

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LAYLA TALITA DE OLIVEIRA ALVES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MIP
A PARTIR DA FENILALANINA VISANDO
SUA APLICAÇÃO NA TÉCNICA DE
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Geraldo de Sousa

Belo Horizonte, Fevereiro de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LAYLA TALITA DE OLIVEIRA ALVES

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MIP A PARTIR DA
FENILALANINA VISANDO SUA APLICAÇÃO NA TÉCNICA
DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Engenharia
Química – UFMG como requisito
parcial para obtenção do grau de
mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Geraldo de Sousa

Belo Horizonte – MG, Fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir mais esta conquista e por me dar força e coragem para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Francisco e Vanda, por sempre me apoiarem e pelo amor incondicional.

Em especial ao Prof. Ricardo Geraldo de Sousa, por me aceitar como orientada, pela paciência, dedicação e ensinamentos;

Ao Prof. Roberto Freitas e à Prof^a. Maria Elisa Scarpelli, por me receberem no Grupo de Pesquisa em Géis e Polímeros e pelos ensinamentos;

À Cynthia Erbeta, pela contribuição e presteza durante toda a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Gabriel e Ana, pelo apoio constante, companheirismo nos momentos difíceis e de alegria e por sempre me incentivarem. Amo vocês!

Ao Célio Brandão, pelo carinho, apoio, incentivo e ajuda.

À Prof^a Tânia e ao Prof. Christian Fernandes, pela ajuda no decorrer do trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Géis e Polímeros, especialmente à Anamaria, Mariana, Raquel Azevedo, Karen, Adriana, Emilene, Getúlio, pela amizade, momentos de descontração e de contribuição na pesquisa.

Aos amigos, familiares e todos aqueles que contribuíram para esta conquista.

Ao apoio financeiro da FAPEMIG, CEMIG, PETROBRÁS, CAPES e CNPq.

Ao Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros da UFMG e ao Departamento de Engenharia Química da UFMG pelas instalações para a realização desse projeto.

RESUMO

Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs) foram sintetizados e caracterizados para aplicação na técnica de extração em fase sólida (SPE), visando a determinação de fenilalanina (Phe). Os MIPs foram sintetizados a partir do ácido metacrílico, fenilalanina, etileno glicol dimetacrilato, 2,2-azobisisobutironitrila, em clorofórmio. Também foram sintetizados Polímeros Não Impressos (NIPs) para controle da seletividade química dos MIPs. Nesse estudo variou-se a razão “molécula molde / monômero funcional” de forma a otimizar as condições de síntese que ocorreu em temperatura de 4°C sob irradiação UV. A dessorção do molde foi realizada em extrator de Soxhlet por 64 horas e monitorada via leitura em espectrofotômetro UV-Vis. Foram realizadas 10 sínteses, sendo 8 MIPs e 2 NIPs. Desses, 3 MIPs foram escolhidos como objeto de estudo por apresentarem diferentes proporções de molécula molde e monômero funcional, permitindo-se investigar a influência dessas proporções na formação de sítios específicos. Os MIPs e NIPs foram caracterizados empregando-se as seguintes técnicas de análise: FTIR, UV-Vis, MEV, DSC e TG. Foram analisados não somente os produtos de reação, mas também os monômeros e a molécula molde. Os MIPs também foram avaliados quanto à capacidade de adsorção comparando-os aos NIPs para o seu uso em SPE. Dentre os MIPs sintetizados e avaliados, dois apresentaram boa capacidade adsorptiva de fenilalanina, com um grau de adsorção entre 54 e 56%. Comparando-os aos NIPs, para os quais foi obtido um grau de adsorção em torno de 11,7%, foi possível concluir que esses MIPs apresentaram-se específicos para a determinação da Phe. Os MIPs avaliados por MEV apresentaram superfície mais porosa após o processo de extração. A estabilidade térmica dos MIPs, investigada por análise térmica, indicou que eles podem ser aplicados como sorvente para diversos tipos de amostras, uma vez que são estáveis até a temperatura de 200°C. Os estudos realizados mostraram que alguns MIPs sintetizados apresentaram grande potencial para aplicação em técnica de extração em fase sólida.

Palavras-chave: fenilalanina, biopolímeros – síntese, extração química.

ABSTRACT

Polymers Molecularly Imprinted (MIPs) were synthesized and characterized for use in extraction technique in solid phase (SPE), to the determination of phenylalanine (Phe). The MIPs are synthesized from methacrylic acid, phenylalanine, ethylene glycol dimethacrylate, 2,2-azobisisobutyronitrile in chloroform. Non Imprinted Polymers (NIPs) were synthesized for control for the selectivity of MIPs. In this study we varied the ratio "mold molecule / functional monomer" in order to optimize the conditions of synthesis that occurred at 4 °C under UV irradiation. The desorption of phenylalanine was carried out in Soxhlet extractor for 64 hours and the monitoring via reading in UV-Vis spectrophotometer. Syntheses were carried out 10, 8 MIPs and 2 NIPs. Of these, 3 MIPs were chosen as study object for presenting proportions template molecule: functional monomer more MIPs applied to the extraction technique in solid phase. The MIPs and NIPs were characterized by the following analytical techniques: FTIR, UV-Vis, SEM, DSC and TG. Not only analyzed the reaction products, but also the monomers and the template molecule. The MIPs were also evaluated for their adsorption capacity compared to the NIPs for use in SPE. Among the synthesized and evaluated MIPs, two had good adsorption capacity of phenylalanine, an average degree of adsorption between 54 and 56%. Comparing them to NIPs, which achieved the adsorption degree of around 11,7%, it was concluded that these MIPs showed up specific to the determination of Phe. MIPs evaluated by SEM showed more porous surface before extraction process, an important feature for use in SPE. The thermal stability of the MIPs, investigated by thermal analysis, showed that they can be applied as a sorbent for different sample types, since they are stable up to the temperature of 200°C. The synthesized MIP in the present study showed great potential for use in SPE technique.

Key Words: phenylalanine, biopolymers - synthesis, chemical extraction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. POLÍMEROS.....	4
2.2. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS.....	7
2.2.1. VARIÁVEIS DO PROCESSO DE SÍNTESE DE MIPs.....	10
2.2.1.1. MOLÉCULA MOLDE.....	11
2.2.1.2. MONÔMERO FUNCIONAL.....	12
2.2.1.3. AGENTE RETICULANTE.....	14
2.2.1.4. SOLVENTE.....	16
2.2.1.5. INICIADOR RADICALAR.....	18
2.2.2. TIPOS DE IMPRESSÃO: COVALENTE, NÃO-COVALENTE E SEMI-COVALENTE.....	19
2.3. PROCESSOS DE POLIMERIZAÇÃO.....	21
2.3.1. POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO.....	22
2.3.2. POLIMERIZAÇÃO POR SUSPENSÃO.....	23
2.3.3. POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO.....	24
2.3.4. POLIMERIZAÇÃO POR EXPANSÃO EM MULTITAPAS.....	25
2.3.5. POLIMERIZAÇÃO POR EMULSÃO.....	25
2.4. APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO MOLECULAR.....	26
2.5. FENILALANINA.....	30
2.6. SÍNTESE DE MIP A PARTIR DA FENILALANINA.....	32
2.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	33
2.7.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	34

2.7.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	34
2.7.3. ANÁLISE TÉRMICA.....	35
2.7.3.1. TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	35
2.7.3.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	36
2.7.4. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA- VISÍVEL (UV-Vis).....	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1. SÍNTESE DOS MIPs E NIPs.....	37
3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MIPs E NIPs.....	41
3.2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	41
3.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	42
3.2.3. TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	42
3.2.4. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	42
3.3. EXTRAÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE FENILALANINA.....	42
3.4. ENSAIO DE ADSORÇÃO DE FENILALANINA.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. SÍNTESE DOS MIPs E NIPs.....	46
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MIPs E NIPs.....	47
4.2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	47
4.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	52
4.2.3. ANÁLISE TÉRMICA (TG e DSC).....	54
4.3. EXTRAÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE FENILALANINA.....	62
4.4. ENSAIO DE ADSORÇÃO DA FENILALANINA.....	70

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXO I: CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA A FENILALANINA EM SOLUÇÃO METANOL:ÁCIDO ACÉTICO (9:1 V/V) E EM ÁGUA.....	86
ANEXO II: ESPECTROS FTIR DOS MIPS E NIPS SINTETIZADOS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática do processo de impressão molecular (adaptado de SILVA, 2009).....	9
Figura 2: Estruturas químicas dos AR mais empregados nos MIPs (adaptado de COMARK e SOUZA, 2004).....	16
Figura 3: Estruturas químicas de iniciadores radicalares usados em sínteses de MIPs (adaptado de TARLEY <i>et al.</i> , 2005).....	19
Figura 4: Tipos de ligações na impressão molecular: (A) impressão não covalente e (B) impressão covalente / semi-covalente.....	20
Figura 5: Representação esquemática das etapas de síntese dos diferentes processos de polimerização (adaptado de PÉREZ-MORAL e MAYES, 2004).....	21
Figura 6: Morfologia das partículas obtidas por diferentes métodos de polimerização (adaptado de BELTRAN <i>et al.</i> , 2010).....	26
Figura 7: Representação esquemática da técnica de extração em fase sólida (adaptado de MACHEREY-NAGEL, 2006).....	28
Figura 8: Estrutura molecular da fenilalanina (adaptado de LEHNINGER, 2011).....	31
Figura 9: (a) Fotografia da câmara aberta com lâmpada UV e suporte da amostra no fundo. (b) Fotografia da montagem da câmara sobre o banho ultratermostático.....	40
Figura 10: Fotografia do frasco reacional após a polimerização.....	40
Figura 11: Fotografia da montagem para extração da fenilalanina, via Soxhlet.....	43
Figura 12: Fotografia do ensaio de adsorção em shaker.....	45
Figura 13: Fotografia do polímero formado (MIP-8) após processo de secagem.....	46
Figura 14: Representação da possível formação do complexo “MF-MM”.....	46
Figura 15: Espectro FTIR para o ácido metacrílico.....	47
Figura 16: Espectro FTIR para a fenilalanina.....	48
Figura 17: Espectro FTIR para o etileno glicol dimetacrilato.....	49
Figura 18: Espectro FTIR para o clorofórmio.....	50

Figura 19: Espectros FTIR para a Phe, o NIP-1 e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8 antes da extração da Phe.....	50
Figura 20: Micrografia para o MIP-4, antes da extração. Aumento de 150x (a) e 1000x (b).....	52
Figura 21: Micrografia para o MIP-6, antes da extração. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).....	52
Figura 22: Micrografia para o MIP-8, antes da extração. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).....	53
Figura 23: Micrografia para o NIP-1. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).....	53
Figura 24: Micrografia para o NIP-2. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).....	53
Figura 25: Curvas TG e DrTG para a fenilalanina.....	54
Figura 26: Curva DSC para a fenilalanina.....	55
Figura 27: Curvas TG para a Phe, o NIP-1 e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, antes da extração da Phe.....	56
Figura 28: Curvas TG e DrTG para o MIP-4.....	56
Figura 29: Curvas TG e DrTG para o MIP-6.....	57
Figura 30: Curvas TG e DrTG para o MIP-8.....	57
Figura 31: Curvas TG e DrTG para o NIP-1.....	58
Figura 32: Curvas TG e DrTG para o NIP-2.....	58
Figura 33: Curvas DSC para a Phe, o NIP-1 e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, antes da extração da Phe.....	59
Figura 34: Curva DSC para o MIP-4, antes da extração.....	60
Figura 35: Curva DSC para o MIP-6, antes da extração.....	60
Figura 36: Curva DSC para o MIP-8, antes da extração.....	61
Figura 37: Curva DSC para o NIP-1.....	61
Figura 38: Curva DSC para o NIP-2.....	62

Figura 39: Espectros FTIR para a Phe e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, após extração da fenilalanina.....	63
Figura 40: Espectros FTIR para os MIPs 4, 6, 8 (após extração) e NIPs 1 e 2.....	63
Figura 41: Micrografia para o MIP-4, após extração. Aumento de 1800x (a) e 4000x (b).....	64
Figura 42: Micrografia para o MIP-6, após extração. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).....	64
Figura 43: Micrografia para o MIP-8, após extração. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).....	65
Figura 44: Curvas TG para a Phe e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, após a extração da Phe.....	66
Figura 45: Curvas TG e DrTG para o MIP-4, após extração da fenilalanina.....	66
Figura 46: Curvas TG e DrTG para o MIP-6, após extração da fenilalanina.....	67
Figura 47: Curvas TG e DrTG para o MIP-8, após extração da fenilalanina.....	67
Figura 48: Curvas DSC para a Phe e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, após a extração da Phe.....	68
Figura 49: Curva DSC para o MIP-4, após extração.....	69
Figura 50: Curva DSC para o MIP-6, após extração.....	69
Figura 51: Curva DSC para o MIP-8, após extração.....	70
Figura 52: Grau de adsorção da fenilalanina em função das massas de polímero nos MIP-4, MIP-6, MIP-8, NIP-1 e NIP-2.....	72
Figura I.1.: Curva de calibração para a fenilalanina em solução metanol:ácido acético (9:1 v/v) ($\lambda = 259\text{nm}$).....	86
Figura I.2.: Curva de calibração para a fenilalanina em solução aquosa ($\lambda = 258\text{nm}$)....	86
Figura II.1: Espectro FTIR para o MIP-4, antes da extração.....	87
Figura II.2: Espectro FTIR para o MIP-6, antes da extração.....	87
Figura II.3: Espectro FTIR para o MIP-8, antes da extração.....	88

Figura II.4: Espectro FTIR para o NIP-1.....	88
Figura II.5: Espectro FTIR para o NIP-2.....	89
Figura II.6: Espectro FTIR para o MIP-4 após extração.....	89
Figura II.7: Espectro FTIR para o MIP-6 após extração.....	90
Figura II.8: Espectro FTIR para o MIP-8 após extração.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Monômeros funcionais tipicamente utilizados no preparo dos MIPs (adaptado de TARLEY <i>et al.</i> , 2005).....	13
Tabela 2: Quantidades dos reagentes utilizadas na síntese dos MIPs a partir da fenilalanina.....	38
Tabela 3: Quantidades dos reagentes utilizadas na síntese dos NIPs.....	38
Tabela 4: Monitoramento da extração da MM do MIP-4, MIP-6 e MIP-8.....	44
Tabela 5: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro FTIR para os polímeros e a Phe.....	51
Tabela 6: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero MIP-4.....	71
Tabela 7: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero MIP-6.....	71
Tabela 8: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero MIP-8.....	71
Tabela 9: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero NIP-1.....	72
Tabela 10: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero NIP-2.....	72

NOTAÇÃO

AIBN	2,2 – Azobisisobutironitrila
AR	Agente reticulante
C18	Sílica modificada
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (eletroforese capilar)
CEC	<i>Capillary Electro-Chromatography</i> (eletrocromatografia capilar)
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DrTG/DrTGA	Derivada da curva termogravimétrica
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato
FTIR	<i>Fourier Transformed Infrared</i> (espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alto desempenho)
IR	Iniciador radicalar
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
MAA	Ácido metacrílico
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Monômero funcional
MM	Molécula molde
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i> (polímero molecularmente impressos)
NIP	<i>Nom-Imprinted Polymer</i> (polímero não impresso)
Phe	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonúria

RPM	Rotação por minuto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (extração em fase sólida)
TG/TGA	Termogravimetria
μm	Micrômetro, equivale à milésima parte do milímetro
t	Unidade de tempo
$T_{\text{on set}}$	Temperatura início da variação de massa na termogravimetria
$T_{\text{end set}}$	Temperatura final da variação de massa na termogravimetria
$T_{\text{deg.máx.}}$	Temperatura de máxima degradação na termogravimetria
UV	Radiação ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotometria UV-Visível

1. INTRODUÇÃO

O reconhecimento específico molecular é um requisito fundamental dos sistemas vivos. Assim, não é surpreendente que os cientistas ao longo dos anos tenham investido grandes somas de tempo e esforço na tentativa de mimetizar funções biológicas responsáveis pela seletividade inerente às interações enzima-substrato, antígeno-anticorpo e fármaco-receptor.

O conceito de impressão molecular para formação de anticorpos, processo no qual um antígeno era usado como molécula molde (MM) para dar forma à cadeia polipeptídica de anticorpos, surgiu a partir da teoria de Pauling (PAULING, 1940). Em 1949, o trabalho de Dickey colocou em prática a teoria de Pauling promovendo a utilização de absorventes específicos com memória inerente a uma dada molécula e capazes de se religar seletivamente à mesma (DICKEY, 1949).

Dessa concepção, idealizou-se produzir um polímero rígido, com seletividade atribuída principalmente a sua estrutura tridimensional complementar à molécula molde, que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular (FERNANDES, 2012).

Atualmente, essa técnica encontra-se bem estabelecida, sendo rotineiramente intitulada de Polímeros Molecularmente Impressos ou *Molecularly Imprinted Polymers* – MIPs, que são polímeros sintéticos que apresentam alta seletividade a uma molécula de interesse e podem ser moldados de acordo com sua utilização. Eles apresentam características vantajosas como estabilidade quanto ao armazenamento à longo prazo, resistência mecânica quanto à integridade física e inércia química a ácidos, bases e solventes orgânicos (TARLEY *et al.*, 2005).

Em função dessas características, e dada sua alta seletividade, esses polímeros têm sido bastante empregados no preparo de amostras atuando como adsorventes em técnicas de separação, tais como, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*) (HUNG, 2005), eletroforese capilar (CE: *Capillary Electrophoresis*), eletrocromatografia capilar (CEC: *Capillary Electrochromatography*) (SUEDEE *et al.*, 2006), cromatografia em camada delgada (MOSBACH, 1994), bem como em extração em fase sólida (SPE: *Solid Phase Extraction*) (ANDERSSON, 1997) e em microextração em fase sólida (KOSTER, 2001), muito empregados nas áreas biológica, farmacológica e alimentícia (MARTÍN-STEBA, 2001).

O emprego de MIPs como materiais adsorventes na técnica de extração em fase sólida vem adquirindo destaque, sendo o principal campo de aplicação desses materiais pois oferece alto grau de seletividade quando comparado com outros materiais, como cartuchos de sílica modificada (C18) e resinas de troca iônica e, ao mesmo tempo, por serem mais estáveis que os adsorventes de origem biológica (imunossorventes) (CARO *et al.*, 2006; TAMAYO *et al.*, 2007).

