as concentrações de quercetina e rutina, respectivamente. Essas curvas analíticas apresentaram coeficientes de determinação (R^2) iguais a 0,9908 e 0,9944, respectivamente, indicando comportamento linear. Os limites de detecção para Quer e Rut foram de 2,36 e 2,63 mg L⁻¹, respectivamente.

Pelos resultados apresentados na Tabela 12 observa-se que o MIS-0,01 apresentou maior interação pela Quer quando comparado à Rut. Em vista à similaridade da estrutura química dos compostos, a Rut apresenta uma pequena diferença na posição (carbono 3 do anel C) com um grupo glicosídeo (Figura 3). Ambos possuem em suas estruturas moleculares grupos hidroxilas que são capazes de interagir com os grupos amino do APTMS e formar ligações de hidrogênio. Dessa forma, é possível ocorrer interações entre as hidroxilas com os íons Al^{3+} inseridos na estrutura do MIS-0,01. Entretanto, como a Rut apresenta um grupo glicosídeo, considerado um grupo volumoso na posição equatorial, isto possivelmente dificultou a sua interação nos sítios específicos da cavidade do MIS-0,01 o que garantiu uma

maior seletividade para Quer. Fato que não foi observado para o NIS-0,01 que obteve aproximadamente a mesma afinidade tanto para a Quer quanto para Rut, $84,9 \pm 59,1$ e $94,9 \pm 8,3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Pode-se verificar que o fator de impressão IF (definido pela razão da resposta MIS-0,01 versus NIS-0,01) para a Quer foi praticamente quatro vezes maior que o IF para a Rut, fato que confere a retenção por interações específicas do MIS-0,01 pela molécula alvo (Quer) e garante uma maior seletividade.

Tabela 12. Avaliação da seletividade do MIS-0,01 e NIS-0,01 por meio de estudo de adsorção por CLAE.

Compostos	C_o (mg/L)		C_s (mg/L)		$Q_{\text{MIS-0.01}}$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$Q_{\text{NIS-0.01}}$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	IF
	MIS-0.01	NIS-0.01	MIS-0.01	NIS-0.01			
Quercetina	30		$23,8 \pm 1,7$	$26,6 \pm 2,9$	$155,5 \pm 25,0$	$84,9 \pm 59,1$	1,8
Rutina			$28,1 \pm 1,0$	$26,2 \pm 0,3$	$47,2 \pm 16,2$	$94,9 \pm 8,3$	0,5

C_o - concentração inicial da solução do analito

C_s - concentração do analito livre no equilíbrio

Q – capacidade de adsorção da Quer ou Rut pelo polímero

IF - Fator de impressão (razão da resposta MIS vs NIS)

3.4. Estudo de dessorção

A Tabela 13 mostra os resultados da adsorção, dessorção, volume de solvente extrator e a quantidade de MIS-0,01 usados nos cartuchos de SPE. Pode-se observar que a adsorção em cartuchos contendo 400 mg de MIS-0,01 apresentaram maiores capacidades adsorptivas quando comparadas aos cartuchos de 200 mg. Em relação à dessorção da Quer adsorvida no MIS-0,01, pode-se verificar que no cartucho de 400 mg a dessorção foi mais eficiente quando aplicado 8 mL de etanol do que com a mistura etanol:água (99,6% contra 49,5%), respectivamente. Como o etanol foi a condição mais efetiva para romper as ligações químicas envolvidas na interação entre MIS-0,01 e Quer, este solvente extrator foi selecionado para a próxima etapa.

Tabela 13. Avaliação dessorção do MIS-0,01 em etanol:água e etanol com 200 e 400 mg de MIS-0,01.

	Etanol : água (60:40)		Etanol 100%	
	200 mg	400 mg	200 mg	400 mg
Adsorção (%)	3,9	28,8	3,3	26,3
Dessorção (%)	110,7	49,5	106,1	99,6
Volume (mL)	2	10	2	8

A Tabela 14 mostra os valores encontrados para adsorção e dessorção dos cartuchos contendo 200 e 400 mg de MIS-0,01 em triplicada. Observa-se que os resultados obtidos de adsorção e dessorção são similares ao do estudo anterior o que confirma que realmente o cartucho com 400 mg apresenta maior capacidade adsorptiva comparado ao de 200 mg. Verifica-se que 8 mL de etanol puro como solvente extrator foi suficiente para extração da Quer e proporcionou uma boa precisão ao SPE.

Tabela 14. Avaliação da reprodutibilidade do MIS-0,01 usando etanol como solvente de dessorção reutilizando os mesmos cartuchos anteriores.

	200	400
Adsorção (%)	3,6 ± 0,2	29,4 ± 2,6
Dessorção (%)	109,8 ± 2,6	98,0 ± 4,3

Desvios padrão das medidas realizadas em triplicata (n=3).

Após a seleção do solvente extrator e da quantidade de MIS-0,01 para o preparo do cartucho, foi otimizado o volume do solvente extrator a ser empregado nos cartuchos contendo 400 mg de MIS-0,01 por meio de ensaio em triplicata.

Na Figura 42 pode-se observar que 8,0 mL de etanol foram suficientes para a dessorção de toda Quer adsorvida (101,4 ± 0,3 %). Na Tabela 15 observa-se que com 400 mg de MIS-0,01 e 8,0 mL de solvente extrator obteve-se uma boa repetitividade para a dessorção. Em vista a essas observações, a dessorção da Quer na amostra real de *Ginkgo biloba* L. será conduzida com etanol puro, solvente extrator, e em cartucho de SPE contendo 400 mg de MIS-0,01.

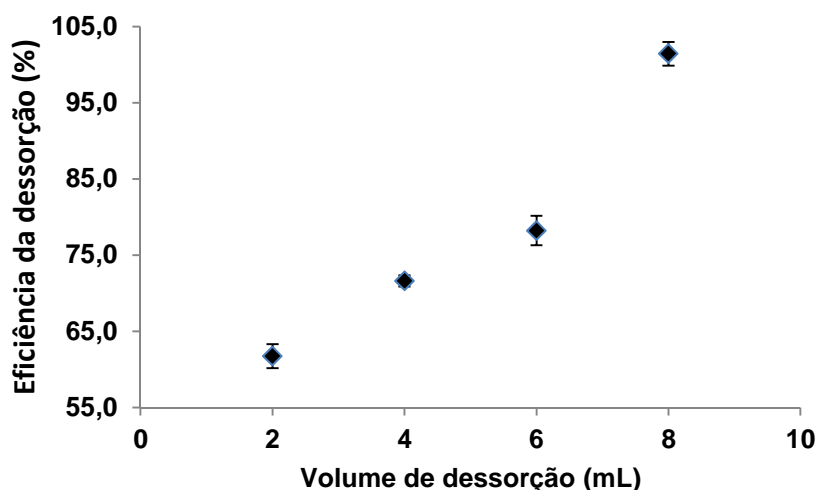


Figura 42. Avaliação da eficiência de dessorção (%) com o volume do solvente etanol (mL) em MIS-0,01 (400 mg).

Tabela 15. Avaliação da adsorção/dessorção do MIS-0,01 (400 mg) com uso do etanol puro na dessorção da Quer no espectrofotômetro UV-Vis.

	Adsorção da Quer (%)	Dessorção (%)
	26,3	99,6
	27,5	104,5
	25,8	100,2
Média	26,5 ± 0,4	101,4 ± 0,3

3.5. Avaliação preliminar da eficiência do MIS-0,01 e NIS-0,01 em SPE

Para avaliar a eficiência de adsorção da Quer no cartucho de SPE contendo MIS-0,01 e NIS-0,01, o estudo foi conduzido conforme procedimento descrito na seção 2.6. Os ensaios de percolar as soluções padrão pelo cartucho de MIS-0,01 foi definido na etapa de dessorção, enquanto que o volume de solução para eluir o analito de interesse do MIS-0,01 foi de 8 mL de etanol. Contudo, diante da não disponibilidade do gás nitrogênio para evaporar essa grande quantidade de solvente utilizado no momento da dessorção e que a não evaporação do mesmo causaria uma grande diluição da Quer na amostra, decidiu-se prosseguir o ensaio adicionando

apenas 2 mL do etanol puro para a dessorção do analito. Esse volume foi selecionado mesmo considerando o resultado da Figura 42, que apontou uma dessorção de 60%.