A SPE é um método amplamente empregado na extração e concentração de analitos, mesmo quando estão presentes em baixos níveis de concentração, na remoção de compostos interferentes em matrizes complexas e na mudança do meio de solubilização de um analito antes de sua análise cromatográfica. Sendo assim, a SPE é considerada um método muito importante para o preparo de amostras (YANG *et al.*, 2006). Quando o material adsorvente é um MIP, a técnica recebe a designação de *Molecular Imprinting Solid-Phase Extraction* (MISPE) (TARLEY *et al.* 2005).

Vários estudos foram realizados comprovando a utilidade do método MISPE na extração de compostos em amostras biológicas, biofluidos, tecidos, água, solo e plantas. As diversas pesquisas em impressão molecular disponibilizaram polímeros que podem ser usados na detecção de fármacos, toxinas, agrotóxicos, aditivos alimentares, compostos tóxicos, entre outros (PÉREZ-MORAL e MAYES, 2004).

Um exemplo desses compostos tóxicos para o nosso organismo é a fenilalanina em excesso e seus catabólitos, que têm efeito tóxico nas funções somáticas e do sistema nervoso central, causando anormalidades como falhas no andar ou falar, hiperatividade, tremor, microcefalia, falhas no crescimento e retardo mental, sendo essa doença denominada fenilcetonúria (CLARK, 2010).

A redução desse aminoácido nos alimentos é essencial para a dieta de fenilcetonúricos. Logo, é necessário o desenvolvimento de adsorventes mais específicos para fenilalanina, visando a otimização de métodos para sua remoção.

Vários métodos são utilizados para a remoção da fenilalanina, como adsorção em carvão ativado ou resinas de adsorção, cromatografia de troca iônica, peneira molecular ou filtração em gel, além de desaminação desse aminoácido pela enzima fenilalanina amônia liase. Apesar do uso do carvão ativado comercial ser uma das formas mais usadas para adsorção de aminoácidos, a utilização desse processo gera um aumento considerável no custo do processo, devido à necessidade de regeneração do adsorvente para posterior utilização. Além disso, existe a questão da não especificidade

do carvão ativado comercial, que ao ser aplicado na remoção da fenilalanina em matrizes mais complexas, pode remover também outras substâncias, como, por exemplo, outros aminoácidos (CLARK, 2010). Tais limitações justificam a síntese de MIP para a determinação de fenilalanina.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar polímeros impressos molecularmente por meio do processo de polimerização em solução, utilizando como molécula molde nos MIPs a fenilalanina, bem como estudar a aplicação desses polímeros na técnica de extração em fase sólida.

Esse trabalho é composto de uma revisão bibliográfica, na qual são introduzidos e discutidos alguns conceitos relativos aos polímeros, mais especificamente polímeros molecularmente impressos, sobre molécula molde, sobre a aplicação e as técnicas de caracterização dos MIPs, entre outros. No item seguinte, item 3, são abordados a metodologia e os materiais utilizados na parte experimental. Os experimentos envolveram a realização da síntese dos MIPs e NIPs, o estudo de adsorção e a extração da molécula molde. Posteriormente, os resultados obtidos na parte experimental são apresentados e discutidos no item 4. No item 5, as conclusões obtidas no presente trabalho e as sugestões para estudos futuros são apresentadas. E, por fim, encontram-se as referências bibliográficas (item 6) e os anexos com todos os dados obtidos durante a execução desse trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão serão abordados alguns tópicos importantes para o desenvolvimento do tema proposto, tais como: alguns conceitos sobre polímeros, breve histórico sobre a origem dos polímeros molecularmente impressos, definição da técnica de impressão molecular, os aspectos mais importantes envolvidos na síntese, os tipos de polimerização utilizados, características da molécula molde empregada, a aplicação dos MIPs, especialmente seu uso na técnica de extração em fase sólida, e os métodos de caracterização utilizados para os MIPs e NIPs sintetizados.

2.1. POLÍMEROS

O termo polímero é usado para denotar moléculas constituídas pela repetição de unidades mais simples chamadas de mero ou monômero. De acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), polímero pode ser definido como: “Substância composta de átomos ou grupo de átomos (unidades de repetição ou monômeros) interligados entre si em quantidades suficientes para desenvolver um conjunto de propriedades que não varie significativamente com a adição de uma ou mais unidades de repetição” (GEDDE, 1999).

Os polímeros possuem uma característica em comum, a de serem macromoléculas de alta massa molar, que define suas propriedades físico-químicas. Existem também macromoléculas de baixa massa molar, conhecidas como oligômeros que consistem em uma molécula com poucos monômeros. Suas propriedades físicas variam com a adição ou a remoção de um ou mais monômeros de sua estrutura molecular (SILVA, 2006).

As moléculas que constituem os polímeros geralmente estão ligadas umas as outras por meio de ligações covalentes, enquanto moléculas separadas ou segmentos de uma mesma molécula são atraídas por forças intermoleculares, também chamadas de forças secundárias, tais como ligações de hidrogênio e força de “van der Waals”. As ligações covalentes são caracterizadas por sua grande energia (35 a 150 Kcal/mol), pequena distância interatômica e por manter os ângulos entre as ligações sucessivas relativamente constantes. As forças secundárias são mais difíceis de caracterizar, pois atuam entre as moléculas ou segmentos da mesma molécula, como dito anteriormente. A intensidade deste tipo de força, que pode chegar até 10 Kcal/mol, diminui significativamente com o aumento da distância entre as moléculas e pode ser vista

como a energia de equilíbrio entre as forças de atração e repulsão das moléculas (RODRIGUEZ, 1982).

No geral, as ligações covalentes determinam a estabilidade térmica e fotoquímica dos polímeros, enquanto as secundárias determinam uma grande parte das propriedades físicas associadas a um composto específico. Propriedades como fusão, dissolução, difusão, escoamento, adsorção, etc., envolvem a formação e o rompimento de ligações intermoleculares. Nos polímeros essas forças também são responsáveis pelos movimentos de segmentos individuais de moléculas com cadeia longa (RODRIGUEZ, 1982).

O arranjo dessas ligações covalentes no espaço permite criar um método conveniente de classificação que ajuda a explicar as propriedades dos polímeros. Basicamente há dois tipos de arranjo: moléculas simples e moléculas reticuladas (cadeia cruzada). Essa distinção é importante, pois a formação de ligações cruzadas tem um grande efeito nas propriedades mecânicas dos materiais poliméricos. A insolubilidade desses materiais é uma característica dessa classe de polímeros e possui uma considerável expansão em certos solventes. Além disso, esse tipo de material não exhibe escoamento plástico nem solubilidade (SILVA, 2006).

As moléculas simples podem ser lineares ou ramificadas. Essa ramificação modifica em muito as propriedades dos polímeros, ficando assim dependente do tamanho e da quantidade de cadeias laterais. Em muitos materiais é importante controlar o tamanho da ramificação para determinar sua resistência mecânica e física (RODRIGUEZ, 1982).

Os polímeros formados por moléculas simples possuem uma estrutura definida pelas ligações primárias e secundárias que podem determinar configurações diferentes para um mesmo tipo de polímero. A configuração é definida pelo método de polimerização (reação que dá origem ao polímero), e o polímero preserva essa configuração até que haja uma reação química. Uma mudança na configuração requer a ruptura das ligações químicas. Outro tipo de mudança na estrutura da cadeia polimérica é conhecido como conformação, que é causada pela torção da cadeia em torno de ligações simples, o que não acontece com ligações duplas ou triplas (GEDDE, 1999). Os polímeros de rede cruzada podem ser resultados da reticulação de polímeros linear ou ramificado, ou mesmo direto da polimerização de um ou mais monômeros.

Essas estruturas dos polímeros são de grande importância em suas propriedades, como, por exemplo, polímeros ramificados com cadeias laterais curtas têm o efeito da

crystalinidade reduzida, os de cadeias laterais longas possuem as propriedades reológicas influenciadas pelo tamanho da ramificação e os com cadeia cruzada não podem ser fundidos (SILVA, 2006).

Outra propriedade relacionada ao tipo de estrutura da cadeia dos polímeros é seu comportamento frente a mudanças de temperaturas. Com relação a este comportamento, eles podem ser classificados, principalmente, como termoplásticos e termorrígidos (RODRIGUEZ, 1982).

Polímeros termoplásticos é a classificação dada a materiais poliméricos que amolecem e escoam quando são submetidos a determinadas pressões e aquecimento. Esse escoamento ocorre sem variação em sua estrutura química. A maior parte dos materiais termoplásticos pode ser moldada várias vezes, podendo ser processada por métodos como laminação, injeção e extrusão, tendo, contudo, um limite no número de ciclos de moldagem devido à degradação química. Além disso, há um limite de temperatura, acima do qual o material não pode ser reutilizado (SOUSA, 1997).

Polímeros termorrígidos são materiais que, quando aquecidos pela primeira vez, apresentam a possibilidade de formação de ligações covalentes intermoleculares (ligações cruzadas), resultando em uma estrutura reticulada, insolúvel e infundível. O polímero se torna duro, permitindo a produção de moldes rígidos. Aplicações subsequentes de calor e pressão não causam amolecimento ou escoamento, pois seu comportamento em relação a remoldagem é irreversível. (SOUSA, 1993).

Até agora foi mencionado que o polímero pode ser linear, ramificado ou de ligações cruzadas. A reação que permite determinar o tipo de polímero é conhecida como polimerização, a qual consiste em unir pequenas moléculas (monômeros) por meio de ligações covalentes. Este processo pode ser realizado de várias maneiras e pode-se classificá-lo como a seguir (RODRIGUEZ, 1982):

- Pelo número de ligações que cada monômero pode fazer: funcionalidade.
- Pela cinética que governa a reação de polimerização: polimerização em etapas versus polimerização em cadeia.
- Pela reação química usada para produzir novas ligações: adição etênica, esterificação, etc.
- Pelo número de monômeros usados: homopolimerização ou copolimerização (quando são utilizados dois ou mais tipos de monômeros).

- Pelo processo de polimerização: em massa, em solução, em suspensão ou em emulsão.

Dentre todas essas possibilidades/condições de formação de polímeros, existem os polímeros molecularmente impressos (MIPs). Esses têm recebido atenção especial do ponto de vista analítico em função de sua alta seletividade na detecção de substâncias.

2.2. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

Os polímeros molecularmente impressos consistem em matrizes macromoleculares sintéticas, obtidas com base em métodos de moldagem molecular e que são capazes de reconhecer seletivamente moléculas biológicas, como fármacos e proteínas. A especificidade na detecção de substâncias é comparável a dos anticorpos monoclonais utilizados em técnicas imunológicas (SOUSA e BARBOSA, 2009).

A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios específicos de reconhecimento, moldados a partir de uma molécula molde, sendo essa o próprio analito ou um composto de estrutura semelhante (CORMACK e ELORZA, 2004; SILVA, 2009).

As vantagens dos MIPs em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) incluem fácil preparo, baixo custo, possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço e resistência a ambientes adversos, nos quais biomoléculas naturais não resistiriam, como, por exemplo, na presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão. Os MIPs podem ser armazenados secos em temperatura ambiente por longos períodos de tempo, sem perda do desempenho inicial.

MIPs são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do futuro analito ou de uma molécula com estrutura análoga. Após a polimerização a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito. Com essa estratégia, o resultado é uma “memória” molecular no polímero, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível do analito. A primeira etapa da síntese consiste em misturar o monômero contendo grupos funcionais

complementares àqueles da molécula molde com a molécula molde, o que permite formar em solução o complexo “monômero-molécula molde”, por meio de interações (covalentes ou não covalentes) entre os respectivos grupos funcionais complementares. Posteriormente, são adicionados ao meio reacional o reagente reticulante e o iniciador radicalar de polimerização. Finalmente, a polimerização é induzida por meio de calor e/ou luz ultravioleta (UV) na ausência de oxigênio.

Nesses polímeros, a etapa de síntese ocorre após a formação de um complexo entre o monômero funcional (MF) e a molécula molde (MM). Assim, as terminações ligantes dos MF são posicionadas em pontos complementares àqueles provenientes da MM, permitindo a formação de ligações. Após a adição de um agente reticulante (AR) e um reagente iniciador, a reação de polimerização tem início, ocorrendo a formação de uma matriz polimérica rígida (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; CORMACK e ELORZA, 2004). Um esquema desse processo é ilustrado na Figura 1.

Em seguida, após a extração da molécula molde (também conhecida como molécula chave, molécula alvo, molécula impressa, analito ou *template*), realizada por meio de um solvente adequado, são formadas cavidades complementares a esse molde em tamanho, forma e presença de grupos funcionais (TARLEY *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2007). Tais cavidades constituem os sítios específicos de ligação que agem no reconhecimento desse composto e/ou de substâncias com estrutura semelhante a ele (PEÇANHA, 2012).

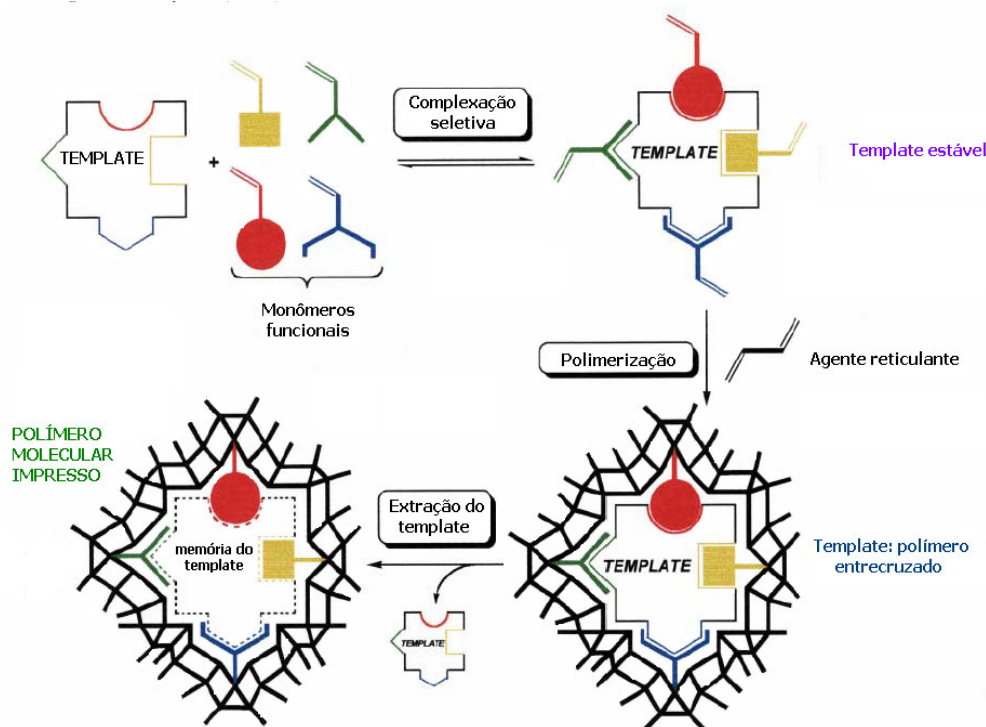


Figura 1: Ilustração esquemática do processo de impressão molecular (adaptado de SILVA, 2009).

A combinação e escolha dos reagentes para síntese de MIPs devem ser criteriosamente avaliadas para cada analito, de forma a minimizar algumas características indesejáveis, como a formação de polímeros pouco porosos com baixa eficiência de separação devido à formação de poucos sítios ativos (TARLEY *et al.*, 2005).

A técnica de impressão molecular envolve a preparação em paralelo ao MIP de um NIP (polímero controle), ou seja, um MIP sintetizado sem a presença da molécula molde. A formação das cavidades complementares em MIP pela interação com o analito pode ser verificada pela maior retenção desse no polímero impresso, comparado ao NIP, em determinadas condições de análise que devem ser otimizadas para cada composto. Em NIP, ocorre a formação de sítios não seletivos, de forma aleatória, desprovidos de cavidades complementares ao volume e posição de grupos que podem interagir com o analito, promovendo alguma retenção do mesmo (PEÇANHA, 2012).

O primeiro resultado positivo no uso de polímeros impressos foi obtido em 1971, por Gunter Wulff e Ali Sarhan, que descreveram a síntese de um polímero enantioselectivo para o ácido glicérico, onde as interações entre a molécula e os monômeros funcionais eram de natureza covalente. A principal característica desses polímeros era sua alta seletividade, como consequência da boa interação entre os monômeros funcionais e a

molécula molde. Contudo, cabe ressaltar que o processo de retirada da molécula molde do sítio de ligação mostrou-se difícil, sendo necessário, em alguns casos, o emprego de condições drásticas de hidrólise (FERNANDES, 2012; PEÇANHA, 2012).

Em 1972, Wulff escreveu sua primeira patente sobre impressão molecular, embora essa não tenha sido publicada antes de 1974. Esse material esboçou muitos conceitos do método de impressão molecular, incluindo polimerização de radicais livres, condensação e adição para dar forma a poliuretanos. Apresentava, também, exemplos usando interações covalentes e não covalentes. O primeiro artigo acadêmico sobre a síntese de polímeros impressos foi publicado por Wulff e colaboradores (1973), considerado pelos autores como a publicação mais importante do grupo, desde que eles expuseram o princípio que sustenta o conceito de impressão molecular (FERNANDES, 2012).

Desde então, esses materiais têm recebido grande atenção por causa das vantagens em relação aos materiais biológicos, que atuam no mecanismo de reconhecimento molecular. A facilidade de síntese, o baixo custo dos reagentes empregados, a estabilidade química, física e térmica do material por longos períodos de tempo, a capacidade de ser estocado sem perder sua especificidade e a possibilidade de reutilização do polímero, após a limpeza do mesmo, são algumas dessas vantagens (JODLBAUER *et al.*, 2002).

2.2.1. VARIÁVEIS DO PROCESSO DE SÍNTESE DE MIPs

A seletividade dos MIPs depende fundamentalmente do processo de síntese e, conseqüentemente, das variáveis envolvidas: proporções molares entre a molécula molde e monômero funcional, tipo e quantidade de solvente, quantidades do agente reticulante e do iniciador radicalar (IR), tempo e processo de polimerização. Um bom conhecimento de equilíbrio químico entre os compostos envolvidos, da teoria de reconhecimento molecular e de termodinâmica são importantes para que seja obtido um MIP com elevado número de cavidades (KATZ, 1999). Desta forma, a otimização dos parâmetros envolvidos na síntese é essencial para a confecção de MIPs. Relativamente às moléculas molde para as quais ainda não existe um protocolo de síntese, há a necessidade de se conhecer profundamente todas as variáveis envolvidas e suas interdependências (SPIVAK, 2005). De fato, a escolha da molécula molde, do

monômero funcional, do agente reticulante e do iniciador radicalar são de extrema importância na síntese de MIPs (GRASSI, 2008).

2.2.1.1. MOLÉCULA MOLDE

Em todos os processos de moldagem molecular, a MM assume uma importância fundamental, já que é responsável pela definição da organização espacial dos grupos funcionais existentes nos MF. A estrutura molecular da molécula molde determina o tipo de monômero funcional a ser utilizado na síntese, já que as ligações químicas entre ambos é que fundamenta o reconhecimento molecular (PEÇANHA, 2012).

A molécula molde deve ser avaliada quanto à presença de grupos funcionais capazes de se ligar aos monômeros funcionais, a fim de se formar um complexo estável. Por outro lado, essa molécula não deve possuir grupos que acelerem ou retardem a polimerização (como, por exemplo, o grupo tiol), bem como grupos polimerizáveis que certamente promoverão sua inserção dentro da rede polimérica e, conseqüentemente, a não formação dos sítios de reconhecimento (CORMACK e ELORZA, 2004).

No entanto, para uma variedade de reações, nem todos os moldes são diretamente favoráveis ao modelamento. Em termos de compatibilidade com a polimerização, os moldes devem ser, preferencialmente, quimicamente inertes sob as condições de polimerização. Assim, se o molde apresentar reações radiculares ou reações instáveis sob as condições da polimerização, estratégias de impressão alternativa devem ser pesquisadas como a substituição da mesma por um análogo estrutural (CORMACK e ELORZA, 2004).

Quando as interações existentes entre a MM e o monômero são de natureza não-covalente, é necessário que a MM possua um maior número de grupos funcionais capazes de interagir de forma a aumentar a força do complexo formado (PICHON, 2006).

É importante ressaltar que a maior parte dos compostos utilizados com sucesso como moldes (por exemplo, nicotina, esteróides e aminoácidos) apresentam uma massa molar relativamente baixa (MAHONY *et al.*, 2005). O tamanho da molécula molde é um fator influente na seletividade dos MIPs. Assim, MIPs para moléculas grandes são comprovadamente menos seletivos, em virtude da formação de sítios específicos “grandes”, o que permite a entrada de outras moléculas pequenas presentes na

amostra. O trabalho de MINOURA e RACHKOV (2001), apresenta uma alternativa elegante para o reconhecimento de uma proteína. Nesse caso, o MIP foi sintetizado para uma sequência de quatro aminoácidos presentes na molécula de oxitocina (oligopeptídeo). Dessa forma, o reconhecimento da proteína ocorre indiretamente ao reconhecimento do peptídeo. Nesse mesmo contexto, alguns trabalhos interessantes foram propostos, com destaque para o artigo de TAI e colaboradores (2005), que relata uma metodologia capaz de diagnosticar a dengue, baseada no reconhecimento de uma proteína por meio de uma sequência de aminoácidos (TAI *et al.*, 2005).

2.2.1.2. MONÔMERO FUNCIONAL

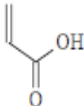
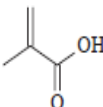
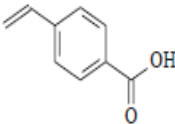
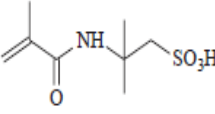
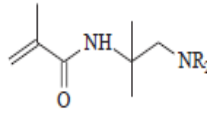
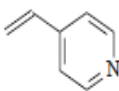
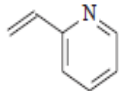
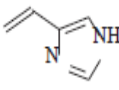
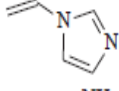
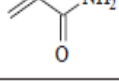
Os monômeros funcionais são responsáveis pelas interações das ligações químicas nos sítios impressos. A escolha do monômero é realizada conforme a natureza da molécula molde (BELTRAN *et al.*, 2010). Sendo assim, é claramente importante combinar os grupos funcionais do molde com os grupos funcionais do monômero em uma forma complementar, a fim de favorecer a formação do complexo, como também a impressão resultante (CORMACK e ELORZA, 2004). Dessa forma, moléculas molde que possuem grupos funcionais básicos interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, e vice-versa (TARLEY *et al.*, 2005).

As interações químicas entre o molde e o monômero podem se dar por meio de ligação covalente ou não-covalente, tais como, ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica, interação hidrofóbica ou por transferência de carga (TARLEY *et al.*, 2005; SPIVAK, 2005).

Existem vários monômeros funcionais com estruturas químicas e polaridades diversas disponíveis comercialmente e muitos outros podem ser sintetizados. A Tabela 1 apresenta as estruturas químicas de uma seleção dos mais importantes monômeros funcionais, sendo o ácido metacrílico (MAA) e a 4-vinilpiridina os mais usados na síntese de MIP para moléculas básicas e ácidas, respectivamente; bem como os tipos de interações desses com o analito (TARLEY *et al.*, 2005; GRASSI, 2008).

Esses monômeros normalmente possuem constantes de associação com a molécula molde muito baixas para formar um complexo estável. Por esse motivo, os monômeros devem ser usados em excesso, geralmente na proporção de 4:1 (fração molar) em relação a molécula molde, de modo a deslocar o equilíbrio para a formação do complexo (ANDERSSON *et al.*, 1984; MARTÍN-ESTEBAN, 2001).

Tabela 1: Monômeros funcionais tipicamente utilizados no preparo dos MIPs (adaptado de TARLEY *et al.*, 2005).

Monômero funcional	Nome do monômero	Tipo de interação com o analito
	Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido meta-acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido p-vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido acrilamidosulfônico	Interação iônica
	Amino metacrilaminada	Interação iônica
	4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	4-Vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	1-Vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio

Misturas de monômeros funcionais também podem ser usadas para prover cavidades mais específicas no polímero. A copolimerização e complexação do molde durante a síntese podem ocorrer (CORMACK e ELORZA, 2004).

Desta forma, a escolha do monômero funcional ou de uma mistura de monômeros deve ser cuidadosa.

2.2.1.3. AGENTE RETICULANTE

O agente reticulante ou monômeros multi-funcionais permitem ligar quimicamente duas ou mais cadeias poliméricas. Em um polímero impresso, o agente reticulante cumpre duas funções majoritárias: controlar a morfologia da matriz polimérica, a qual pode ser macroporosa ou microporosa, e fornecer a estabilidade mecânica à matriz do polímero, devido à reticulação entre as cadeias poliméricas. Além disso, alguns agentes reticulante podem, em alguns casos, estabelecer o sítio de ligação impresso com a MM (FERNANDES, 2012).

Para razões de agente reticulante relativamente baixas (inferiores a 5%) ou para razões mais elevadas de reticulante, porém em presença de baixos volumes de solventes termodinamicamente compatíveis com a matriz polimérica, poderá não ocorrer a separação de fases da matriz polimérica durante o processo de polimerização. Nesse caso, o produto apresenta-se como um polímero do tipo gel, ligeiramente solvatado, que colapsa após secagem, dando origem a um polímero vítreo ou amorfo. Em geral, esses materiais apresentam superfícies específicas muito baixas no estado seco (dado que as cadeias poliméricas estão muito próximas umas das outras), expandem significativamente em solventes termodinamicamente adequados e apresentam propriedades mecânicas fracas, em especial quando a razão de agente reticulante é muito baixa. Os géis poliméricos têm tido poucas aplicações nos processos de moldagem molecular, devido, entre outros aspectos, às suas mais fracas propriedades mecânicas (SOUSA e BARBOSA, 2009).

Para razões de reticulante relativamente mais elevadas (acima de 20%) e/ou em presença de maiores volumes de solvente, a matriz polimérica em crescimento terá condições de permitir a separação de fase no meio de polimerização, originando a formação de polímeros macroporosos. O termo “macroporoso”, que pode ser utilizado como sinónimo do termo “macrorreticular”, é adotado para realçar o fato dos polímeros serem porosos, mas sem qualquer implicação no que diz respeito aos detalhes da morfologia do polímero, como, por exemplo, a dimensão média dos poros ou a distribuição das respectivas dimensões. Os polímeros macroporosos são caracterizados por apresentarem estruturas permanentemente porosas, mesmo no estado seco, e superfícies específicas muito mais elevadas do que as dos polímeros do tipo gel. Além disso, os polímeros macroporosos são mecanicamente mais robustos do que os géis poliméricos, dado à maior concentração de agente reticulante. Por essas razões, os

polímeros macroporosos são geralmente preferidos quando se pretende desenvolver eficazmente MIPs (SOUSA e BARBOSA, 2009).

A formulação ótima da razão monômero funcional / agente de reticulação deve ser determinada por otimização empírica por meio da síntese e avaliação de vários polímeros. Esse processo requer bastante tempo e os resultados obtidos não podem ser generalizados para qualquer molécula molde (GRANADO, 2011). A maior parte dos estudos efetuados, indicam que a porcentagem ótima de agente de reticulação se encontra na faixa de 50 a 80%, relativamente ao monômero funcional (MAHONY *et al.*, 2005).

Um grande número de agentes reticulantes é compatível com a impressão molecular. Alguns são capazes de complexar simultaneamente com o molde e, assim, atuarem como monômeros funcionais. As estruturas químicas de alguns agentes reticulantes bem conhecidos são apresentadas na Figura 2 (FERNANDES, 2012).

Cabe destacar que o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) tem sido o AR mais largamente empregado devido à formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis, pois o mesmo combina um éster metacrilato reativo com um espaçador curto, permitindo um número elevado de conformações e um certo grau de rigidez no polímero resultante (FIGUEIREDO, 2008; SOUSA e BARBOSA, 2009).

Esse composto apresenta dois grupos vinílicos polimerizáveis, um em cada extremidade da cadeia, que reagem com cadeias ativas, sendo o produto final da polimerização não linear, mas sim, um polímero no qual várias cadeias lineares estão entrecruzadas. Esses grupos vinílicos são reativos frente a radicais livres, cátions ou ânions, e formam espécies de transição que podem ser adicionadas à duplas ligações. Tal processo gera um novo centro ativo e a repetição sucessiva do mesmo permite a formação do polímero (SELLERGREN, 2001). Assim, o EGDMA atua como um monômero estrutural uma vez que ele cria uma estrutura polimérica tridimensional que preserva os grupos do monômero funcional em uma posição fixa e complementar à molécula molde, garantindo rigidez e estabilidade aos sítios de ligação. Por isso, o EGDMA deve ser utilizado em excesso em relação à quantidade de monômero funcional, a fim de que a estabilidade mecânica do material seja garantida (SPIVAK, 2005).

Outro AR bastante utilizado é o trimetacrilato de trimetilolpropano, em virtude de produzir MIP com elevada seletividade e com maior capacidade de carregamento

(SOUSA e BARBOSA, 2009). Portanto, a escolha do agente reticulante, a ser utilizado na síntese, depende principalmente do tipo de aplicação para o polímero.

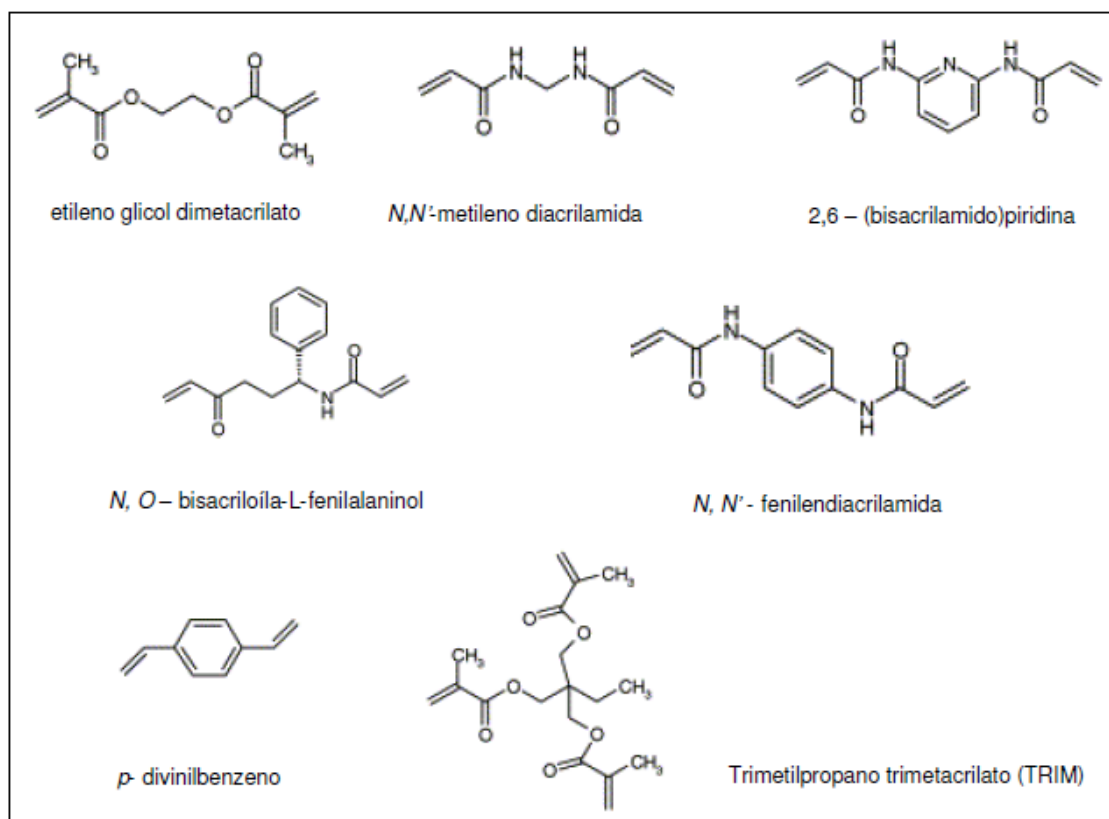


Figura 2: Estruturas químicas dos AR mais empregados nos MIPs (adaptado de COMARK e SOUZA, 2004).

2.2.1.4. SOLVENTE

O solvente é outra variável importante na síntese de MIP, sendo que sua função é solubilizar os reagentes da síntese (MM, MF, AR e IR). No entanto, ele não deve interferir na interação molde-monômero, uma vez que tal interferência pode conduzir à formação de sítios de ligação pouco seletivos e de pequeno número (TARLEY *et al.*, 2005).

Além dessa função, o solvente também é responsável pela criação dos poros nos polímeros. Por esse motivo, é muito comum referir-se ao solvente como porogênico. Quando polímeros macroporosos estão sendo preparados, a natureza e quantidade do

solvente podem ser utilizados para controlar a morfologia e o volume total dos poros (SPIVAK, 2005).

Logo, se é utilizado um solvente termodinamicamente favorável, a tendência é produzir polímeros com estrutura de poros bem desenvolvida e com grande área superficial específica; ao contrário, utilizando um solvente desfavorável termodinamicamente, polímeros pouco porosos e com pequenas áreas superficiais específicas são obtidos, os quais apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular, devido basicamente à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos. Conclui-se portanto que, aumentando o volume de solvente (porogênico), aumenta-se o volume dos poros (TARLEY *et al.*, 2005; CORMACK e ELORZA, 2004).

Outro fator importante a se destacar é que a capacidade térmica, bem como o volume do solvente (em relação aos demais reagentes), estão diretamente relacionados à estabilidade mecânica e a quantidade dos poros do MIP. A porosidade do MIP, por sua vez, facilita a difusão da MM nos sítios seletivos, aumentando a capacidade de reconhecimento molecular do MIP (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Além de seu duplo papel, como solvente e como um agente de formação de poros, na polimerização impressa não-covalente, o solvente deve ser escolhido com critério, para que ele possa maximizar a probabilidade da formação do complexo molde-monômero funcional. Assim, solventes apolares, apróticos, com baixa constante dielétrica, como, por exemplo, tolueno e clorofórmio, oferecem um meio adequado, pois não interferem nas interações ocorridas por meio de forças eletrostáticas e de ligação de hidrogênio. Entretanto, se forças hidrofóbicas estão sendo utilizadas para a formação do complexo, metanol e água podem ser os solventes de escolha (MATSUI *et al.*, 1997; HAGINAKA *et al.*, 2008).

Cabe ressaltar que, como regra geral, após o preparo do polímero e a extração do analito da cavidade seletiva, o MIP resultante terá maior afinidade pelo analito quando o mesmo estiver em um meio similar àquele empregado na síntese. Desse modo, o reconhecimento molecular de um MIP ocorre preferencialmente no mesmo meio reacional no qual foi sintetizado (TARLEY *et al.*, 2005; BARROS, 2010).

2.2.1.5. INICIADOR RADICALAR

O iniciador radicalar tem como função criar radicais livres que possibilitem o início e a manutenção da reação de polimerização do agente reticulante em torno do complexo molde-monômero funcional. Após ser adicionado na reação, o iniciador radicalar sofre uma quebra homolítica em sua estrutura, desencadeada por estímulos externos como temperatura ou radiação UV, a fim de gerar os radicais que iniciam a polimerização (CORMACK e ELORZA, 2004).

A escolha do iniciador deve ser definida em função das propriedades físico-químicas do molde. Por exemplo, se um molde for fotoquímica ou termoquimicamente instável, iniciadores que podem reagir fotoquímica e termoquimicamente, respectivamente, não devem ser selecionados. Se a interação ocorrer por ligação de hidrogênio, a polimerização deve ser feita em baixas temperaturas, e nessas circunstâncias, os iniciadores ativos fotoquimicamente são mais indicados (TARLEY *et al.*, 2005; CORMACK e ELORZA, 2004).

O iniciador 2,2-azobisisobutironitrila é o mais empregado na síntese dos MIPs, mas outros também podem ser utilizados como, por exemplo, azobisdimetilvaleronitrila e o peróxido de benzoíla (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; FERNANDES, 2012), sendo sua escolha dependente da temperatura de síntese a ser empregada e do analito (GRASSI, 2008). Na Figura 3 constam os iniciadores radicalares mais utilizados em síntese de MIPs. Caso o AIBN seja empregado como iniciador radicalar, a MM deve ser estável à temperatura de, aproximadamente, 60°C ou a radiação UV, uma vez que esse iniciador é utilizado nessas condições (CORMACK e ELORZA, 2004; FIGUEIREDO, 2009). O iniciador AIBN sofre homólise sob irradiação por meio de uma lâmpada de vapor de mercúrio com emissão entre 345-365nm para gerar os radicais livres requeridos (SPIVAK, 2005).