Para avaliar a eficiência percentual de todo o processo de adsorção do cartucho de SPE produzido, pode-se utilizar a razão das alturas do pico de Quer nos padrões que foram percolados através do SPE em relação à altura do pico de Quer nos padrões que não utilizaram o cartucho multiplicado por 100. Na Tabela 16 pode-se observar que a eficiência da adsorção obtida comparando as alturas obtidas nos padrões das duas curvas analíticas desenvolvidas (Figura 43) foi de $17,4 \pm 1,8$ % da curva A1 (sem MIS) em relação à curva B1 (após MIS). Apesar do baixo desvio, pode-se observar uma tendência na qual à medida que se aumenta a concentração do padrão a eficiência tende a valores menores quando usado apenas 2 mL de etanol na dessorção.

Tabela 16. Avaliação da eficiência de adsorção das curvas analíticas a partir do padrão de Quer sem e após passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01 e a dessorção com 2 mL de etanol.

Padrão [Quer] (mg L ⁻¹)	Altura do pico (mAU)		Eficiência da adsorção (%)
	Após MIP	Sem MIP	
5	0,82	4,09	20,04
10	1,38	7,61	18,1
20	2,61	16,17	16,2
40	4,89	31,80	15,4

A Figura 43 mostra as duas curvas analíticas obtidas, a de maior sensibilidade sem percolar às soluções padrão pelo cartucho (Curva A1) e a de menor sensibilidade onde as soluções foram percoladas pelo cartucho (Curva B1). Apesar da menor sensibilidade observada na curva B1, reflexo das perdas ocorridas durante a etapa de adsorção e dessorção, observa-se um excelente ajuste ($R^2=0,9998$), o que indica que essas perdas foram aproximadamente constantes ou com pequena variação entre os padrões. É importante destacar que o mesmo cartucho de SPE contendo MIS-0,01 foi utilizado com todos os padrões e pode-se verificar que o elevado coeficiente de correlação da curva analítica obtido demonstra a potencialidade, reprodutibilidade e reuso do cartucho desenvolvido. O limite de detecção obtido para curva B1 foi de 3,9

mg L⁻¹. A Curva A1 também apresentou um excelente ajuste ($R^2=0,9996$) para a regressão obtida com limite de detecção de 0,2 mg L⁻¹ respectivamente.

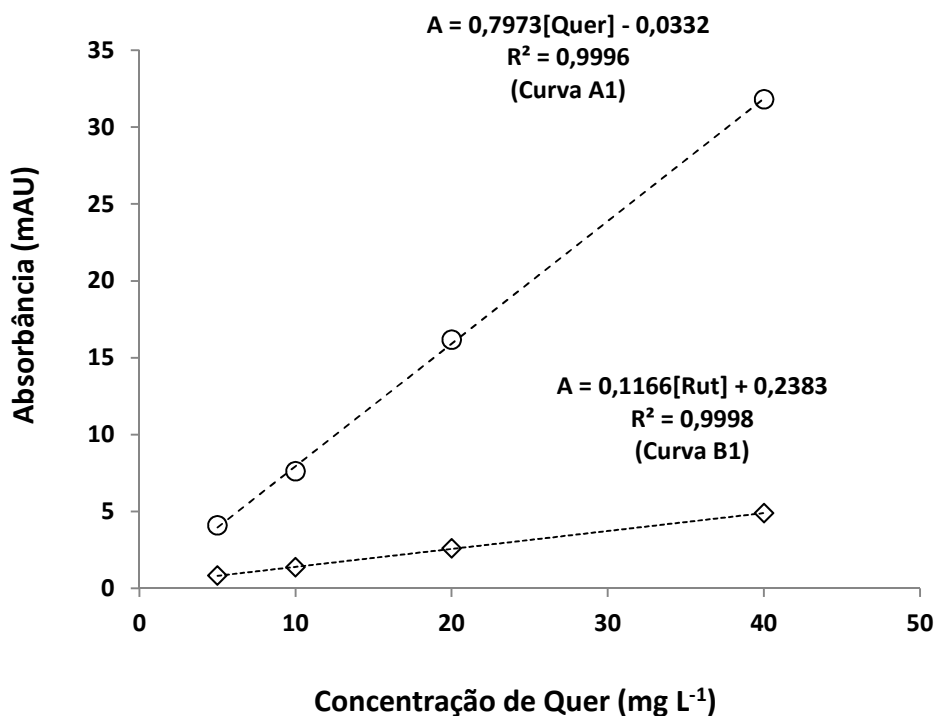


Figura 43. Curva analítica da solução padrão de Quer sem passar pelo cartucho (Curva A1) e após extração do cartucho de SPE com MIS-0,01 (Curva B1).

Sabendo que durante os processos de adsorção e dessorção da amostra de Quer perdas do analito ocorrem, é necessário utilizar um método que considere essas perdas ou que utilize um fator de correção para a estimativa correta da concentração de Quer em uma amostra real. Nesse sentido, duas propostas podem ser consideradas: (a) obter a concentração de Quer pela curva analítica de maior sensibilidade e utilizar a eficiência média obtida, que neste caso foi (17,4%) com uso de 2 mL de etanol, como um fator de correção (FC) ou (b) determinar a concentração de Quer diretamente na curva de menor sensibilidade, pois esta já considera as perdas e erros decorrentes de todo o processo.

A Figura 44 mostra os cromatogramas obtidos para as amostras de *Ginkgo biloba* L. que foram percoladas pelo cartucho contendo MIS-0,01 e NIS-0,1, e dessorvidas com 2 mL de etanol. A análise por CLAE mostrou que o cromatograma do MIS-0,01 (Figura 44) apresentou menor quantidade de interferentes do que o NIS-0,01, principalmente para tempo de retenção inferior a 7 min. Em relação à Quer foi

evidenciado um pequeno pico para ambos os polímeros, devido à etapa de dessorção que ficou comprometida.

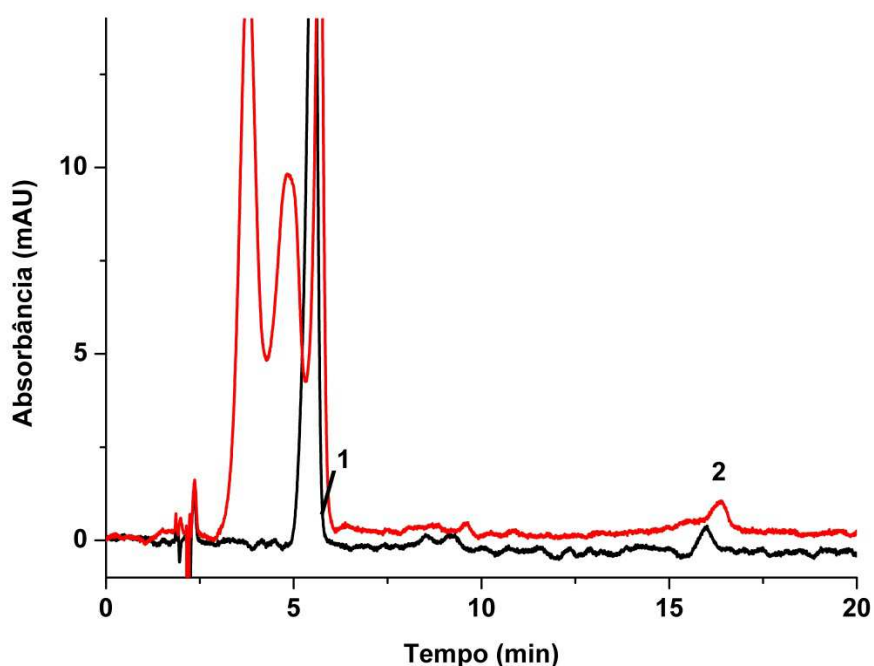


Figura 44. Cromatogramas obtidos após extração de *Ginkgo biloba* L. de 40 mg em cartuchos de NIS-0,01 (—) e MIS-0,01 (—) utilizando 2 mL de etanol na etapa de dessorção. Picos (1) Rut e (2) Quer.