O controle da polimerização é basicamente ditado pela velocidade de formação desses radicais, pelo ajuste de temperatura ou radiação UV e pela composição química dos compostos envolvidos (SELLERGREEN, 2001). A estabilidade da temperatura é muito importante para se obter um polímero bem estruturado. Variações bruscas na temperatura podem acarretar a formação descontrolada de radicais, bem como interferir na quantidade de cavidades impressas, comprometendo o desempenho dos MIPs.

Além das variáveis citadas, cabe ressaltar a necessidade de conduzir a reação na ausência de oxigênio por meio de purga de nitrogênio, argônio ou ainda empregando

banho ultra-som. Pois, se presente, o oxigênio pode levar a uma diminuição de radicais que prejudicam a polimerização (TARLEY *et al.*, 2005).

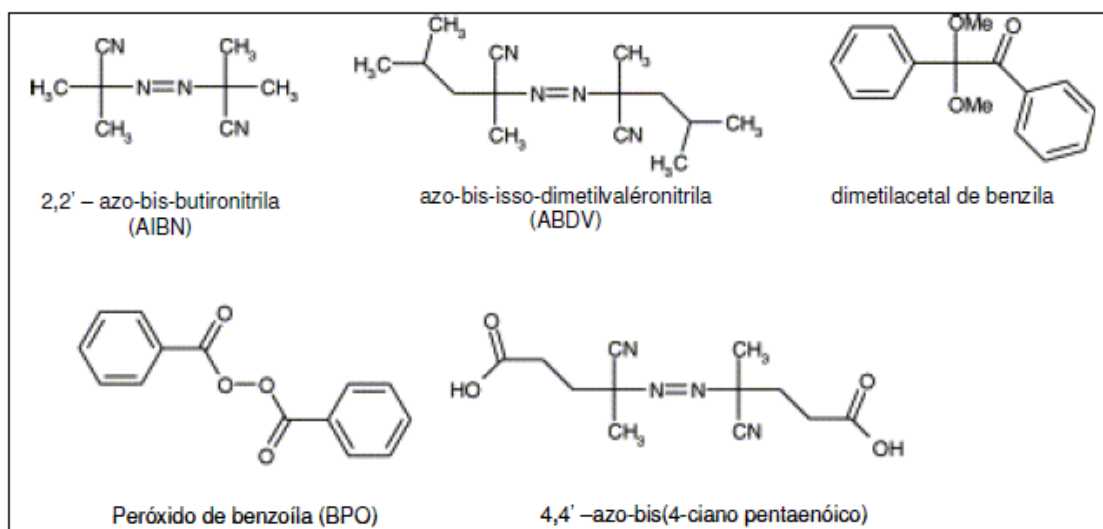


Figura 3: Estruturas químicas de iniciadores radiculares usados em sínteses de MIPs (adaptado de TARLEY *et al.*, 2005).

2.2.2. TIPOS DE IMPRESSÃO: COVALENTE, NÃO-COVALENTE E SEMI-COVALENTE

Basicamente, duas principais estratégias para impressão molecular são estabelecidas, tendo como base se o molde está associado com os MF por meio de interações covalentes ou interações não-covalentes. Às vezes, uma impressão molecular baseada em interações semi-covalentes também pode ser utilizada.

Os procedimentos de síntese baseados nas interações não-covalentes são amplamente utilizados, porque são relativamente simples em termos experimentais e uma maior variedade de funcionalidades pode ser introduzida dentro dos sítios de ligação do MIP usando esses tipos de interações. A etapa de complexação durante a síntese é alcançada misturando a MM com o MF em um solvente adequado. Depois da síntese, o molde é removido da matriz polimérica por meio de simples procedimentos de lavagem com um solvente ou mistura de solventes. A etapa de religação do molde pelo MIP é realizada por interações não-covalentes (ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, eletrostática, hidrofóbica ou de transferência de carga entre o molde e o monômero funcional, entre outras) (CARO *et al.*, 2006).

Esse tipo de interação apresenta ainda como vantagens a maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes analitos e a facilidade de eluição (ANDERSSON *et al.*, 1984).

Todas essas características oferecem várias vantagens sobre os procedimentos baseados nas interações covalentes, em que a formação de ligações covalentes entre o molde e o MF é necessária antes da polimerização. Além disso, para extrair o molde da matriz polimérica, após a síntese via interação covalente, tem-se que romper essas ligações, sendo, na maioria das vezes, necessária a realização de clivagem química.

Normalmente são necessários esforços consideráveis na síntese da própria molécula-molde e frequentemente também se verificam situações de baixa cinética na sua recaptação, que implica no restabelecimento de uma nova ligação covalente. Por esta razão, essa abordagem é difícil de compaginar nos casos em que são requeridas cinéticas rápidas de ativação/desativação (AL-KINDY *et al.*, 2000).

Entretanto, polímeros preparados por ligação covalente possuem sítios mais seletivos, dada a uniformidade gerada pelos mesmos. Porém, quando essa estratégia é adotada, a necessidade de monômeros e analitos que estabeleçam ligações covalentes restringem a aplicabilidade dos MIP para poucos analitos, podendo ser empregada somente para moléculas pertencentes à classe dos álcoois, aldeídos, cetonas, aminas ou ácidos carboxílicos (WHITCOMBE, 1995). A Figura 4 mostra a representação esquemática dos tipos de interações citados.

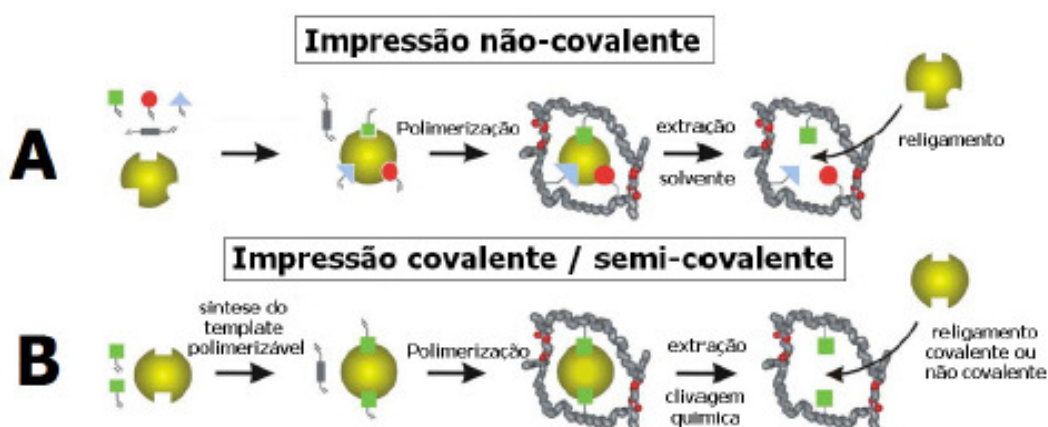


Figura 4: Tipos de ligações na impressão molecular: (A) impressão não covalente e (B) impressão covalente / semi-covalente.

Na tentativa de otimizar o processo de impressão, surge a técnica de impressão semi-covalente. Tal interação é um híbrido das duas interações anteriores. Assim, são

estabelecidas ligações covalentes entre o molde e o MF antes da polimerização, enquanto que, uma vez que o molde foi removido da matriz polimérica, a subsequente religação do analito pelo MIP ocorre por interações não-covalentes (CARO *et al.*, 2006).

2.3. PROCESSOS DE POLIMERIZAÇÃO

A escolha da técnica de polimerização dependerá do tipo de aplicação pretendida do MIP nas diferentes áreas químicas.

As técnicas mais utilizadas para o preparo dos MIPs, especialmente para seu emprego em técnicas de extração e separação, são: polimerização em solução, por suspensão, por precipitação, por expansão em multietapas (*multi-step swelling*) e por emulsão, conforme demonstrado na Figura 5. Cada um desses procedimentos envolve o controle de diferentes parâmetros durante a síntese e produz polímeros com propriedades diferentes (PÉREZ-MORAL e MAYES, 2004).

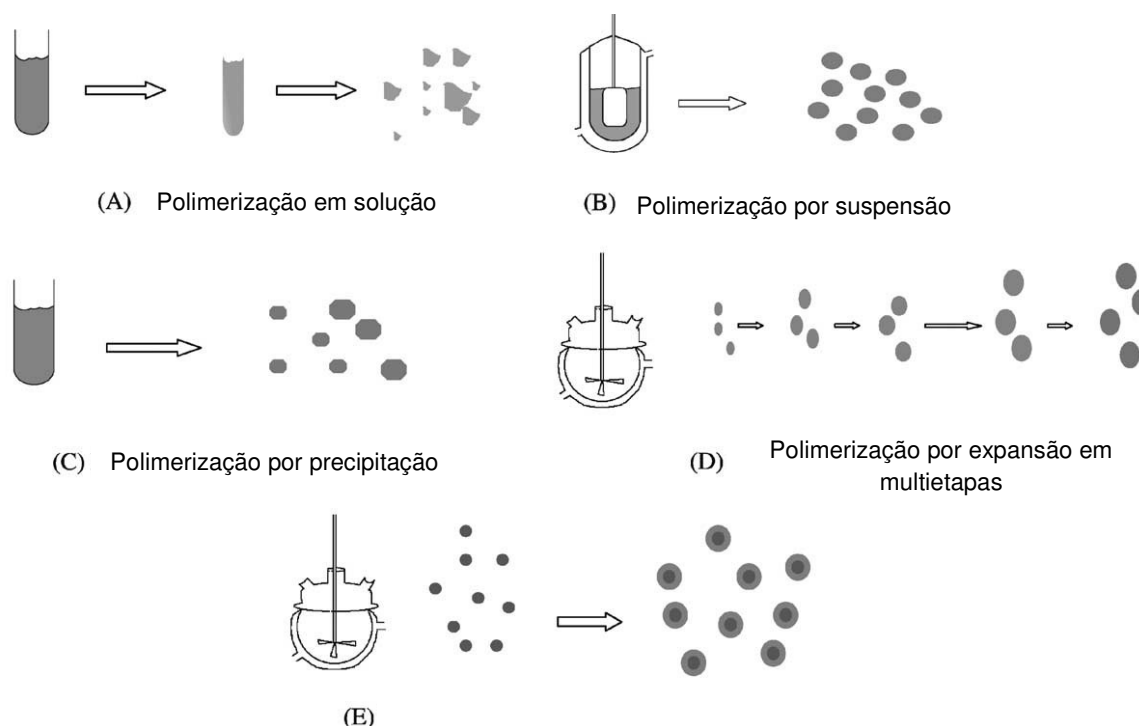


Figura 5: Representação esquemática das etapas de síntese dos diferentes processos de polimerização (adaptado de PÉREZ-MORAL e MAYES, 2004).

2.3.1. POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO

Cronologicamente, o primeiro método de polimerização empregado para sintetizar polímeros molecularmente impressos foi baseado na polimerização em solução. Esse é considerado o método universal de preparo dos MIPs, basicamente devido a sua simplicidade (TARLEY *et al.*, 2005; PÉREZ-MORAL e MAYES, 2004). A reação é realizada em sistemas homogêneos, utilizando, exclusivamente, solventes orgânicos. Ele consiste na mistura de todos os componentes (molécula molde, monômero funcional, solvente, agente reticulante e iniciador radicalar) num frasco reacional sob atmosfera de argônio ou de nitrogênio, uma vez que a presença de oxigênio consome os radicais livres formados (CORMACK e ELORZA, 2004), prejudicando ou até mesmo inibindo a polimerização. O resultado é um bloco polimérico, o qual deve ser triturado, moído e peneirado para a obtenção de partículas de tamanho variando de 20 a 150µm. Logo depois, o polímero é submetido a uma lavagem com solvente para extração do analito, visando seu uso posterior.

O processo em solução pode ocorrer pela polimerização por adição, que é uma reação em cadeia, onde unidades monoméricas são agrupadas, uma de cada vez, para formar o polímero. As poliadições apresentam três diferentes etapas reacionais: a iniciação, a propagação e a terminação, todas com velocidade e mecanismo diferentes. Na iniciação, radicais livres formados a partir da dissociação de iniciadores reagem com moléculas de monômero formando um centro ativo, o qual dará início à formação da cadeia polimérica. A propagação envolve o crescimento dessa cadeia à medida que mais unidades do monômero são adicionadas sucessivamente ao centro ativo formado. A terminação envolve o desaparecimento do centro ativo com a consequente desativação da cadeia polimérica por meio de reações com espécies químicas ativas ou inertes, encerrando o crescimento dessa cadeia (RODRIGUEZ, 1982).

Uma desvantagem desse processo é a produção de áreas heterogêneas na matriz polimérica, resultante da falta de controle durante o processo de polimerização, em particular, quando a iniciação radicalar por radiação UV é utilizada (PÉREZ-MORAL e MAYES, 2004).

Desta forma, os MIPs obtidos pelo método de polimerização em solução são mais indicados para técnicas de extração como a SPE em função da obtenção de partículas da ordem de micrômetros (QIAO *et al.*, 2006), ao passo que seu uso é desfavorável como fase estacionária em HPLC, pois a heterogeneidade das partículas reduz a eficiência cromatográfica, além de se observar, em alguns casos, elevadas

contrapressões e baixa transferência cinética de massa (TARLEY *et al.*, 2005; YILMAZ *et al.*, 2002).

Diante dessas considerações, novas concepções de preparo de MIP são relatadas na literatura, com intuito de produzir partículas com tamanhos uniformes. Ao contrário do método de polimerização em solução, cuja síntese é realizada num sistema homogêneo, a maioria dos novos métodos de preparo contemplam reações em sistemas heterogêneos. Entre eles pode-se citar a polimerização por suspensão (MAYES e MOSBACH, 1996), por expansão em multietapas (KUBO *et al.*, 2003), por precipitação (YE *et al.*, 1999) e por sol-gel (DICKEY, 1955).

2.3.2. POLIMERIZAÇÃO POR SUSPENSÃO

A polimerização por suspensão tem como objetivo a obtenção de microesferas com maior homogeneidade de tamanho. A reação polimérica ocorre dentro das gotas do monômero dispersas num solvente imiscível, geralmente água (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Os reagentes da síntese (MF, MM, AR e IR) são dissolvidos em solvente orgânico e, em seguida, adicionados na fase dispersiva (polar), sendo a fase apolar voltada para o interior da micela, normalmente estabilizada pelo emprego de um tensoativo, geralmente o álcool polivinílico ou polímeros a base de sais orgânicos. A polimerização ocorre após o aquecimento do meio reacional sob agitação. O polímero obtido no formato de esferas é facilmente separado da fase aquosa (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Apesar de possuir como vantagem a uniformidade do tamanho das partículas, algumas moléculas de água se dissolvem na mistura polimérica interferindo na interação analito-monômero, principalmente quando essa se dá por ligação de hidrogênio. Além disso, quando monômeros e analitos possuem elevada solubilidade em água, pode ocorrer partição desses constituintes da fase orgânica para o meio aquoso, resultando num polímero com baixo reconhecimento molecular. A polimerização por suspensão é mais adequada para analitos e monômeros que interagem preferencialmente por interações hidrofóbicas e iônicas (TARLEY *et al.*, 2005).

Com o objetivo de solucionar a limitação constatada no método de polimerização por suspensão em meio aquoso, foi desenvolvida a polimerização em suspensão empregando o agente dispersante perfluorocarbono. Esse agente é imiscível em muitos

compostos orgânicos e, conseqüentemente, permite a formação de uma fase inerte apropriada para a polimerização. Além das vantagens em relação ao método de polimerização por suspensão em meio aquoso no que tange à influência da água, no método com o emprego de perfluorocarbono é possível também controlar o tamanho das partículas poliméricas (de 5 a 50 μm) alterando a massa do dispersante (TARLEY *et al.*, 2005).

2.3.3. POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

O método de preparo de MIP por meio de polimerização por precipitação é análogo ao método de polimerização em solução, porém, volumes superiores de solventes são empregados. Enquanto que, no método convencional (solução) normalmente são utilizados volumes de 10mL, no método por precipitação são usados cerca de 5 vezes mais. Nesse método não é necessário usar nenhum tipo de estabilizante para evitar a coagulação das gotas de monômero. A formação de partículas poliméricas ocorre devido ao crescimento da cadeia polimérica ao longo da reação, o que torna o polímero cada vez menos solúvel no meio (TARLEY *et al.*, 2005).

Além disso, a precipitação também ocorre em face da formação de ligações cruzadas no polímero, tornando-o também pouco solúvel no solvente reacional. Devido a esses fatores, a formação de microesferas na forma de um precipitado é assegurada sem a necessidade de se empregar agentes estabilizantes. A polimerização por precipitação também produz partículas com tamanhos pequenos e uniformes (diâmetro entre 0,3 - 10 μm) com maior rendimento da reação, em torno de 85% (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A síntese dos MIPs por polimerização por precipitação é induzida por luz ou aquecimento na ausência de oxigênio, quando ambos, monômero e analito, são dissolvidos no solvente, seguido da adição do agente reticulante e iniciador radicalar. Nesse método as micropartículas são obtidas por meio de centrifugação e essas, por possuírem diâmetros reduzidos, tornam-se uma desvantagem quando tais polímeros são utilizados como fase estacionária em HPLC, dada a elevada pressão resultante dentro da coluna cromatográfica (TARLEY *et al.*, 2005).

2.3.4. POLIMERIZAÇÃO POR EXPANSÃO EM MULTITAPAS

O método de polimerização por expansão em multietapas é o mais trabalhoso e envolve basicamente o emprego de partículas poliméricas com diâmetro bem definido (geralmente poliestireno com diâmetro de 1 μ m) (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Diferente de outros métodos, as partículas poliméricas atuam como solventes, permitindo a produção de polímeros com tamanhos e poros maiores. Primeiramente, uma microemulsão de partículas de poliestireno é preparada em água contendo o tensoativo dodecil sulfato de sódio e o solvente dibutilftalato. O sistema é agitado até eliminar a microemulsão. Em seguida, a expansão das partículas de poliestireno é efetuada após adição de uma microemulsão preparada a partir do iniciador radicalar, solvente e álcool polivinílico como agente estabilizante. Após um determinado tempo de agitação, o analito junto com o monômero funcional e o agente reticulante dispersos em água, além de álcool polivinílico, são adicionados ao meio. O sistema é novamente agitado, caracterizando a segunda etapa de expansão das partículas de poliestireno. Por fim, a reação de polimerização do MIP é iniciada sob agitação e induzida por aquecimento sob atmosfera inerte. As partículas monodispersas do MIP são posteriormente separadas do sobrenadante e submetidas a uma lavagem com solvente para extração do analito. As mesmas se apresentam com diâmetro entre 2 - 50 μ m (TARLEY *et al.*, 2005).

2.3.5. POLIMERIZAÇÃO POR EMULSÃO

O método de polimerização por emulsão (ou *in situ*) envolve a formação de um núcleo polimérico, em fase aquosa contendo os monômeros e iniciador, adicionada de tensoativos e com controle de temperatura e agitação. As partículas obtidas são filtradas e colocadas para reagir em nova fase aquosa com tensoativo, monômeros, iniciador e o analito. As partículas de MIP vão se formando ao redor do núcleo, em forma de concha (denominada *core-shell*). As partículas obtidas por esse método são monodispersas e podem ser produzidas em um intervalo de tamanho coloidal de 0,05 - 2 μ m (PÉREZ-MORAL e MAYES, 2004).

A Figura 6 mostra a morfologia das partículas obtidas pelos métodos de polimerização aqui descritos.

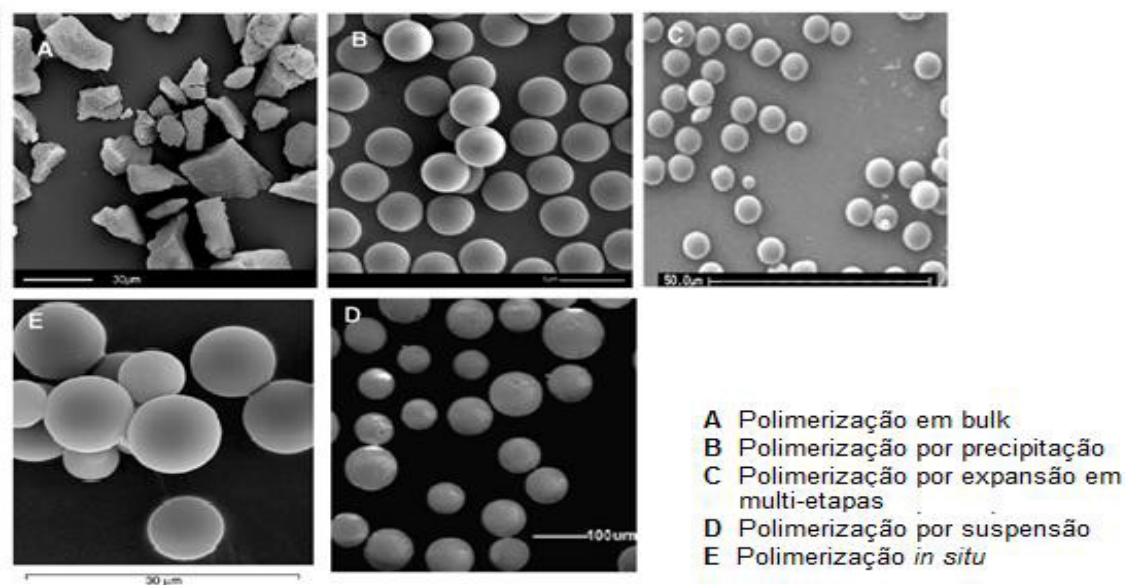


Figura 6: Morfologia das partículas obtidas por diferentes métodos de polimerização (adaptado de BELTRAN *et al.*, 2010).

2.4. APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO MOLECULAR EM SPE

Dentre as aplicações da tecnologia de impressão molecular, pode-se citar os sensores químicos, as técnicas de separação como a cromatografia, a eletrocromatografia capilar e a extração em fase sólida. Porém, deve ser dada uma relevância maior ao emprego de MIP como fase sólida em SPE, devido ao grande número de trabalhos relativos a essas aplicações. Por outro lado, especificamente para cromatografia líquida e eletroforese capilar, salienta-se que a grande maioria dos trabalhos remete ao emprego de MIP em separações quirais.

A extração em fase sólida existe na sua forma atual desde a década de 1970. Porém, foi a partir de 1994 que ela adquiriu maior popularidade, quando os fabricantes inseriram no mercado 84 produtos, com inúmeras fases extratoras (LANÇAS, 2004). A SPE é uma técnica de extração líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica. Em sua forma mais simples, emprega um pequeno tubo aberto (cartucho de extração) que contém a fase sólida (fase extratora).

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

Atualmente é a técnica de preparo de amostras mais comum em muitas áreas da química analítica. Existem dois formatos básicos de sistemas para uso na SPE: cartuchos e discos. Os mais utilizados são cartuchos de polipropileno contendo de 50 a 500mg de sorvente de 40-60 μ m de tamanho de partícula, fixado no cartucho por meio de dois discos de retenção, os *frits*. Os discos geralmente são constituídos de matrizes de PTFE (politetrafluoretileno) embebidas ou impregnadas com a fase sorvente e são mais usados na extração de traços de analitos de grandes volumes de amostra aquosa (LANÇAS, 2004).

Na SPE, a amostra é percolada através de uma fase sólida que retém os solutos de interesse. Esses são posteriormente eluídos com pequeno volume de solvente. Essa técnica oferece algumas vantagens sobre a tradicional extração líquido-líquido, entre elas pode-se citar: alta concentração do analito no extrato final; maior seletividade; alternativas de escolha de fase sólida, permitindo a extração de praticamente todos os compostos de matrizes aquosas ou orgânicas; pouco manuseio da amostra; ausência de emulsão; baixo consumo de vidrarias e facilidade de automação (POOLE, 2002).

Entretanto, como qualquer outra técnica de preparo de amostras, apresenta algumas limitações, como a dificuldade de serem extraídas mais de 4 amostras simultaneamente, no modo manual (ainda que no comércio sejam oferecidos sistemas multicomponentes – *manifolds* - para uso de 10 ou mais cartuchos). Também são relatadas variações nos resultados de análises realizadas em cartuchos de diferentes marcas e mesmo de diferentes lotes disponíveis no mercado.

Os parâmetros operacionais relevantes em SPE são: natureza do sorvente, volume da amostra, natureza dos solventes, formato do sistema de extração e modo de operação. A capacidade retensiva dos cartuchos depende da massa do sorvente, da afinidade do sorvente pelo analito, do volume da amostra e da natureza e quantidade de impurezas (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Uma grande variedade de sorventes são disponíveis comercialmente. Em geral, os materiais de recheio para SPE são similares aos usados em cromatografia líquida. Adsorventes como carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fases quimicamente ligadas e trocadores iônicos orgânicos e inorgânicos são usados. Fases denominadas de “especiais”, mais seletivas, têm sido introduzidas nos últimos anos, como os imunosorventes, fases poliméricas, por exemplo, o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno e polímeros molecularmente impressos (LANÇAS, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Em geral, os procedimentos da SPE compreendem 4 etapas, que são condicionamento, carregamento, limpeza e eluição (LANÇAS, 2004) ilustradas na Figura 7 e descritas a seguir:

- Condicionamento da fase extratora com solvente adequado para ativação dos sítios ativos disponíveis que possivelmente ligarão os analitos presentes na amostra. A fase sólida deve ser umedecida previamente ao carregamento para favorecer a passagem homogênea da amostra pelo cartucho evitando a formação de canais preferenciais;
- Carregamento que consiste na introdução da amostra com velocidade satisfatória, propiciando o contato amostra/fase extratora mesmo quando ocorre a retenção do analito e, às vezes, de alguns interferentes;
- Limpeza da coluna para remoção dos interferentes retidos. É importante que o solvente de limpeza tenha características químicas para eluir apenas os compostos indesejáveis, não interferindo na retenção do analito na fase extratora. Após passagem do solvente de limpeza, a fase extratora deve ser secada para remoção de todo resíduo dessa etapa;
- Eluição dos analitos através de pequeno volume de solvente que arrasta preferencialmente os analitos retidos na fase extratora para posterior análise.

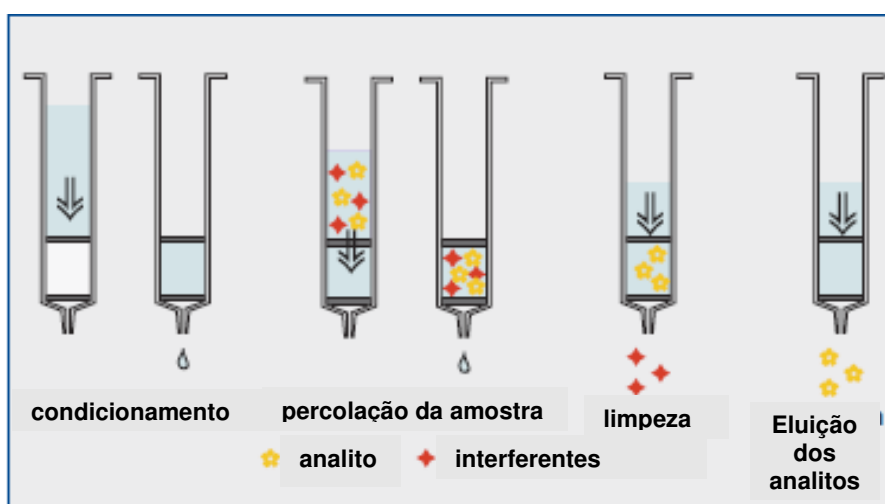


Figura 7: Representação esquemática da técnica de extração em fase sólida (adaptado de MACHEREY-NAGEL, 2006).

A etapa crítica da aplicação de SPE consiste na retenção de compostos interferentes que apresentem capacidade de adsorção similar ao analito. Em função da não seletividade dos sorventes, algumas estratégias alternativas têm sido adotadas.

O emprego dos MIP na extração em fase sólida permite extrações altamente seletivas e consiste na percolação da amostra em colunas recheadas com os polímeros impressos molecularmente, ou seja, as partículas do polímero são dispostas entre dois discos de retenção nos cartuchos de SPE, onde a espécie de interesse fica retida. As etapas de extração, concentração e isolamento são possíveis em um único passo. (MOSBACH, 2000).

Outra estratégia é sintetizar o polímero dentro dos cartuchos de SPE; a limpeza e a remoção do molde são realizadas no mesmo cartucho da extração, como citado em artigo de revisão por PICHON (2006).

A aplicação extensiva dos MIPs como fase sólida em SPE se deve às vantagens que proporciona, como: simplicidade de aplicação, alto grau de seletividade quando comparados a sorventes convencionais como C18 (cartucho de sílica modificada) e resinas de troca iônica, bem como a extração de interferentes da amostra (FIGUEIREDO, 2009).

BRAVO e colaboradores (2007) sintetizaram um MIP a base de ácido metacrílico para a extração seletiva de dietilbestrol, um composto estrogênico normalmente encontrado em baixas concentrações no ambiente. Após a extração, o eluato foi diretamente injetado em um equipamento de HPLC. A seletividade do MIP foi avaliada frente a diversos compostos da mesma classe tais como hexestrol, estrona, estriol, estradiol e etinilestradiol. O MIP apresentou boa seletividade e também boa capacidade de pré-concentração. Os autores também enfatizaram como principais vantagens, a possibilidade de trabalhar com grandes volumes de amostras (pré-concentração), as restritas etapas de manipulação das amostras, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo (BRAVO *et al.*, 2007).

O trabalho de FERNANDEZ-LLANO e co-autores (2007) relatou a síntese de um MIP seletivo a diclofenaco empregando-se 2-(dimetilamino) etil-metacrilato como monômero funcional. O polímero foi aplicado para a extração de diclofenaco em urina seguido de quantificação por voltametria de pulso diferencial. Os resultados foram satisfatórios em termos de seletividade e sensibilidade.

O trabalho de ARIFFIN e colaboradores (2007) relatou a síntese de um MIP para diazepam empregando ácido metacrílico como monômero funcional. O polímero foi usado na extração seletiva de diazepam e outros benzodiazepínicos em amostras de cabelo seguidas da separação e quantificação por cromatografia líquida com detector de massa sequencial. Essas amostras foram inicialmente lavadas e depois pré-extraídas com metanol. O extrato foi secado e o resíduo foi suspenso em tolueno para a execução na SPE. Os autores promoveram uma comparação entre a SPE usando C18 e MIP como fase sólida. O cromatograma da extração usando MIP foi mais limpo que aquele obtido após o uso de C18.

ZURUTUZA e co-autores (2005) sintetizaram um MIP para benzoilecgonina, um metabólito da cocaína, empregando ácido metacrílico como monômero funcional. O MIP foi então empregado em uma SPE e os resultados demonstraram seletividade satisfatória na extração de benzoilecgonina em amostras aquosas. Segundo os autores, o sucesso na preparação e avaliação do MIP pode representar a primeira etapa para a construção de um sensor para detectar a presença de cocaína por meio de seu metabólito.

Embora uma imensa variedade de MIPs tenha sido empregada em procedimentos de SPE, ressalta-se não haver uma variação significativa na configuração desses procedimentos. Assim, o aspecto inovador das novas propostas, recai inteiramente nas variações da rota de síntese e dos reagentes empregados na mesma, além de estudos relacionados às etapas de lavagem. Dessa forma, alguns materiais mais seletivos e com um maior percentual de sítios específicos têm sido propostos, tornando ainda mais atraente essa técnica dentro da área de separação.

2.5. FENILALANINA

A fenilalanina (Phe) é um aminoácido essencial, ou seja, não é sintetizado pelo organismo humano, devendo ser obtido por meio da alimentação. É classificada como um aminoácido apolar e possui um anel aromático em sua cadeia lateral (LEHNINGER, 2011). Sua estrutura molecular é representada pela Figura 8.

Os aminoácidos, em meio aquoso, possuem propriedade anfótera. Isto ocorre porque o grupo carboxila, sendo ácido, pode perder um próton (H^+) por dissociação e o grupo amino, básico, pode capturar um próton (H^+). Se ambos os grupos estão ionizados, o

resultado é o chamado *zwitterion* (do alemão, significando íon de ambas as cargas, positiva e negativa).

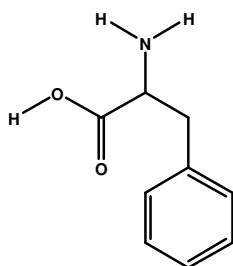


Figura 8: Estrutura molecular da fenilalanina (adaptado de LEHNINGER, 2011).

A fenilalanina se apresenta na forma de um cristal branco ou pó cristalino, sem odor ou com um leve odor característico e com um sabor levemente amargo. Prontamente solúvel em ácido fórmico, moderadamente solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol. Dissolve-se em ácido hidrocloreídrico diluído. Apresenta valores de pK em 2,11 e 9,13, e ponto isoeletrônico (pI) em 5,48 e possui massa molar igual a 165,18g.mol⁻¹, além de ponto de fusão de 283 °C (LEHNINGER, 2011).

A fenilalanina é um aminoácido comum que usualmente está presente em todas as proteínas de origem animal ou vegetal na proporção de 3 a 6 % (CLARK, 2010).

Existe um grupo de pessoas que sofre de uma doença hereditária chamada fenilcetonúria (PKU). A essas pessoas falta uma enzima que é necessária para digerir a fenilalanina. Essa, como não é absorvida, passa a acumular-se no organismo até ser convertida em compostos tóxicos, designados por fenilcetonas (como o fenilacetato e a fenetilamina), que são expelidos pela urina. Os doentes com PKU que ingerem a fenilalanina sofrem de diferentes sintomas de toxicidade, incluindo atrasos mentais (especialmente em crianças) e distúrbios intelectuais nos adultos.

A baixa ingestão de proteínas é preconizada no tratamento dietoterápico dos fenilcetonúricos, por isso, vários métodos têm sido propostos com o intuito de reduzir esse aminoácido nos alimentos (CLARK, 2010).

Os métodos usados para a remoção de fenilalanina baseiam-se na liberação desse aminoácido por hidrólise química ou enzimática, sendo posteriormente removido por tratamentos diferenciados. Vários métodos são utilizados para a remoção, como adsorção em carvão ativado ou resinas de adsorção, cromatografia de troca iônica, peneira molecular ou filtração em gel, além de desaminação desse aminoácido pela enzima fenilalanina amônia liase. A escolha do método deve considerar a praticidade, a

reprodutibilidade e a relação custo/eficiência de cada tratamento e ainda apresentar reconstituição e utilização viáveis (CLARK, 2010).

2.6. SÍNTESE DE MIP A PARTIR DA FENILALANINA

Vários estudos têm mostrado que a polimerização dos MIPs a baixas temperaturas forma polímeros com maior seletividade em relação a MIPs sintetizados a altas temperaturas. Nos estudos realizados com MIPs, considera-se baixas temperaturas valores menores que 10°C e altas temperaturas valores iguais ou superiores à 50°C.

Para polimerizar em temperaturas mais baixas é necessário empregar a polimerização por processo fotoquímico. A decomposição térmica de azo-inibidores é a fonte comum mais usada na formação de MIPs baseados em divinilbenzeno e metacrilato. A decomposição fotoquímica do AIBN permite que os MIPs sejam preparados em temperaturas menores, resultando num aumento na eficiência de separação dos polímeros (GRANADO, 2011).

Várias técnicas com o emprego dos MIPs têm sido aplicadas na separação de inúmeros compostos em matrizes biológicas, ambientais, alimentícias, entre outras. Para a síntese de MIP a partir da fenilalanina, poucos trabalhos foram desenvolvidos.

SPIVAK (2005), MOSBACH e co-autores (1991) apresentaram um estudo sobre a enantiosseletividade de polímeros impressos usando como molécula molde a L-fenilalanina anilida. Um polímero foi obtido a 60°C (KEMPÉ e MOSBACH, 1991) e outro foi sintetizado por processo fotoquímico a 0°C (O'SHANNESY et al., 1989). O último processo resultou em um polímero de maior seletividade (BARROS, 2010). A razão foi baseada no princípio de Le Chatelier, o qual afirma que temperaturas menores irão conduzir o complexo pré-polimérico em direção à formação do complexo, aumentando o número e a qualidade dos sítios de ligação formados.

LIN e colaboradores (1997) realizaram um trabalho onde os enantiômeros D e L do aminoácido fenilalanina foram separados por eletrocromatografia (CEC) capilar contendo MIP como material seletivo. Com base nos eletrocromatogramas, a separação dos enantiômeros D e L da fenilalanina foi obtida, porém a resolução não foi satisfatória ($R_s = 1,22$), basicamente devido aos reduzidos números de pratos teóricos. Para exemplificar a importância do diâmetro das partículas em separações eletroforéticas, os autores desse trabalho fizeram a separação enantiomérica da D e L fenilalanina por

eletroforese capilar (CE) em gel. A diferença do emprego dos MIPs em CE em gel e em CEC decorre que, na primeira, as partículas obtidas do MIPs são incorporadas com gel (geralmente poli(acrilamida)) e então inseridas dentro do capilar, enquanto que na CEC o processo de formação dos MIPs ocorre *in situ*. Em CE em gel, o controle do diâmetro de partículas do MIP assegurou melhor resolução cromatográfica ($R_s = 1,41$).