3.6. Avaliação do desempenho analítico da sílica impressa em SPE

Tendo em vista os baixos desvios padrões obtidos nos resultados na curva analítica percolada pelo SPE contendo MIS-0,01 e que o mesmo reduziu consideravelmente a quantidade de interferentes da amostra, esse cartucho foi avaliado na análise de duas amostras de *Ginkgo biloba* L. contendo 40 mg e 80 mg. Contudo, nessas análises foram empregados 8 mL na etapa de eluição (dessorção), seguido de secagem com gás nitrogênio e redissolução em 1 mL de etanol:água (60:40, v/v).

As Figuras 45A e 45B mostram dois cromatogramas sendo o primeiro baseado nas soluções padrão de Quer que não foram percoladas pelo MIS-0,01 e a segunda após percolação das soluções padrão pelo cartucho e extração, utilizando agora 8 mL

de etanol na etapa de dessorção. Pôde-se observar um tempo de análise de 20 min e que na análise do padrão de Quer de 20 mg L⁻¹ foi obtido um pequeno pico em 11,2 minutos (Figura 45B) atribuído a um interferente, mas que não prejudicou a quantificação desse padrão.

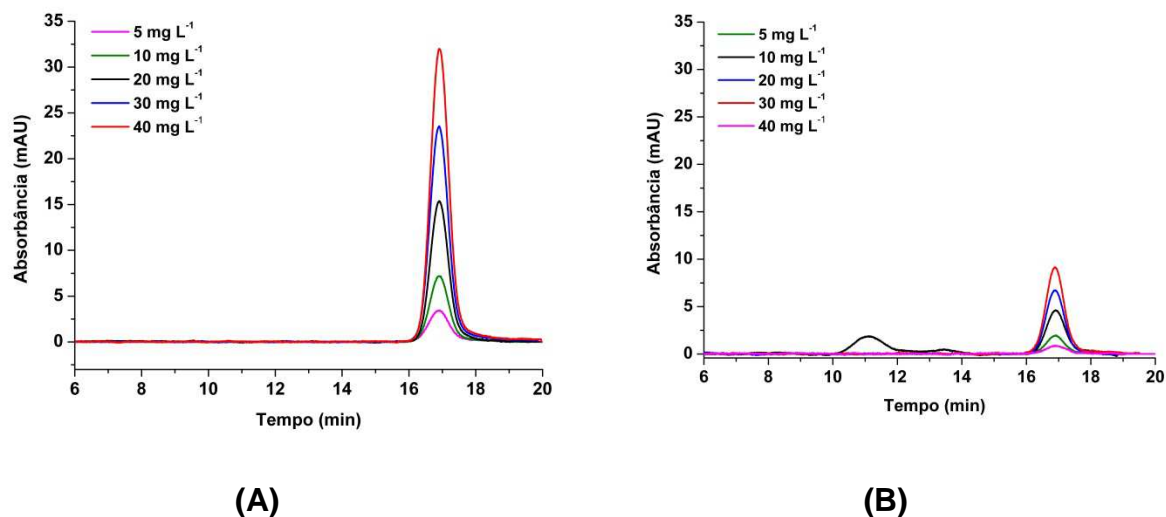


Figura 45. Cromatogramas com soluções padrão de Quer na obtenção da curva analítica sem (A) e após (B) passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01.

Na Tabela 17 pode-se conferir que a eficiência média de todo o processo obtido para os padrões, calculada a partir das alturas do pico de Quer nos padrões das duas curvas, foi de $28,0 \pm 0,7\%$ da curva A2 em relação à curva B2. Observa-se que a eficiência foi maior que a obtida no ensaio anterior ($17,4 \pm 1,8\%$), que utilizava apenas 2 mL na etapa de dessorção. Além disso, o desvio padrão obtido foi menor, indicando melhora na precisão em repetidas utilizações do cartucho. Além do mais, a tendência decrescente nas eficiências à medida que se aumentava a concentração dos padrões na Tabela 16, não foi observada nesses resultados.

Tabela 17. Avaliação da eficiência de adsorção das curvas analíticas a partir do padrão de Quer sem e após passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01.

Padrão [Quer] (mg L ⁻¹)	Altura do pico		Eficiência da adsorção (%)
	Após MIS-0,01	Sem MIS-0,01	
5	0,90	3,45	26,07
10	1,98	7,34	26,97
20	4,60	15,39	29,89
30	6,76	23,58	28,67
40	9,17	32,04	28,63

Na Figura 46 observa-se que as curvas analíticas obtidas para os padrões de Quer sem percolar (Curva A2) e após percolação pelo cartucho contendo MIS-0,01 (Curva B2), apresentaram ajustes iguais a 0,9998 e 0,9992, respectivamente. Apesar da menor sensibilidade ainda observada na curva B2 em relação a curva A2, os resultados indicam que quando foi utilizado um maior volume de etanol na dessorção da Quer obteve-se melhor sensibilidade para a Curva B2. Calculando a razão das inclinações das curvas B1 da Figura 43 (seção 3.5) e B2, obtém-se como resultado 2,03, indicando que a utilização de 8 mL de etanol na etapa de eluição, secagem e redissolução da amostra dobraram a sensibilidade do método proposto que considera as perdas no uso do cartucho SPE contendo MIS. O limite de detecção obtido para a curva B2 foi de 1,72 mg L⁻¹ e para Curva A2 de 1,19 mg L⁻¹, os quais evidenciam a melhora no método da curva B2.

O limite de detecção (LD) foi baseado na sensibilidade da curva analítica e no ruído instrumental medido no padrão de mais baixa concentração da curva analítica considerando a região antes e após o pico cromatográfico, conforme Equação L.

$$LD = 3,3 \frac{S_{ruído}}{Inclinação} \quad (L)$$

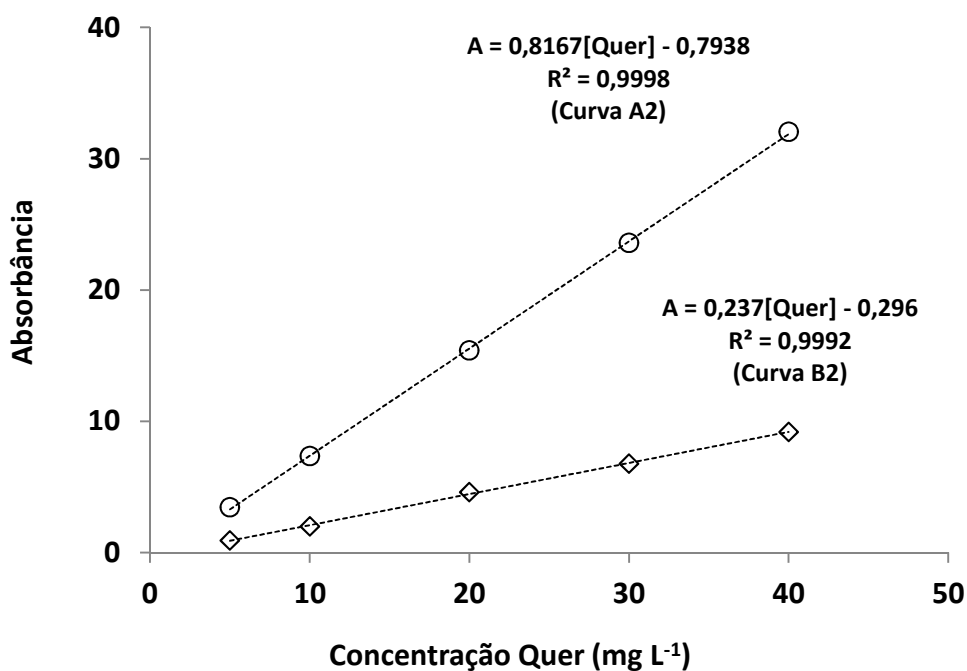


Figura 46. Curva analítica do padrão de Quer sem (Curva A2) e após (Curva B2) passar pelo cartucho de SPE com MIS-0,01.