Alguns trabalhos descreveram a utilização de diversos adsorventes na remoção de fenilalanina em soluções aquosas.

LEE e colaboradores (2006) verificaram a adsorção e dessorção de fenilalanina em um adsorvente polimérico não iônico, em diferentes pHs e temperaturas. A capacidade de adsorção máxima alcançada foi de $41,3\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em pH 7 e temperatura de 10°C . Resultado similar foi obtido por DÍEZ e co-autores (1998), avaliando a adsorção de fenilalanina em quatro tipos de resinas poliméricas. LONG e colaboradores (2009) investigaram a adsorção de diversas biomoléculas, incluindo a fenilalanina, em aerogéis esféricos de carbono e obtiveram capacidade de adsorção de $66,07\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

O desenvolvimento de adsorventes mais específicos para fenilalanina, visando a otimização de métodos para sua remoção, torna-se extremamente importante, uma vez que esse fator tem sido preocupante considerando-se a doença PKU. Na literatura não existem trabalhos sobre MIPs a partir da fenilalanina como adsorventes em SPE. Assim, a síntese de um polímero impresso utilizando a fenilalanina como molécula molde com vistas a sua aplicação na técnica de SPE se justifica.

2.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A formação de polímeros porosos altamente reticulados não é uma ciência inteiramente preditiva e os materiais resultantes não são fáceis de serem caracterizados completamente. O uso de técnicas como ressonância magnética nuclear no estado sólido (RMN) e espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), bem como técnicas de análise térmica (PEÇANHA, 2012), nem sempre permitem uma caracterização total uma vez que os processos de impressão são realizados em nível molecular.

No entanto, em recentes trabalhos envolvendo ressonância magnética nuclear, foi possível verificar a formação de ligações dos monômeros funcionais ao redor da

molécula molde. Estudos envolvendo espectrofotometria no UV-Vis e diferenças de temperatura na eluição em HPLC também têm sido relatados (GRASSI, 2008).

Com o objetivo de conhecer os aspectos químicos e morfológicos dos MIPs, além de elucidar o comportamento dos polímeros sintetizados, foram utilizadas as seguintes técnicas e métodos analíticos: espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível.

2.7.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é aplicada para análises qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos. A técnica de FTIR pode ser usada para caracterizar e identificar materiais, monitorar reações químicas e para determinar a ausência ou presença de grupos químicos específicos (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Uma molécula emite sinal na espectroscopia de infravermelho se houver uma mudança no momento de dipolo durante uma vibração, o que significa que as moléculas que têm ligações assimétricas são ativadas por radiação infravermelho. Moléculas simples têm somente um tipo de ligação, a qual pode esticar. Moléculas mais complexas podem ter mais ligações, as quais podem vibrar de várias formas diferentes, como estiramento (*stretching*) simétrico e assimétrico, tesoura (*scissoring*), balanço (*rocking*), abano (*wagging*) e torção (*twisting*) (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

2.7.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A técnica de microscopia eletrônica de varredura mostra as alterações na superfície da amostra. Ela mostra a mudança na morfologia e topografia, a rugosidade, fissuras ou outra heterogeneidade na superfície. A superfície da amostra é explorada com um feixe de elétrons. Os elétrons secundários e retro-espalhados produzidos são detectados e usados para gerar uma imagem da amostra (AMIN *et al.*, 2007).

O microscópio eletrônico de varredura é capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 vezes) e resolução. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons da superfície da amostra.

Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID *et al.*, 2007).

2.7.3. ANÁLISE TÉRMICA

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (WEST, 1984).

As principais técnicas de análise térmica são a calorimetria exploratória diferencial (DSC), que mede a quantidade de energia absorvida ou liberada por uma amostra em função da temperatura ou tempo e a termogravimetria (TG), que monitora a mudança na massa de uma substância em função da temperatura ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura (SILVA, 2006).

As propriedades térmicas básicas de um material são descritas pela dependência de sua entalpia com a temperatura (PERRY, 1984).

2.7.3.1. TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A termogravimetria é definida como um processo contínuo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra em função da temperatura (varredura de temperatura), ou do tempo a uma temperatura constante (modo isotérmico) (WEST, 1984).

As áreas de aplicação de TG incluem a determinação de pureza, de teores de umidade, de voláteis e de resíduos, da composição de blendas e copolímeros, da estabilidade térmica do material, da eficiência de retardantes de chama e antioxidantes, da cinética de reações e muitas outras. Sua aplicação na análise de polímeros se deu em função da necessidade do conhecimento de fatores como estabilidade térmica e oxidativa de polímeros, tão importantes e determinantes das condições de processamento do material (OHLWEILER, 1978).

2.7.3.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é usada para investigar as propriedades térmicas de materiais orgânicos e inorgânicos. Ela fornece informações quantitativas sobre essas mudanças térmicas incluindo a taxa de transferência de calor. Dentre as aplicações podemos citar a determinação qualitativa e quantitativa de transições de fases tais como ponto de fusão, temperatura de transição vítrea, cristalização, estudo de cinética de polimerização, de decomposição, de cura e testes de estabilidade oxidativa (WEST, 1984).

Na DSC mede-se a quantidade de calor envolvido na transformação. Quando uma transição térmica ocorre na amostra, energia térmica é transferida tanto para a amostra quanto para a referência com o objetivo de mantê-las à mesma temperatura. Como esta energia transferida é exatamente equivalente a quantidade de energia absorvida ou liberada na transição, o balanceamento fornece uma medida direta desta energia envolvida no processo, à temperatura na qual ocorreu a transição (PERRY, 1984).

2.7.4. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL

Na espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível são usados instrumentos destinados à medida da energia radiante emitida ou absorvida por dada substância pesquisada. A amostra analisada absorve certa fração da luz incidente e transmite a restante. A luz transmitida é captada por um detector, que a transforma em um sinal elétrico, o qual é intensificado por um amplificador. Por meio desse sinal elétrico é expresso um valor de absorbância que pode ser correlacionado com a concentração da substância pesquisada (WILLARD *et al.*, 1979; SKOOG *et al.*, 2002).

3. METODOLOGIA

A seguir, são descritos os procedimentos analíticos empregados nesse estudo, onde realizou-se a síntese e a caracterização dos polímeros molecularmente impressos a partir da molécula molde fenilalanina e dos polímeros não impressos em condições que serão apresentadas. Posteriormente, a extração da molécula molde fenilalanina dos polímeros impressos foi realizada e, na sequência, procedeu-se aos ensaios de adsorção.

3.1. SÍNTESE DOS MIPs E NIPs

O processo de síntese selecionado nesse estudo para a produção dos MIPs e NIPs foi via polimerização em solução e as interações entre a molécula molde e o monômero funcional foram de natureza não-covalente. A síntese foi adaptada de HUNG e colaboradores (2005). A reação em questão se deu por crescimento de cadeia via radical livre.

O ácido metacrílico foi utilizado como monômero, o etileno glicol dimetacrilato como agente de reticulação, o 2,2-azobisisobutironitrila como iniciador, a fenilalanina como molécula molde e o clorofórmio como solvente.

A síntese dos MIPs foi realizada utilizando-se monômero funcional em excesso com relação à quantidade de Phe, pois, assim, procurou-se garantir que o mesmo pudesse interagir com todos os sítios disponíveis no molde (SPIVAK, 2005).

Dentre os vários reagentes reticulantes disponíveis no mercado, optou-se por utilizar o etileno glicol dimetacrilato uma vez que o mesmo tem sido empregado em larga escala e com grande sucesso na síntese de MIP (AL-KINDY *et al.*, 2000; TARLEY *et al.*, 2005).

O clorofórmio foi utilizado como solvente pelo fato de ser apolar e com constante dielétrica baixa, favorecendo, dessa forma, a estabilidade das interações analito-monômero, além de fornecer um meio onde o analito e monômeros fossem solúveis.

Nesse estudo variou-se a razão “molécula molde / monômero funcional”, de forma a otimizar as condições de síntese, usando a seletividade como critério de otimização, uma vez que tal fator influenciam as propriedades de ligação e seletividade dos MIPs.

Para o estudo da influência da razão “molécula molde / monômero funcional” nas propriedades dos MIPs, foram sintetizados MIPs com diferentes razões “molécula molde / monômero funcional” conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Quantidades dos reagentes utilizadas na síntese dos MIPs a partir da fenilalanina.

MIP	Fenilalanina (g)	MAA (µL)	EGDMA (µL)	AIBN (g)	Clorofórmio (mL)	Tempo de reação (h)
MIP-1	0,0167	682	4720	0,0205	5	24
MIP-2	0,0173	682	4720	0,0211	5	10
MIP-3	0,0168	682	4720	0,0205	5	6
MIP-4	0,0172	682	4720	0,0200	5	6
MIP-5	0,0167	682	4720	0,0201	5	6
MIP-6	0,0319	682	4720	0,0200	5	6
MIP-7	0,1623	682	4720	0,0206	5	6
MIP-8	0,0863	3410	23600	0,1000	25	6

Como controle da seletividade dos MIPs, foram sintetizados NIPs nas condições apresentadas na Tabela 3. Para cada grupo de MIPs sintetizados, foi sintetizado um NIP. Portanto, o NIP-1 refere-se aos MIPs 1, 2, 3 e 4 e o NIP-2, refere-se aos MIPs 5, 6, 7 e 8.

Tabela 3: Quantidades dos reagentes utilizadas na síntese dos NIPs.

NIP	Fenilalanina (g)	MAA (µL)	EGDMA (µL)	AIBN (g)	Clorofórmio (mL)	Tempo de reação (h)
NIP-1	0	682	4720	0,0200	5	6
NIP-2	0	682	4720	0,0204	5	6

Foram realizadas 10 sínteses, sendo 8 MIPs e 2 NIPs. Desses, 3 MIPs (4, 6 e 8) e 2 NIPs (1 e 2) foram caracterizados por FTIR, MEV, TG, DSC e realizado estudo de adsorção de fenilalanina variando-se a quantidade (massa) de polímero utilizada nos ensaios.

As sínteses dos MIPs (1, 2 e 3,) foram realizadas e consideradas como testes preliminares e ajustes nas condições de reação. Por isso, esses MIPs não foram caracterizados como os demais e nem utilizados nos ensaios de adsorção da Phe. O tempo de síntese de 6 horas foi estabelecido a partir dessas sínteses preliminares. O

MIP-5 obtido apresentou-se muito semelhante ao MIP-4, por isso decidiu-se que não seria necessário investigá-lo.

O MIP-7 não foi caracterizado nem utilizado nos ensaios de adsorção de Phe porque ele não se apresentou na forma de sólido branco como os demais. A solução no frasco reacional ficou turva, mas o polímero parece não ter se formado durante a síntese. Isso pode ter ocorrido pelo fato do frasco ter ficado em contato com a parede do banho, dificultando a incidência da luz UV e prejudicando, desta forma, a polimerização desse MIP. Percebeu-se a formação de uma fina camada de gelo sobre o frasco durante o tempo de síntese.

As sínteses dos NIPs 1 e 2 foram feitas com as mesmas condições com o intuito de se verificar a reprodutibilidade delas. Ambos foram caracterizados e utilizados nos ensaios de adsorção de fenilalanina.

Todas as sínteses foram realizadas à temperatura de 4°C utilizando banho ultratermostático (Quimis, modelo Q214D2) e irradiação UV com lâmpada de mercúrio ($\lambda=365\text{nm}$), com o intuito em promover interações por ligações de hidrogênio.

Todo o material empregado na pesagem, síntese e extração do polímero, foi previamente lavado, secado e mantido em dessecador a vácuo (J. Prolab) por, no mínimo, 24h antes do uso, a fim de minimizar a presença de umidade durante o processo.

A molécula molde (fenilalanina), o monômero funcional (ácido metacrílico), o agente reticulante (etileno glicol dimetacrilato) e o solvente (clorofórmio) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O IR (2,2-azobisisobutironitrila) foi adquirido da Polysciences. O solvente metanol grau HPLC foi adquirido da Merk e o ácido acético proveniente da Synth. Todos foram utilizados como adquiridos, ou seja, sem purificação prévia.

Inicialmente para o preparo da síntese, a molécula molde foi pesada dentro de um frasco reacional (frasco ampola de 30mL) em balança analítica (Shimadzu, modelo AEL-405M). Em seguida, mediu-se os respectivos volumes de monômero ácido metacrílico e do solvente clorofórmio, por meio de micropipetas automáticas (Eppendorf), adicionando-os no frasco reacional contendo a molécula molde fenilalanina. O frasco foi agitado manualmente onde, posteriormente, foi adicionado o agente reticulante etileno glicol dimetacrilato e o iniciador radicalar AIBN.

Imediatamente após a adição dos reagentes no frasco reacional, procedeu-se a degaseificação da amostra com purga de nitrogênio durante 5 minutos.

O frasco foi então selado e colocado em banho ultratermostático (Quimis, modelo Q214D2) à 4°C adaptado com uma câmara contendo lâmpada UV (365nm / 100W) conforme mostra a Figura 9. Os tempos de reação variaram conforme descrito nas Tabelas 2 e 3.

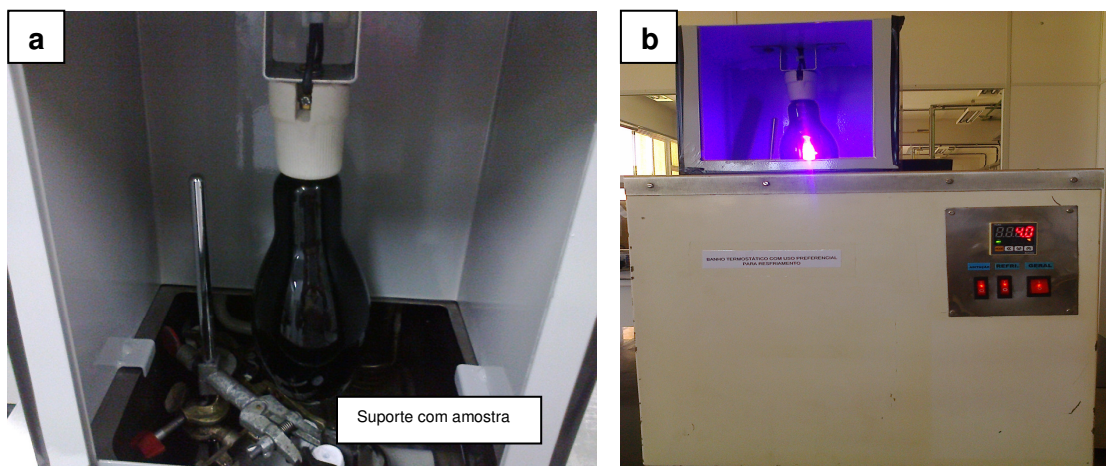


Figura 9: (a) Fotografia da câmara aberta com lâmpada UV e suporte da amostra no fundo. (b) Fotografia da montagem da câmara sobre o banho ultratermostático.

Após a polimerização, evidenciada pela formação de um sólido branco conforme mostrado na Figura 10, o frasco foi retirado do banho e o clorofórmio (sobrenadante) de algumas amostras foi retirado com o auxílio de uma pipeta.

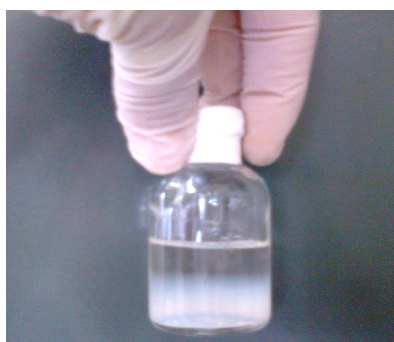


Figura 10: Fotografia do frasco reacional após a polimerização.

O polímero foi então secado em estufa à vácuo (Vacuoterm 6030A) por 12 horas à 65°C para remoção de solvente residual.

Posteriormente ao processo de secagem, a ampola de síntese foi quebrada e o polímero seco foi submetido à moagem utilizando um moinho analítico (IKA A11BS1). A

tamização dos polímeros foi necessária para uniformizar as partículas de modo a atingirem um tamanho em torno de 50 μm , em virtude do tamanho recomendado para SPE estar entre 30 - 60 μm . Partículas menores aumentam a resistência do sistema a passagem do solvente e exigem a aplicação de muita pressão, fato conhecido na cromatografia em fase líquida, onde a fase sólida apresenta partículas em torno de 5 μm . Os polímeros foram peneirados em tamizes, sendo utilizadas as partículas que ficaram na faixa granulométrica entre 0,042 e 0,050mm pelo fato da porosidade dos *frits* (discos que suportam e limitam o sorbente dentro do cartucho) utilizados em SPE serem normalmente de 20 μm (PEÇANHA, 2012).

Polímeros de controle (NIPs) também foram sintetizados utilizando-se as mesmas condições descritas para as sínteses dos MIPs, com exceção da adição da molécula molde (fenilalanina) no meio reacional.

Os MIPs e NIPs obtidos foram acondicionados em frascos plásticos fechados e mantidos à temperatura ambiente.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MIPs e NIPs

No estudo em questão, os polímeros MIPs e NIPs foram caracterizados de acordo com as seguintes técnicas:

- caracterização química do polímero por meio de espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- caracterização morfológica por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- caracterização térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG).

3.2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de absorção molecular na região do infravermelho para as amostras, na faixa de 4000 a 675 cm^{-1} , foram obtidos em espectrofotômetro FTIR (THERMO FISHER SCIENTIFIC, modelo Nicolet 6700), no modo ATR, com 64 varreduras e resolução de 4

cm^{-1} (cristal Ge). Os espectros foram obtidos à temperatura $\approx 20^\circ\text{C}$ com adição direta da amostra no aparelho, sem tratamento prévio.

3.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia dos polímeros sintetizados impressos e não impressos, foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As microscopias obtidas para os MIPs e NIPs foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (HITACHI, modelo TM3000 TABLETOP MICROSCOPE) na voltagem de 15,0kV e uma distância de trabalho entre 6 e 8.2mm. As imagens obtidas foram processadas utilizando o software TM3000. Todas as amostras foram analisadas à temperatura ambiente de $\approx 20^\circ\text{C}$. Esse microscópio não necessita de recobrimento (metalização) das amostras, pois a análise é realizada sob baixo vácuo.

3.2.3. TERMOGRAVIMETRIA (TG)

O teste foi realizado utilizando-se razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$) até 600°C , porta amostra de platina aberta e atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. O equipamento empregado foi um Shimadzu, modelo TGA-50WS. A massa das amostras analisadas variou entre 5,0 e 10,0mg.

3.2.4. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Para a realização desta análise, o equipamento de DSC utilizado, um Shimadzu modelo DSC-60, foi programado para aquecimento das amostras da temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$) a 300°C , a uma razão de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. O porta-amostra utilizado foi de alumínio selado com furo e o gás de arraste, nitrogênio, com vazão de $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A massa das amostras analisadas variou entre 5,0 e 10,0mg.

3.3. EXTRAÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE FENILALANINA

Após a síntese dos MIPs, é necessário proceder à remoção da molécula molde para que possa ocorrer a religação da mesma quando da aplicação final do MIP.

O método escolhido nesse trabalho, para a remoção da fenilalanina, foi extração por Soxhlet em virtude da maioria dos trabalhos pesquisados citarem esse método como sendo geralmente o mais eficiente para a remoção da molécula molde.

Nesse método, sucessivas lavagens com uma mistura de metanol e ácido acético (9:1, v/v) foram utilizadas até a extração completa da molécula molde, que foi monitorada por meio de leituras da solução eluente no espectrofotômetro UV-Vis (VARIAN, modelo Cary 50), sendo determinado, dessa forma, o tempo necessário para a extração.

Para esse monitoramento, foi realizada uma curva analítica para a solução de metanol e ácido acético (9:1, v/v) conforme consta no ANEXO I - Figura I.1 (Pag. 86).

Foram pesados 2,5g do polímero (MIP) em papel de filtro Whatman, sendo o papel fechado em forma de cartucho e transferido para o Soxhlet. Conectou-se ao Soxhlet, um balão tritubulado contendo inicialmente 300mL de metanol e ácido acético 9:1 (v/v). Utilizou-se uma entrada para coleta do extrato e na outra foi colocado um termômetro para monitoramento da temperatura, que foi programada para $65\pm 2^\circ\text{C}$ utilizando-se manta aquecedora (FANEM, modelo 178), conforme mostra a fotografia na Figura 11.

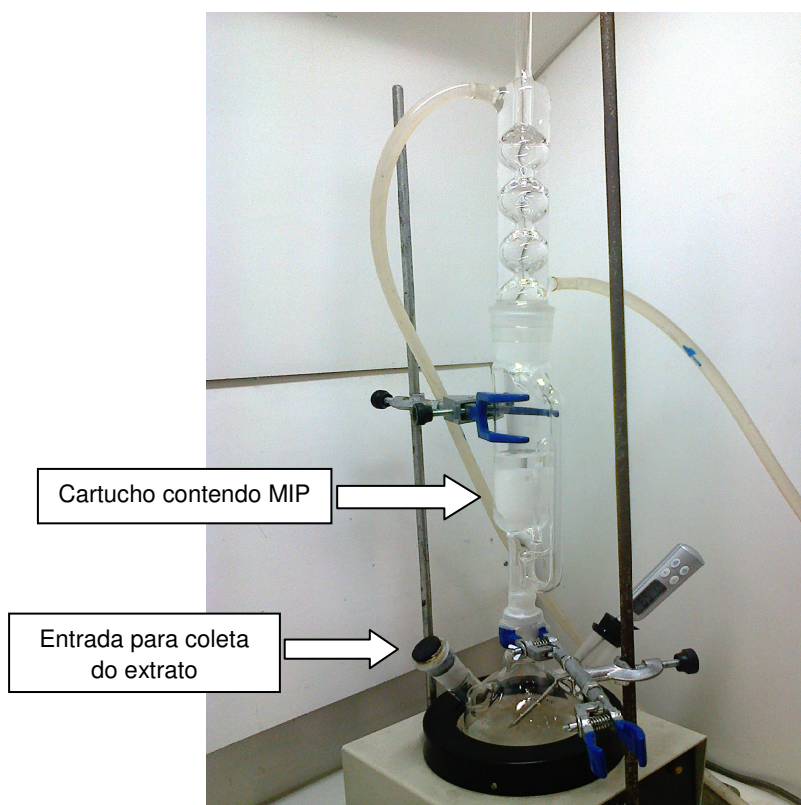


Figura 11: Fotografia da montagem para extração da fenilalanina, via Soxhlet.

Após um período de 4 horas de extração, foi retirada uma alíquota de 10mL do extrato e a mesma analisada em espectrofotômetro UV-Visível (VARIAN, modelo Cary 50), em comprimento de onda de 259nm para verificação da presença da fenilalanina. Confirmada a presença da molécula molde, todo o extrato era retirado do balão e substituído por uma nova solução de 300mL de metanol e ácido acético 9:1 (v/v). Ao atingir uma concentração em torno de $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, passou-se a utilizar um volume de 200mL de solução para a extração com o objetivo de reduzir o gasto de solvente.

Esse procedimento de extração foi repetido até o extrato não apresentar mais bandas de absorção em leitura no espectrofotômetro UV-Visível, indicando a ausência da fenilalanina, totalizando, dessa forma, um período de extração de 64 horas conforme indicado na Tabela 4.

Após a retirada da MM, o cartucho contendo MIP foi lavado com metanol ainda no Soxhlet, para a retirada do excesso de ácido, por um período de 4 horas, e então colocado em estufa à vácuo (Vacuoterm, modelo 6030A) à temperatura de $65\pm 2^\circ\text{C}$, para eliminação do excesso de solvente e secagem do mesmo.

Tabela 4: Monitoramento da extração da MM a partir dos MIP-4, MIP-6 e MIP-8.

Tempo (h)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Volume de solvente adicionado (mL)
	MIP-4	MIP-6	MIP-8	
4	1897,5388*	2080,4230	2223,8035	300
8	1295,2329	1756,0540	2040,3862	300
12	1065,1008	1511,7587	1863,1585	300
16	923,6514	1254,6140	1665,5598	300
20	783,7358	966,4427	1288,9313	300
24	449,4367	682,6590	1019,7207	300
28	357,3020	494,1489	866,7032	300
32	275,8980	479,0301	632,0449	300
36	234,1615	315,2759	492,1902	300
40	221,2977	216,0848	270,2246	200
44	186,7211	162,3965	205,5859	200
48	168,9975	110,4690	128,1761	200
52	82,4700	78,8156	96,9144	200
56	35,7900	41,3643	43,7148	200
60	12,3409	16,9974	21,5417	200
64	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0

*Amostra diluída 10x.

3.4. ENSAIO DE ADSORÇÃO DE FENILALANINA

Para a realização deste ensaio, foram escolhidos os polímeros MIP-4, MIP-6 e MIP-8, conforme explicitado anteriormente e os NIP-1 e NIP-2 sintetizados nas mesmas condições de processo que os MIPs citados, com exceção da adição da molécula molde. Foi também preparada uma solução-controle, sem polímero.

Foram pesados 25, 50 e 100mg, em duplicata, de cada MIP e NIP em Erlenmeyers de 50mL. Na sequência, adicionou-se, com o auxílio de micropipeta automática Eppendorf, 5mL de solução aquosa de fenilalanina com concentração de $450\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em cada Erlenmeyer. Os Erlenmeyers foram colocados em banho térmico com agitação orbital (shaker) (NOVA ÉTICA, modelo 304D) com agitação por 72 horas à 25°C , conforme mostrado na Figura 12.



Figura 12: Fotografia do ensaio de adsorção em shaker.

Posteriormente, as amostras contidas nos Erlenmeyers foram transferidas para tubos Falcon de 15mL e centrifugadas em centrífuga (SPINLAB, modelo SL16 RAV) a 4000rpm por 30 minutos.

O sobrenadante foi recolhido, filtrado e levado para leitura em espectrofotômetro UV-Visível (VARIAN, modelo Cary 50) a 258nm. Para a realização dessa leitura, preparou-se uma curva analítica para a fenilalanina em solução aquosa, conforme Figura I.2 - ANEXO I.

O mesmo procedimento para a solução-controle, sem polímero, foi realizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados os resultados obtidos durante a síntese, os ensaios de extração e adsorção da Phe e caracterização dos MIPs e NIPs obtidos e selecionados.

4.1. SÍNTESE DOS MIPs E NIPs

Os MIPs e NIPs foram obtidos conforme processo de síntese descrito na Metodologia (subitem 3.1). Uma fotografia do MIP-8, após o processo de secagem e antes da moagem, pode ser vista na Figura 13. Tanto os MIPs quanto os NIPs caracterizados, apresentaram aspecto cristalino, esbranquiçado e estrutura aparentemente rígida.



Figura 13: Fotografia do polímero formado (MIP-8) após processo de secagem.

Os MIPs e NIPs foram sintetizados a partir de um monômero funcional ácido. A escolha do MAA justifica-se pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico do ácido metacrílico e os grupos amino e ácido da molécula molde fenilalanina. A formação do possível complexo “monômero funcional - molécula molde” (“MF-MM”), por meio de impressão não-covalente, é ilustrada na Figura 14.

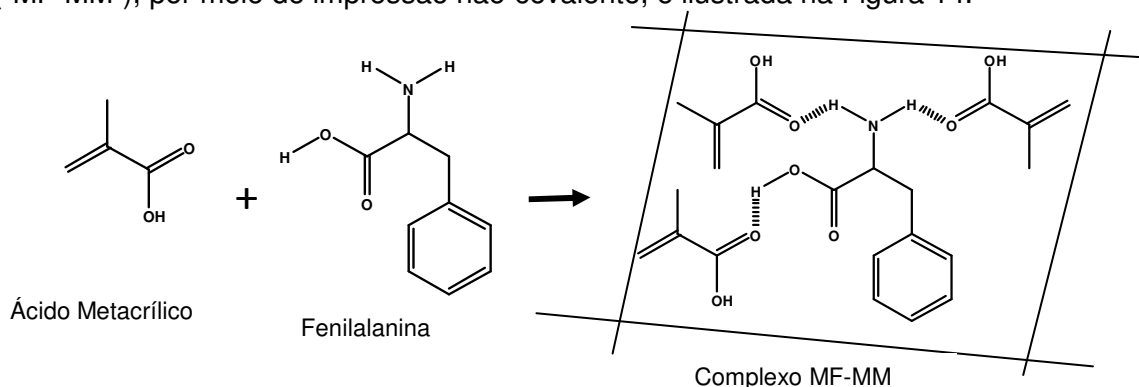


Figura 14: Representação da possível formação do complexo “MF-MM”.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MIPs E NIPs

A seguir, são apresentados os resultados das caracterizações dos MIPs e NIPs realizadas.

4.2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Realizou-se análise por FTIR do monômero, da molécula molde, do agente reticulante e dos polímeros sintetizados.

Apresenta-se, na Figura 15, o espectro FTIR para o MF ácido metacrílico.

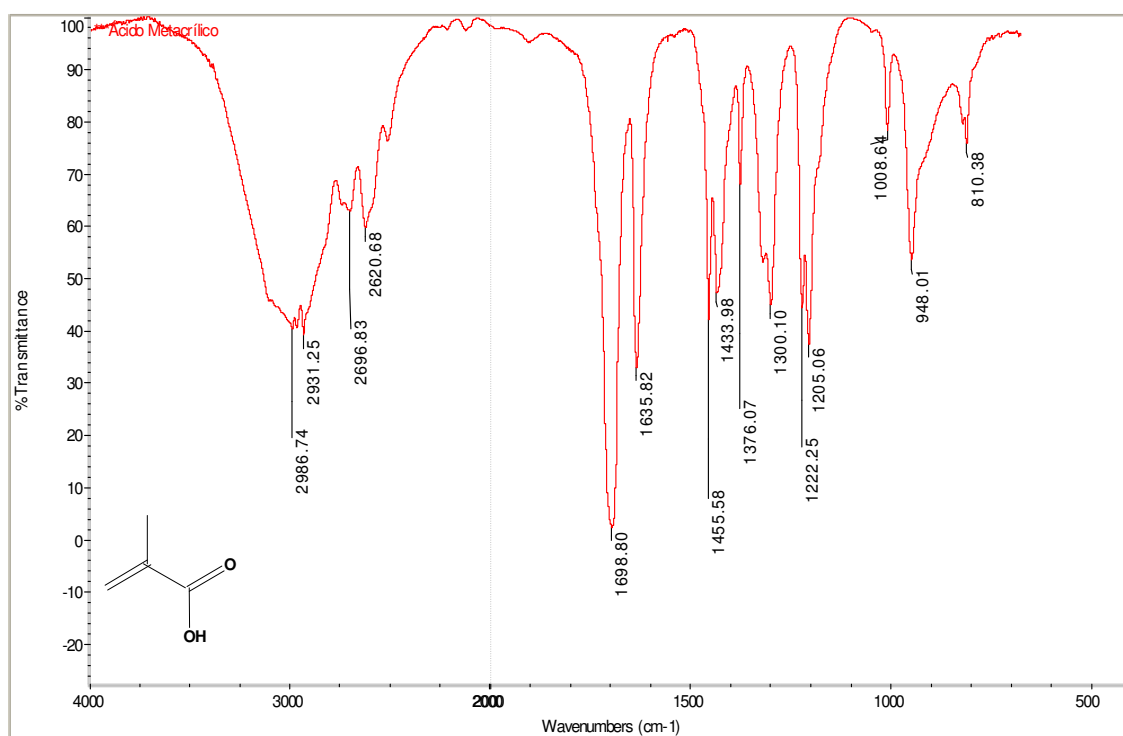


Figura 15: Espectro FTIR para o ácido metacrílico.

Observa-se uma forte banda na região de 1700cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento da carbonila (C=O) de ácido carboxílico, além de duas bandas características de deformação axial de C-O de ácido carboxílico em 1300 e 1200cm^{-1} e uma banda larga de média intensidade característica de deformação angular de O-H de ácido carboxílico a 948cm^{-1} . Ainda em relação ao espectro FTIR do MAA, pode-se observar a presença de uma banda larga na região de 2900cm^{-1} , característica de deformação axial de O-H de ácido carboxílico.

O espectro FTIR obtido na análise da MM fenilalanina é mostrado na Figura 16.

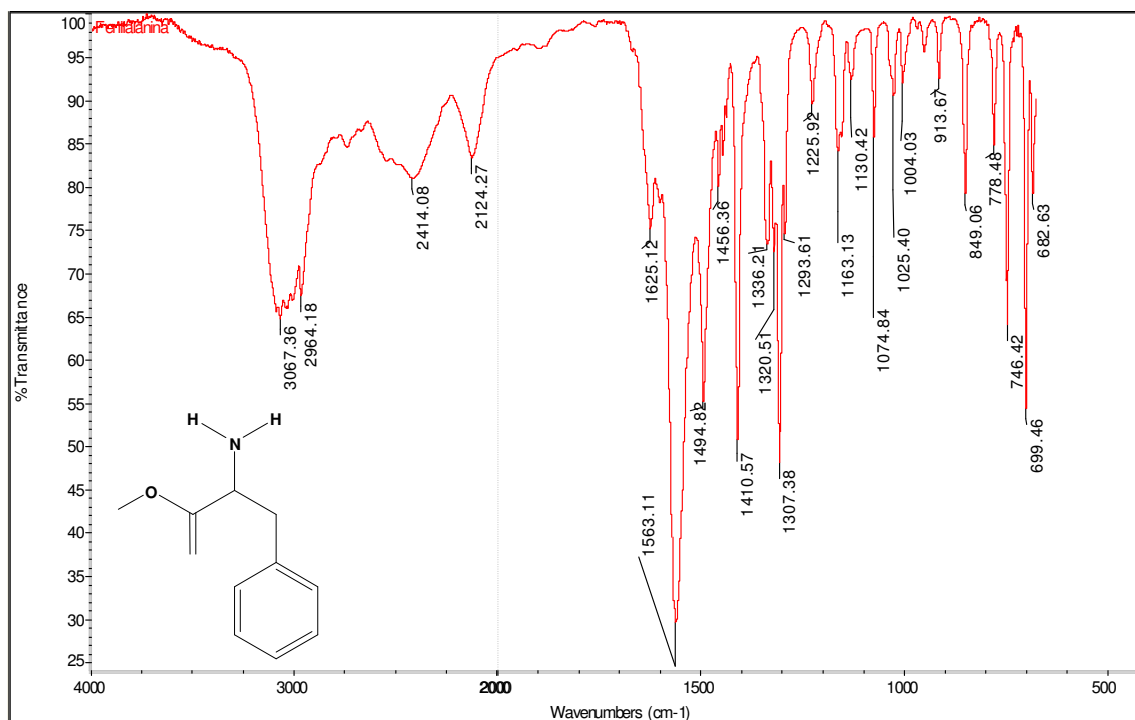


Figura 16: Espectro FTIR para a fenilalanina.

Nota-se que as bandas mais características de compostos aromáticos são encontradas na região de baixo comprimento de onda, entre 900 a 675cm^{-1} . Essas bandas provêm da deformação angular das ligações C–H do anel aromático. Observa-se, ainda, vibrações em 1456cm^{-1} , que envolve a deformação axial das ligações carbono-carbono do anel aromático, além de duas bandas características de deformação axial de C–O de ácido carboxílico em torno de 1300 e 1200cm^{-1} .

A banda na região entre 1090 a 1020cm^{-1} , em 1074cm^{-1} , corresponde ao estiramento de C–N da amina primária. Observa-se também uma banda entre 1590 e 1550cm^{-1} , que se apresenta de média a forte intensidade em 1563cm^{-1} , correspondente ao estiramento da carbonila de aminoácidos.

Em 2124cm^{-1} e em 2414cm^{-1} , nota-se a deformação axial de aminoácidos NH_3^+ e a deformação axial de aminas com cargas positivas, respectivamente, bandas essas que caracterizam os aminoácidos.

Na região entre 3100 a 3000cm^{-1} , pode-se observar um pico em 3067cm^{-1} , proveniente da deformação axial das ligações de C–H de anéis aromáticos, além de uma banda em torno de 1625cm^{-1} e outra em torno de 1500cm^{-1} que evidenciam a presença de

composto aromático na molécula molde. E ainda uma banda em 2964cm^{-1} , proveniente da deformação axial das ligações de C-H, característica de alifático.

Na Figura 17 pode-se ver o espectro FTIR para o etileno glicol dimetacrilato. Quanto às suas bandas características, as que podem ser visualizadas com maior evidência estão na região de 1700cm^{-1} , banda correspondente ao estiramento de C=O do grupo éster e a 1150cm^{-1} , banda correspondente a deformação axial de C-O de éster.