Na Figura 47 podem ser visualizados os cromatogramas das amostras de *Ginkgo biloba* L. de 40 mg e 80 mg sem passar pelo cartucho de SPE, onde observa-se que a maioria dos compostos presentes não apresentam boa resolução. Nesses cromatogramas aparecem a Rut (pico 1) como pico mais intenso presente na amostra de *Ginkgo biloba* L. e a Quer (pico 2), que apresenta sobreposição com um interferente da amostra o que dificulta sua quantificação realizando a injeção direta da amostra no cromatógrafo.

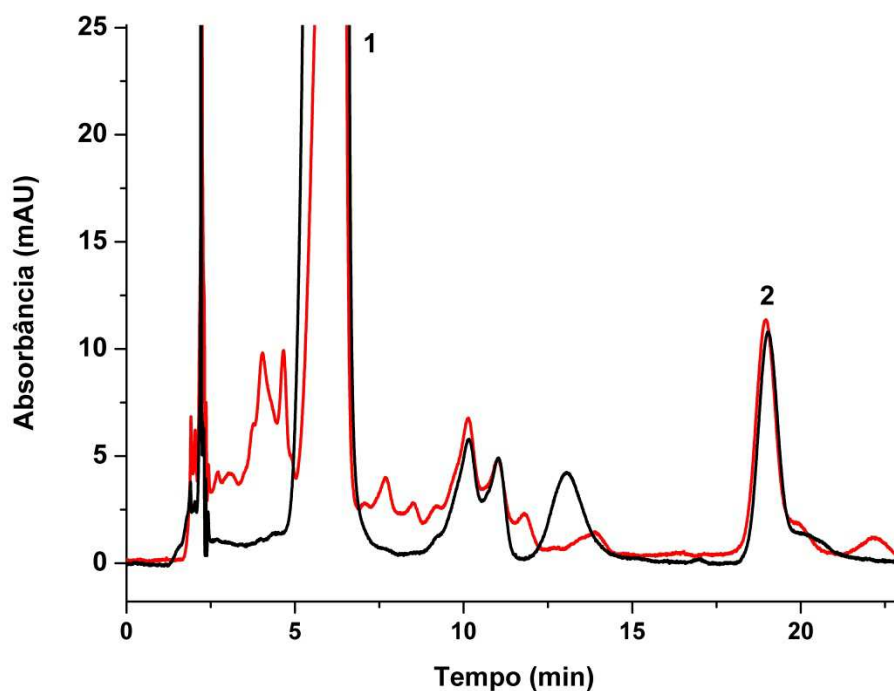


Figura 47. Cromatogramas de CLAE de *Ginkgo Biloba* L. de 40 mg (—) e 80 mg (—) sem passar pelo cartucho com MIS-0,01. Identificação dos picos (1) Rut e (2) Quer.

As Figuras 48 e 49 apresentam os cromatogramas do extrato de *Ginkgo biloba* L. de 40 mg e 80 mg, respectivamente, antes e após serem percolados pelo cartucho de extração contendo MIS-0,01. Pode ser observado que após a extração da amostra pelo cartucho os cromatogramas apresentaram picos de menor intensidade e com menos interferentes. Além disso, verificou-se uma ótima resolução para o pico de Quer. Estes resultados mostram que o método proposto para extração da Quer mostrou ser eficaz e resolveu o problema de sobreposição de interferente para o pico de Quer nas duas amostras analisadas.

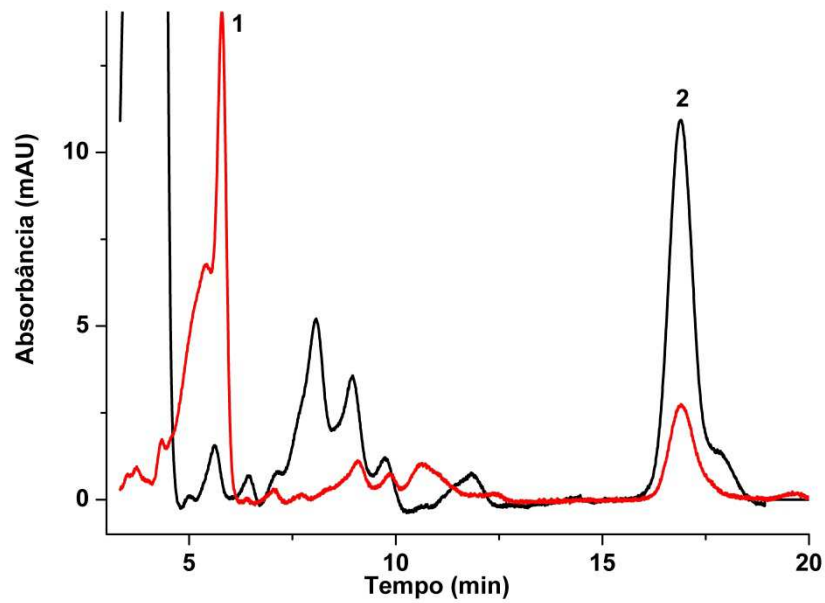


Figura 48. Cromatogramas de CLAE de *Ginkgo Biloba* L. de 40 mg sem (—) e após (—) passar pelo cartucho com MIS-0,01. Identificação dos picos (1) Rut e (2) Quer.

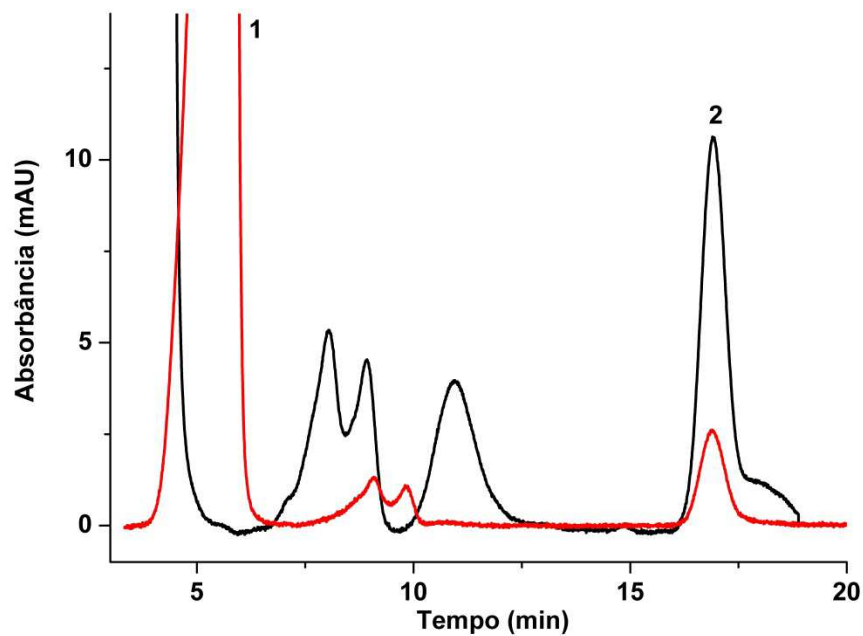


Figura 49. Cromatogramas de CLAE de *Ginkgo Biloba* L. de 80 mg sem (—) e após (—) passar pelo cartucho com MIS-0,01. Identificação dos picos (1) Rut e (2) Quer.

A Tabela 18 mostra as estimativas da concentração de Quer obtida para as duas amostras de extrato de *Ginkgo biloba* L. quando injetada diretamente no CLAE e analisada pela curva analítica A2 usando o fator de correção de $28,0 \pm 0,7$ % (Procedimento a) e diretamente com curva analítica B2 (Procedimento b). Verifica-se que os valores obtidos pelos dois procedimentos são relativamente próximos para a concentração de Quer. Esta diferença entre os resultados é justificada pelo fato de terem sido usados cartuchos diferentes para aplicar as soluções padrão de Quer para construir a curva analítica B2 e outro cartucho para as amostras analisadas. O cartucho foi reutilizado por 5 vezes, mas devido o não conhecimento da limitação do MIS-0,01 foi escolhido utilizar outro cartucho para aplicar as amostras. Vale destacar que todos os procedimentos de lavagem com etanol 100%, secagem a 60 °C por 30 min e condicionamento (etanol:água 60:40) foram executadas para os dois cartuchos preparados, sendo esperado uma eficiência muito próxima entre eles.

Observa-se na Tabela 18 que os erros médios obtidos por ambos os procedimentos a e b para os extratos *Ginkgo biloba* L. foram baixos, o que pode ser considerado um bom resultado devido à complexidade da amostra e da heterogeneidade apresentada pelo MIS-0,01. Em relação aos valores obtidos da análise da Quer pela curva B2, este procedimento foi considerado o mais adequado para a determinação da concentração da Quer na amostra, o qual já considera as perdas de todo o processo de análise e a quantificação do analito. Neste caso não há necessidade de aplicar o fator de correção (FC) que é obtido a partir da construção de duas curvas (sem e após percolar os padrões pelo MIS-0,01).

Tabela 18. Resultado comparativo da amostra de *Ginkgo biloba* L. com o uso das curvas analíticas sem e após percolar pelo SPE contendo MIS-0,01.

<i>Ginkgo biloba</i> L.	Concentração de Quer (mg L^{-1})			Análise pela curva B2
	Análise pela curva A2		Análise pela curva B2	
	Análise direta por CLAE	Sem correção das perdas		
40 mg	$15,0 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$14,9 \pm 0,9$	$12,3 \pm 0,4$
80 mg	$14,4 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,2$	$14,6 \pm 0,9$	$12,1 \pm 0,4$

Levando em consideração as especificações dos medicamentos analisados, o *Ginkgo biloba* L. de 40 mg e 80 mg, devem apresentar 9,6 mg e 19,2 mg de flavonóides totais, respectivamente, não sendo especificada a quantidade de Quer. A partir do método proposto, foram encontrados $0,25 \pm 0,01$ mg/comprimido e $0,24 \pm 0,01$ mg/comprimido de Quer que correspondem a 2,6 % e 1,3 %, respectivamente, da quantidade de flavonóides presentes nos extratos de 40 mg e 80 mg. Estes valores são consistentes com valores encontrados na literatura⁵ do extrato de *Ginkgo biloba* L. na qual a faixa variou de 0,5 a 4,7 % da quantidade de Quer em relação aos outros ativos presentes no fitoterápico.

É importante ressaltar que o MIS-0,01 utilizado como SPE apresentou um eficiente desempenho analítico na análise do extrato de *Ginkgo biloba* L. após a reutilização do cartucho por 5 vezes. Estudos baseados em análise da FRX/EDX e de TG do MIS-0,01 sem reuso (Figura 50) e após o reuso (Figura 51) mostraram que as perdas de íons Al^{3+} durante o processo adsorção/dessorção do MIS-0,01 foi de apenas $4,75 \times 10^{-5}$ mmol (1,12 %) o que possivelmente contribuiu para uma adsorção seletiva de Quer e a reutilização do SPE.

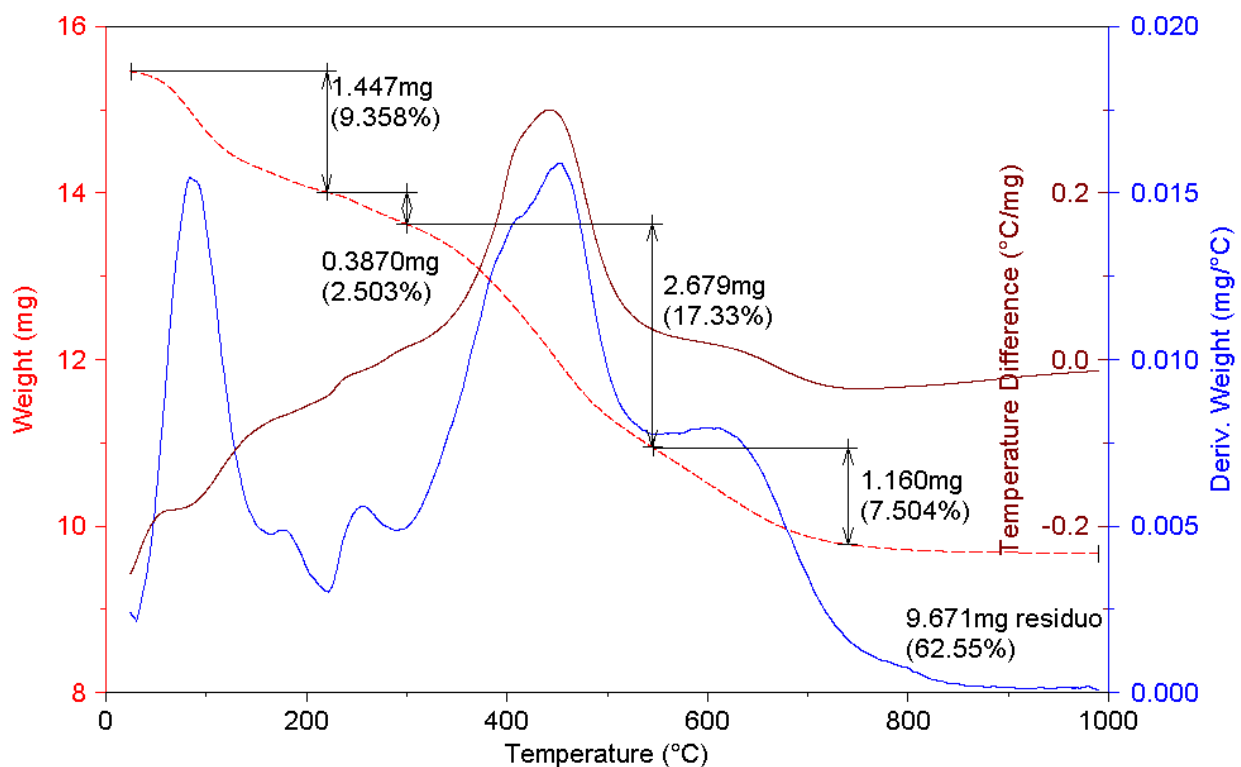


Figura 50. Gráfico produzido na análise termogravimétrica da amostra do MIS-0,01 sem reuso do cartucho.

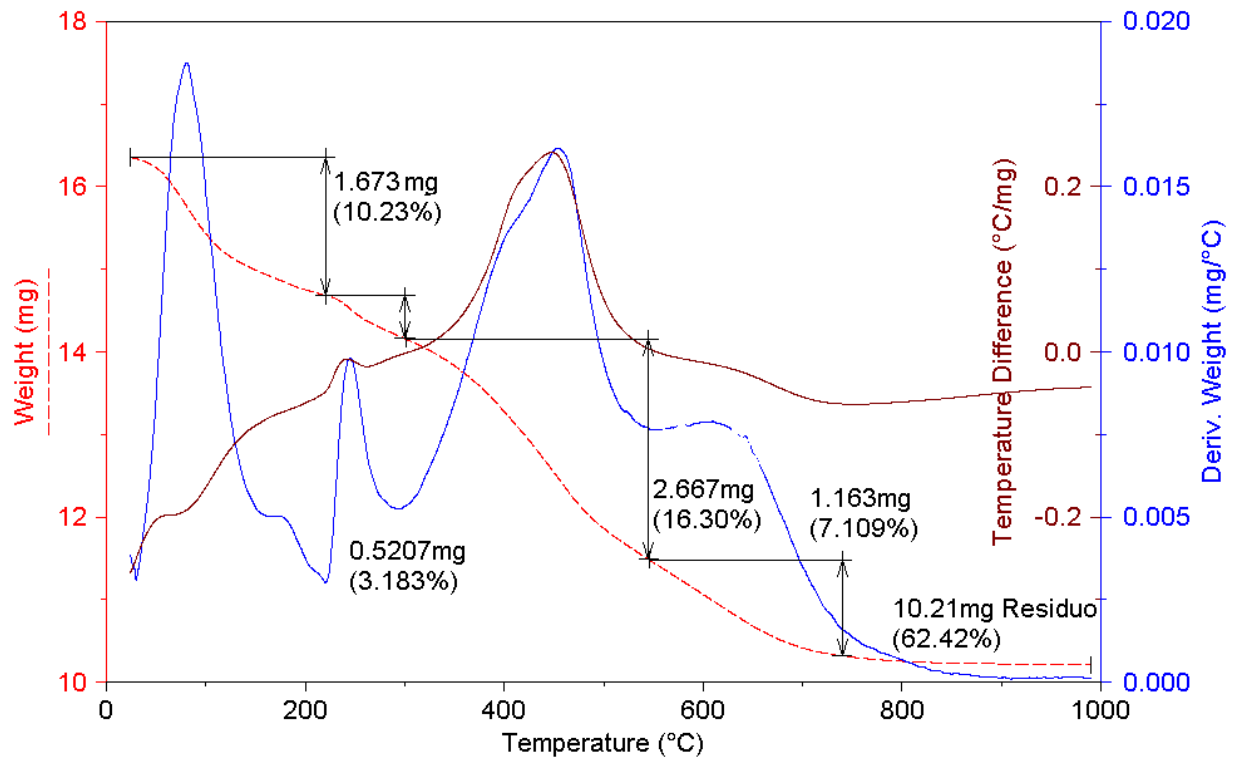


Figura 51. Gráfico produzido na análise termogravimétrica da amostra do MIS-0,01 após o reuso do cartucho por 5 vezes.

4. Considerações Finais

As sílicas impressas molecularmente com quercetina mediadas sem e com íons Al^{3+} foram facilmente sintetizadas pelo processo sol-gel. Além disso, o procedimento foi simples, rápido e realizado a temperatura de 25 °C. Estudos de caracterização mostraram que as sílicas impressas e não impressas apresentaram as mesmas características espectrais por FTIR, no entanto as áreas superficiais e os volumes dos poros das sílicas impressas foram maiores que o das sílicas não impressas, sendo que todos os materiais foram caracterizados como microporosos. A técnica de FRX/EDX foi eficaz para o cálculo da razão Si/Al, que mostrou resultados coerentes devido a quantidade de íons metálicos que foram incorporados aos polímeros sintetizados MIS-0,01 e MIS-0,1 e seus respectivos polímeros controle.

Para avaliar a eficiência da adsorção do MIS, MIS-0,01 e MIS-0,1 e seus respectivos NIS, estudos de adsorção em metanol e em etanol:água foram realizados e ficou constatado que os sítios de ligação específicos das sílicas impressas permitiram maiores adsorções da quercetina em etanol:água do que das sílicas não impressas, fato confirmado pelos fatores de impressão (IF) maiores que 1. Em relação à isoterma de adsorção o perfil da curva seguiu uma tendência crescente indicando um relação de afinidade entre MIS-0,01 e a Quer, fato não observado com o polímero controle.

A seletividade do MIS-0,01 foi comparada ao NIS-0,01, e o estudo indicou maior presença de ligações específicas do MIS-0,01 pela quercetina em presença do análogo rutina. Em relação ao estudo de dessorção em cartucho de extração em fase sólida com 400 mg de MIS-0,01 foi verificado que 8 mL de etanol puro foi suficiente na extração da quercetina, sendo obtida boa precisão nos resultados.

O material proposto (MIS-0,01) preparado pelo processo sol-gel demonstrou ser um material eficiente, reprodutível e seletivo na extração de quercetina em amostra de extrato *Ginkgo biloba* L. de 40mg e 80 mg. Os cromatogramas apresentaram excelente resolução para o pico de quercetina sem a sobreposição de interferentes. Além disso, uma grande vantagem apresentada pelo SPE contendo MIS-0,01 foi a reutilização do cartucho por 5 vezes mantendo a sua eficiência constante e apresentou uma baixa perda de íons Al^{3+} durante o processo de adsorção/dessorção da quercetina.

Conclusões gerais

Conclusões gerais

A síntese do polímero impresso molecularmente (MIP) baseado em ácido metacrílico mediado com íons metálicos como monômero funcional resultou em um material que não mostrou boa precisão e seletividade adequada como SPE para quercetina. Por outro lado, a síntese da sílica impressa molecularmente (MIS) baseada no processo sol-gel usando 3-aminopropiltrióxissilano (APTMS) e tetraetoxissilano (TEOS) em presença dos íons Al^{3+} apresentou potencialidade adequada para ser empregada em SPE para extração de quercetina. Além disso, a síntese mostrou simplicidade e rapidez no procedimento de obtenção dos polímeros.

Devido à complexidade da amostra de extrato de *Ginkgo biloba* L. o uso de MIS-0,01 em SPE surgiu como uma opção viável para extração mais seletiva da quercetina em presença de outros compostos e com isso foi possível a obtenção de cromatogramas mais limpos e livres de interferentes que pudessem comprometer a identificação e quantificação do analito de interesse. Além disso, uma grande vantagem apresentada pelo MIS-0,01 aplicado a SPE foi a sua reutilização por 5 vezes, enquanto que os sorventes comerciais são recomendados para uso apenas uma vez.

Perspectivas futuras

- Preparar cartuchos de SPE contendo maiores quantidades de sílica impressa (MIS-0,01) de 600, 800 e 1200 mg e avaliar a eficiência da adsorção e dessorção para a quercetina.
- Realizar estudos de reutilização do cartucho de SPE com a sílica impressa para avaliar seu potencial de repetibilidade, linearidade e recuperação frente à molécula de quercetina.
- Sintetizar novas sílicas impressas para quercetina pelo PSG e empregar um planejamento experimental usando diferentes variáveis, tais como, concentração e tipo de metais, natureza e tipo do catalisador (ácido ou básico) e os tipos de precursores.
- Ampliar a aplicação do SPE contendo a sílica impressa de quercetina para amostras de chás, vinhos e vegetais.

Referências bibliográficas

- ¹ <http://www.egiptologia.org/fuentes/papiros/ebers>, pesquisado em 20/04/11.
- ² Behling, E.B.; Sendão, M.C.; Francescato, H.D.C.; Antunes, L.M.G.; Bianchi, M.L.P.; *Alim. Nutr.* **2004**, *15*, 285.
- ³ Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 89, de 20 de janeiro de 2004. “Lista de Produtos de Registro Simplificado”.
- ⁴ The United States Pharmacopeia – USP 30, The Official Compendia of Standards – NF 25, official monographs, Rockville, 2007, pg. 172.
- ⁵ Deng, F.; Zito, S.W.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *986*, 121.
- ⁶ Kataoka, H.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 232.
- ⁷ Carius, H.; *Hist. Cienc. Saude-Manguinhos* **1999**, *6*, 430.
- ⁸ Pozzi, A.C.S. Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do maracujá. Dissertação MS, IQSC, São Paulo, USP, 2007, 86p.
- ⁹ Yunes, R.A.; Pedrosa, R.C.; Filho, V.C.; *Quim. Nova.* **2001**, *24*, 147.
- ¹⁰ Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre os medicamentos fitoterápicos. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 29 março 2010.
- ¹¹ Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 13 de 14 março de abril de 2013. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação dos produtos tradicionais fitoterápicos. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 março 2013.
- ¹² Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Virgata, G.; Barcellona, M. L.; Vanella A.; *Cell. Biol. Toxicol.* **2000**, *16*, 91.
- ¹³ Denisov, E. T.; Afanas'ev, I. B. Oxidation and antioxidants in organic Chemistry and Biology. CRC Press: Boca Raton, 2005, 981.
- ¹⁴ Dai, K.; Vlessidis, A. G.; Evmiridis, N. P.; *Talanta*, **2003**, *59*, 55.
- ¹⁵ Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T.; Ferraz, C.; Alencar, S. M. *Braz. J. Food Technol.* **2006**, *9*, 209.
- ¹⁶ Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen. T. M.; *Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 7915.
- ¹⁷ Goldstein, S.; Czapski, G.; *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 505.
- ¹⁸ Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.T.; *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1112*, 31.
- ¹⁹ Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Capasso, F.; *Life Sci.* **1999**, *65*, 337.
- ²⁰ Cao, G.; Sofic, E.; Prior. R. L.; *Free Rad. Biol. Medic.* **1997**, *22*, 749.

-
- ²¹ Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga. G. *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 152.
- ²² Ji, Y.; Xu, Q.; Hu, Y.; Heyden, Y.; *J. Chromatogr. A* **2005**, 1066, 97.
- ²³ Diamond, B.J.; Shiflett, S.C.; Feiwei, N.; Matheis, R.J.; Noskin, O.; Richards, J.A.; Schoenberger, N.E.; *Amh Phys Mad Rehabil.* **2000**, 81, 668.
- ²⁴ Ekberg, B.; Mosbach, K.; *Trends Biotechnol.* **1989**, 7, 96.
- ²⁵ Russo, N.; Toscano, M.; Uccella, N.; *J Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3232.
- ²⁶ Murota, K.; Terao, J.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 417, 12.
- ²⁷ Biesaga, M.; Pyrznska, K.; *Crit. Ver. Anal. Chem.* **2009**, 39, 95.
- ²⁸ Naczek, M.; Shahidi. F.; *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1054, 95.
- ²⁹ Sterbovs, D.; Matejcek, D.; Vlcek, J.; Kuban. V.; *Anal. Chim. Acta.* **2004**, 513, 435
- ³⁰ Escarpa A.; González. M. C.; *Anal. Chim. Acta.* **2001**, 427, 119.
- ³¹ Tura, D.; Robards, K.; *J. Chromatogr. A.* **2002**, 975, 71.
- ³² Merken, H. M.; Merken, C.D.; Beecher, G.R.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2727.
- ³³ Kumar, A.; Malik, A.K.; Tewary, D.K.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, 631, 177.
- ³⁴ Wach, A.; Pyrzynska, K. Biesaga, M.; *Food Chem.* **2007**, 100, 699.
- ³⁵ Sultana, B.; Anwar, F.; *Food Chem.* **2008**, 108, 879.
- ³⁶ Zielinska, D.; Nagels, L.; Piskula, M.K.; *Anal. Chim. Acta.* **2008**, 617, 22.
- ³⁷ Merken, H. M.; Beecher, G. R.; *J. Chromatogr. A.* **2000**, 897, 177.
- ³⁸ Pietta, P.; *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035.
- ³⁹ Cui, H.; Zhang, Q.; Myint, A.; Ge, X.; Liu, L.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* **2006**, 181, 238.
- ⁴⁰ Poole, C. F.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, 362.
- ⁴¹ Lanças, F. M. *Extração em Fase sólida (SPE)*; Rima, São Carlos, 2004.
- ⁴² Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; *Quim. Nova.* **2011**, 34, 1604.
- ⁴³ Queiroz, S.C.N.; Collins, C.H.; Jardim, I.; *Quím. Nova.* **2001**, 24, 68.
- ⁴⁴ Baggiani, C.; Baravalle, P.; Giraudi, G.; Tozzi, C.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1141, 158.
- ⁴⁵ Lasáková, M.; Jandera, P.; *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 799.
- ⁴⁶ Sellergren, B. *Molecularly Imprinted Polymers. Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*; Elsevier, Amsterdam, 2001.
- ⁴⁷ Pauling, L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2643.
- ⁴⁸ Dickey, F.H.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1949**, 35, 227.

-
- ⁴⁹ Yan, M.; *Molecularly imprinted materials: Science and Technology* Marcel Dekker, New York, 2005.
- ⁵⁰ Spivak, D. A.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1779.
- ⁵¹ Brown, M.E.; Puleo, D.A.; *Chem Eng J.* **2008**, *137*, 97.
- ⁵² Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z.; *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 182
- ⁵³ Ye, L.; Mosbach, K.J.; *Inclusion Phenom. Macrocyclic. Chem.* **2001**, *41*, 113.
- ⁵⁴ Qiao, F. X.; Sun, H. W.; Yan, H. Y.; Row, K. H.; *Chromatogr.* **2006**, *64*, 625.
- ⁵⁵ Wulff, G.; Haarer, J.; *Makromol. Chem.* **1991**, *192*, 1338
- ⁵⁶ Wulff, G.; Schauhoff, S.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 400.
- ⁵⁷ Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N.; *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 478.
- ⁵⁸ Fan, P.; Wang, B.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116*, 258.
- ⁵⁹ Lorenzo, R. A.; Carro, A. M.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 4327.
- ⁶⁰ Ellwanger, A.; Berggren, C.; Bayoudh, S.; Crecenzi, C.; Karlsson, L.; Owens, P.K.; Ensing, K.; Cormack, P.; Sherrington, D.; Sellergren, B.; *Analyst* **2001**, *126*, 784.
- ⁶¹ Levi, L.; Srebnik, S.; *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114*, 107.
- ⁶² Fu, G. Q.; Yu, H.; Zhu, J.; *Biomater.* **2008**, *29*, 2138
- ⁶³ Martin, P.; Jones, G. R.; Stringer, F.; Wilson, I. D.; *Analyst* **2003**, *128*, 345.
- ⁶⁴ Pang, X. S.; Cheng, G. X.; Li, R. S.; Lu, S. L.; Zhang, Y. H.; *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *550*, 17.
- ⁶⁵ Li, W. H.; Stover, H. D. H.; *Macromol.* **2000**, *33*, 4360.
- ⁶⁶ Wolman, F.J.; Smolko, E.E.; Cascone, O.; Grasselli, M.; *React. Funct. Polym.* **2006**, *66*, 119.
- ⁶⁷ Diáz-García, M.E.; Laino, R.B.; *Microchim. Acta.* **2005**, *149*, 19.
- ⁶⁸ Katz, A.; Davis, M. E.; *Macromol.* **1999**, *32*, 4121
- ⁶⁹ Sousa, M. D.; Barbosa, C. M.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1609.
- ⁷⁰ Yungerman, I.; Srebnik, S.; *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 657.
- ⁷¹ Machado, F.; Lima, E.L.; Pinto, J.C.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2007, *17*, 166.
- ⁷² Yoshida, M.; Hatate, Y.; Uezu, K.; Goto, M.; Furusaki, S.; *Colloids Surf. A* **2000**, *169*, 269.
- ⁷³ Lu, Y.; Li, C.; Zhang, H.; Liu, X.; *Analy. Chim. Acta.* **2003**, *489*, 43.
- ⁷⁴ Xie, J.; Zhu, L.; Luo, H.; Zhou, L.; Li, C.; Xu, X.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *934*, 11.

-
- ⁷⁵ Molinelli, A.; Weiss, R.; Mizaikoff, B.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1808.
- ⁷⁶ Huangfu, F.; Wang, B.; Li, M.; *J. Appl. Poly. Sci.* **2012**, *126*, 501.
- ⁷⁷ Pakade, V.; Lindahl, S.; Chimuka, L.; Turner, C.; *J. Chromatogr A* **2012**, *1230*, 15.
- ⁷⁸ Song, X.; Li, J.; Wang, J.; Chen, L.; *Talanta.* **2009**, *80*, 702.
- ⁷⁹ López, M.C.; Pérez, M.C.C.; García, M.S.D.; Vilarino, J. M. L.; Rodríguez, M.V.G.; Losada, L.F.B.; *Anal. Chim. Acta.* **2012**, *721*, 68.
- ⁸⁰ Mahony, J.O.; Nolan, K.; Smyth, m.R.; Mizaikoff, B.; *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *534*, 31.
- ⁸¹ Piletsky, S.A.; Andersson, H.S.; Nicholls, I.A.; *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 94.
- ⁸² Hu, Y.; Chung, Y. J.; Mackenzie, J. D.; *J. Mater. Sci.* **1993**, *28*, 6549.
- ⁸³ Jose, N. M.; Prado, L. A. S. A.; *Quím. Nova* **2005**, *28*, 281
- ⁸⁴ Dimitriev, Y., Ivanova, Y., Iordanova, R. J. Univ. Chem. Technol. *Metallurgy.* **2008**, *43*, 181.
- ⁸⁵ Gvishi, R.; *J Sol-Gel Sci Technol.* **2009**, *50*, 241
- ⁸⁶ Hiratsuka, R. S.; Santilli, C.V.; Pulcinelli, S.H.; *Quím. Nova.* **1995**, *18*,171.
- ⁸⁷ Niederberger, M.; Pinna, N.; Metal Oxide Nanoparticles in Organic Solvents Sybthesis, formation, assembly and application, 2009.
- ⁸⁸ Kakihana, M.; *J. Sol-gel Sci. Techonol.* **1996**, *6*, 7.
- ⁸⁹ Tarley, C.R.T.; Andrade, F.N.; Santana, H.; Zaia, D.A.M.; Beijo, L.A.; Segatelli, M.G.; *React. Funct. Polym.* 2012, *72*, 83.
- ⁹⁰ Airoidi, C.; Farias, R. F.; *Quim. Nova.* **2004**, *27*, 84.
- ⁹¹ Lee, S.; Chuang, F.; Tsai, Y.; *J. Polym. Res.* **2010**, *17*, 737.
- ⁹² Zhang, Y.; Zhang, Y.; Qin, Z.; Ma, Z.; *Front. Chem. China*, **2008**, *3*, 320.
- ⁹³ Wang, H.; Zhu, Y.; Lin, J.; Yan, X.; *Electrophoresis.* **2008**, *29*, 952
- ⁹⁴ Atta, N. F.; Hamed, M. M.; Abdel-Mageed, A.M.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *667*, 63.
- ⁹⁵ Alfaya, A.S.; Kubota, T.L.; *Quím. Nova*, **2002**, *25*, 835
- ⁹⁶ Arenas, L.T.; Aguirre, T.A.S.; Langaro, A.; Gushikem, Y.; Benvenutti, E.V.; Costam T.M.H.; *Polymer* **2003**, *44*, 5521
- ⁹⁷ Santilli, C.V.; Pulcinelli, S.H.; *Quím. Nova.* **1995**, *18*, 2
- ⁹⁸ Azolin, D.R.; Moro, C.C.; Costa, T.M.H.; Benvenutti, E.V.; *J. Non-Cryst. Solids.* **2004**, *337*, 3.
- ⁹⁹ Yang, P.; Hou, W.D.; Qiu, H.D.; Liu, X.; Jiang, S.X.; *Chin. Chem. Lett.* **2012**, *23*, 615.

- ¹⁰⁰ Wei, F.; Liu X.; Zhai, M.; Cai, Z. Xu, G.; Yang, J.; Du, Hu, Q.; *Food Anal. Methods* **2013**, *6*, 415.
- ¹⁰¹ Tsai, H.; Syu, M.; *Chem. Eng. J.* **2011**, *168*, 1369.
- ¹⁰² Farrington, K.; Regan, F.; *Talanta* **2009**, *78*, 653.
- ¹⁰³ Marestoni, L.D.; Sotomayor, M.D.P.T.; Segatelli, M.G.; Sartori, L.R.; Tarley, C.R.T.; *Quim. Nova*, in press.
- ¹⁰⁴ Gutierrez, A.C.; Gehlen, M.H.; *Spectrochim. Acta part A.* **2002**, *58*, 89.
- ¹⁰⁵ Dangleterre, L.; Cornard, Jean-Paul, Lapouge, C.; *Polyhedron.* **2008**, *27*, 1590.
- ¹⁰⁶ Sreenivasan, K.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *80*, 2799.
- ¹⁰⁷ Wu, L.; Li, Y.; *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *517*, 151.
- ¹⁰⁸ Qu, S.; Wang, X.; Tong, C. Wu, J.; *J Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 827.
- ¹⁰⁹ Hostettmamm, K.; Domon, B.; Schaufelberger, D.; Hostettmann, D.; *J. Chromatogr. A* **1984**, *83*, 137.
- ¹¹⁰ Dam, A.H.; Kim, D.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *108*, 24.
- ¹¹¹ Vilchis-Nestor, A.R.; Sanchez-Mendieta, V.; Urena-Nunez, F.; Lopez-Castanares R.; Ascencio, J.A.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *102*, 5223.
- ¹¹² Theodoridis, G.; Lasakova, M.; Skerikova, V.; Tegou, A.; Giantsiou, N.; Jandera, P.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2321.
- ¹¹³ Suárez-Rodríguez, J.L.; Diaz-Garcia, M.E.; *Anal. Chim. Acta.* **2000**, *405*, 76.
- ¹¹⁴ Weiss, R.; Molinelli, A.; Jakusch, M.; Mizaikoff, B.; *Bioseparation*, **2002**, *10*, 379.
- ¹¹⁵ Zeng, Huan., Wang, Y.; Liu, X.; Kong, J.; Nie, C.; *Talanta*, **2012**, *93*, 172.
- ¹¹⁶ Li, T.; Chen, P.; Nien, P.; Lin, C.; Vittal, R.; Ling, T.; Ho, K.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *711*, 83.
- ¹¹⁷ Lee, J.D.; Química Inorgânica: Não tão concisa. Blucher, São Paulo, 1999.
- ¹¹⁸ Xia, Y.; Guo, T.; Song, M.; Zhang, B.; Zhang, B.; *Reactive Funct. Polym.* **2006**, *66*, 1734.
- ¹¹⁹ IUPAC:commission on colloid and surface chemistry including catalysis. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1739.
- ¹²⁰ Caro, E.; Marcé, R.M.; Borrul, F.; Cornack, P.A.g.; Sherrington, D.C.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 143.
- ¹²¹ Sposito, G.; The Chemistry of soils. Oxford. University press, New York, 2008.

- ¹²² Umpleby, R.J., Baxter, S.C.; Chen, Y.; Shah, R.N.; Shimizu, K.D.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4584.
- ¹²³ Zhang, Y.; Zhang, Y.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2008**, *25*, 201.
- ¹²⁴ Razmara, R.S.; Daneshfar, A.; Sahraei, R.; *J. Chem. Eng.* **2010**, *55*, 39
- ¹²⁵ Muller, M.; Harvey, G.; Prins, R.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2000**, *34*, 135.
- ¹²⁶ Raof, S.F.A.; Mohamad, S.; Abas, M.R.; *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5952.
- ¹²⁷ Ribeiro, F.R.; Alvarez, F.; Henriques, C.; Lemos, F.; Lopes, J.M.; Ribeiro, M.F.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, *96*, 245.
- ¹²⁸ Loewenstein, W.; *Am. Min.* **1954**, *39*, 92.
- ¹²⁹ Debrassi, A.; Largura, M. C. T.; Rodrigues, C. A.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 764.