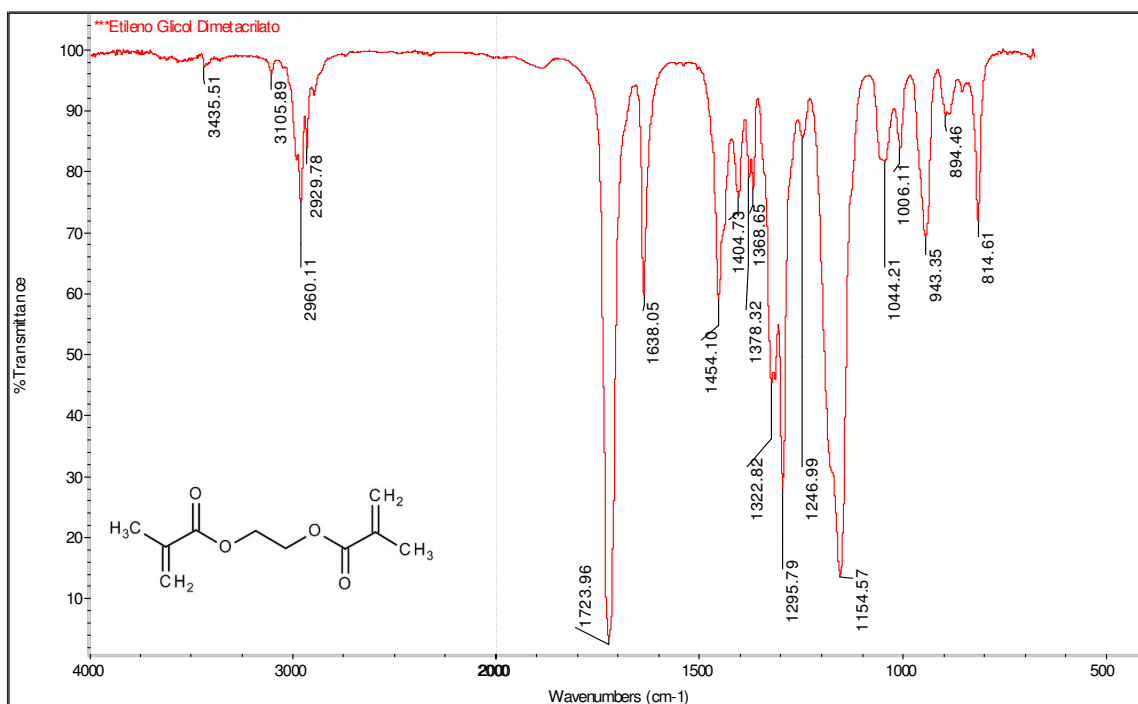


Figura 17: Espectro FTIR para o etileno glicol dimetacrilato.

Pode-se também observar um sinal próximo de 1640cm^{-1} proveniente do estiramento dos grupos vinila C=C, presente também no monômero ácido metacrílico, conforme é mostrado no espectro FTIR apresentado na Figura 15.

A Figura 18 refere-se ao espectro FTIR para o clorofórmio. Nota-se uma banda característica desse composto em 754cm^{-1} , proveniente da ligação C-Cl.

Os espectros FTIR referentes à fenilalanina e aos polímeros NIP-1 e MIP-4, MIP-6 e MIP-8, antes da extração da Phe, são apresentados na Figura 19. Os espectros FTIR individuais para os MIPs (4, 6 e 8), antes da extração da Phe, e NIPs (1 e 2) podem ser vistos no Anexo II (Págs. 87 a 89).

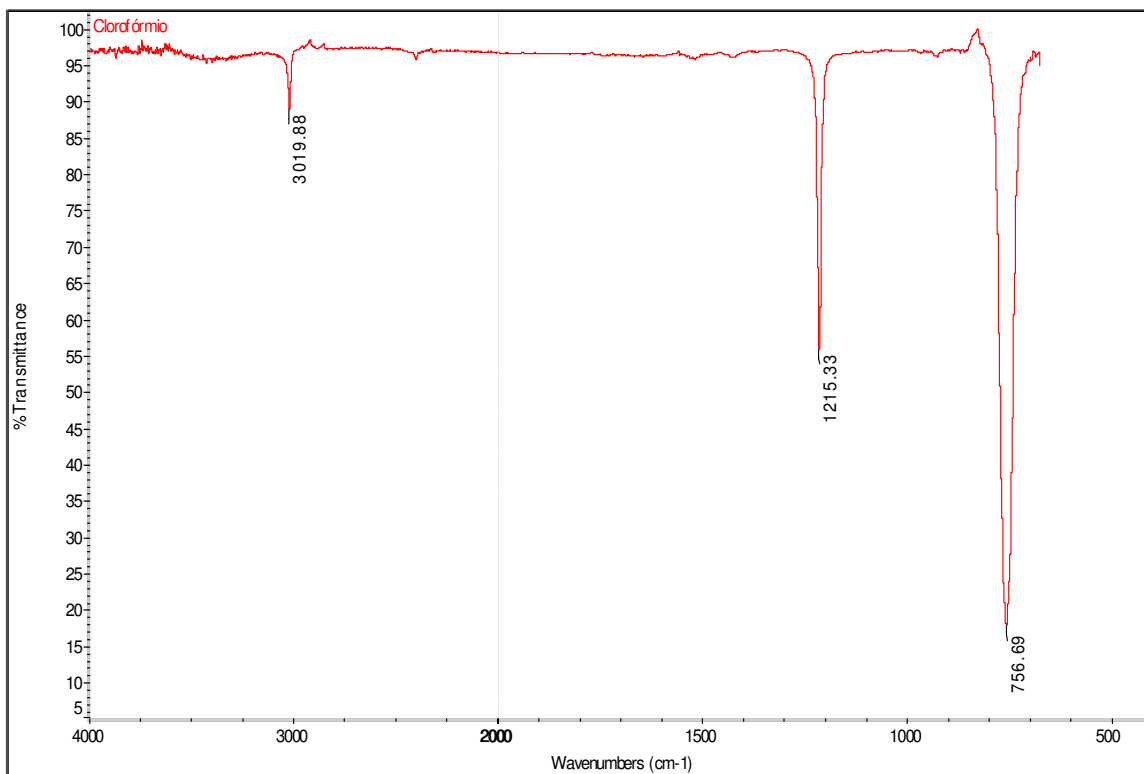


Figura 18: Espectro FTIR para o clorofórmio.

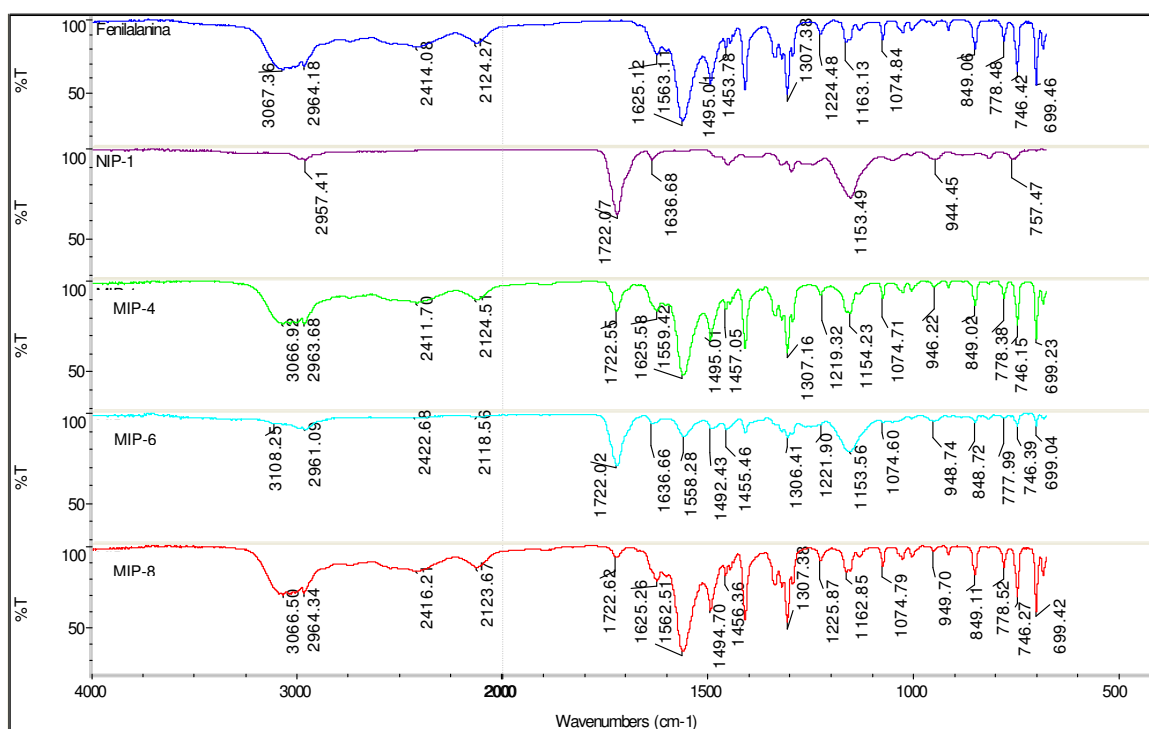


Figura 19: Espectros FTIR para a Phe, o NIP-1 e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8 antes da extração da Phe.

As principais bandas de absorção características dos grupos químicos presentes nos polímeros e na fenilalanina são apresentadas na Tabela 5.

Nos espectros FTIR de todos os polímeros sintetizados e apresentados na Figura 19, foi possível notar as bandas características dos grupos químicos presentes nesses polímeros, com destaque para as bandas entre 2964 e 2957 cm^{-1} , característica da deformação axial das ligações de C-H de alifático, em 1722 cm^{-1} , característica do estiramento da carbonila (C=O) de ácido carboxílico, e entre 1162 e 1153 cm^{-1} , característica da deformação axial de C-O de ácido carboxílico.

Tabela 5: Atribuições das principais bandas de absorção no espectro FTIR para os polímeros e a Phe.

Número de onda observado (cm^{-1})		Atribuição
Phe	MIPs e NIP	
849, 778, 746, 699	-	deformação angular de C-H de anel aromático
-	757	proveniente da ligação C-Cl
-	950 - 944	deformação angular de O-H de ácido carboxílico
1074	-	estiramento de C-N de amina primária
-	1155 - 1148	deformação axial de C-O de éster
1307, 1163	1300 - 1250	deformação axial de C-O de ácido carboxílico
1453	-	deformação axial C-C de anel aromático
1563	-	estiramento de C=O de aminoácidos
1625, 1500	-	deformação axial de compostos aromáticos
-	1638	estiramento dos grupos vinila C=C,
-	1720	estiramento da carbonila (C=O) de ácido carboxílico
2124	-	deformação axial de aminoácidos NH_3^+
2414	-	deformação axial de aminas com cargas positivas
-	2900	deformação axial de O-H de ácido carboxílico.
2964	2960 - 2952	deformação axial das ligações de C-H de alifático
3067	-	deformação axial das ligações de C-H de anel aromático

Nos espectros FTIR para os MIPs e, diferentemente no espectro FTIR para o NIP-1, observam-se as bandas de absorção características de aminoácidos em 2414 e 2124 cm^{-1} , a banda de absorção características da deformação axial das ligações de C-H de anel aromático em 3067 cm^{-1} e a banda de absorção características da ligação C=O de aminoácidos em 1563 cm^{-1} . Também pode-se observar que essas bandas foram mais intensas nos espectros FTIR para os MIPs 4 e 8, apresentando-se com menor intensidade no espectro FTIR para o MIP-6.

4.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias obtidas para os MIPs 4, 6 e 8, antes da extração da MM, são mostradas nas Figuras 20 a 22, respectivamente. Pode-se observar nessas micrografias que as polymerizações efetuadas levaram à produção de partículas irregulares. Tal morfologia é característica de MIPs e NIPs sintetizados pelo método de polymerização em solução.

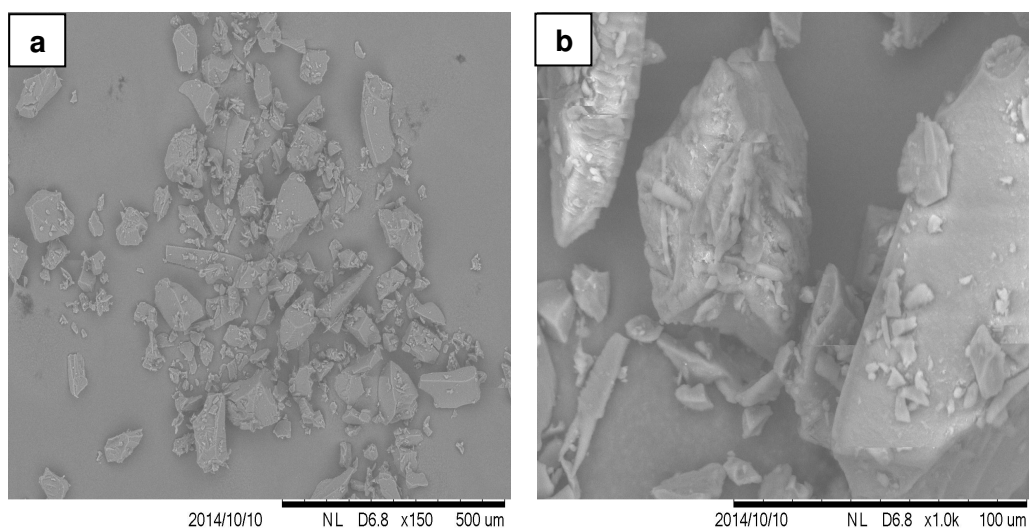


Figura 20: Micrografia para o MIP-4, antes da extração.

Aumento de 150x (a) e 1000x (b).

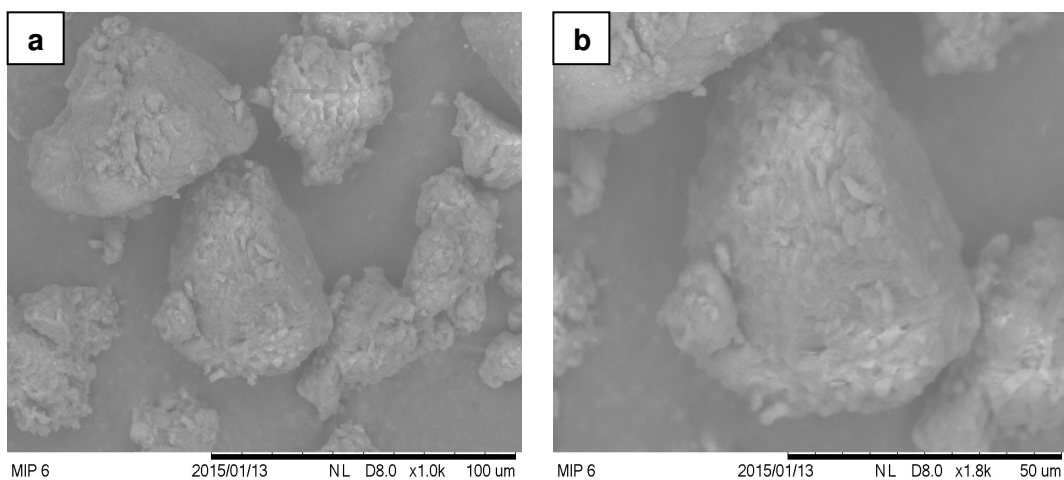


Figura 21: Micrografia para o MIP-6, antes da extração.

Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).

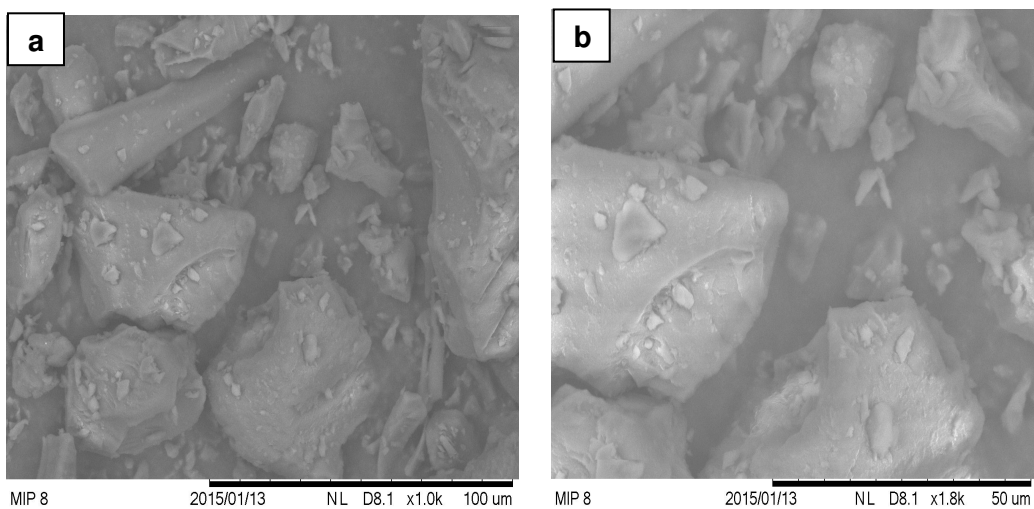


Figura 22: Micrografia para o MIP-8, antes da extração.
Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).

As micrografias para os NIPs 1 e 2 são mostradas nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

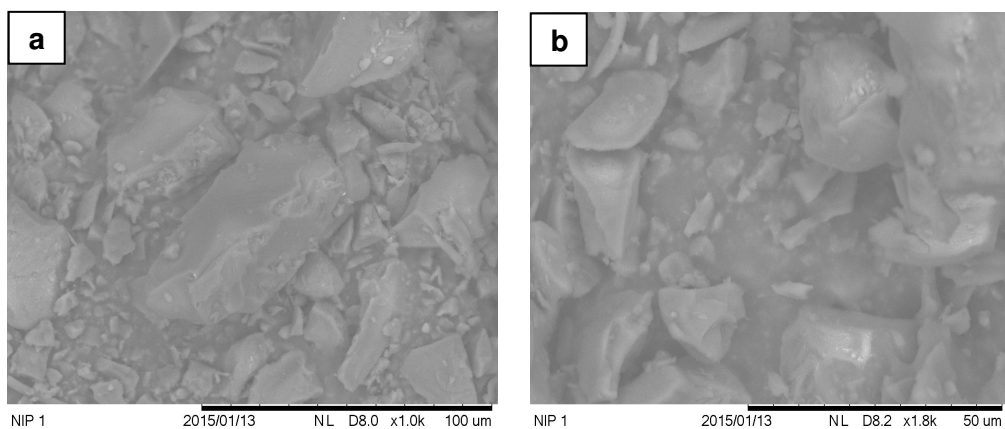


Figura 23: Micrografia para o NIP-1. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).

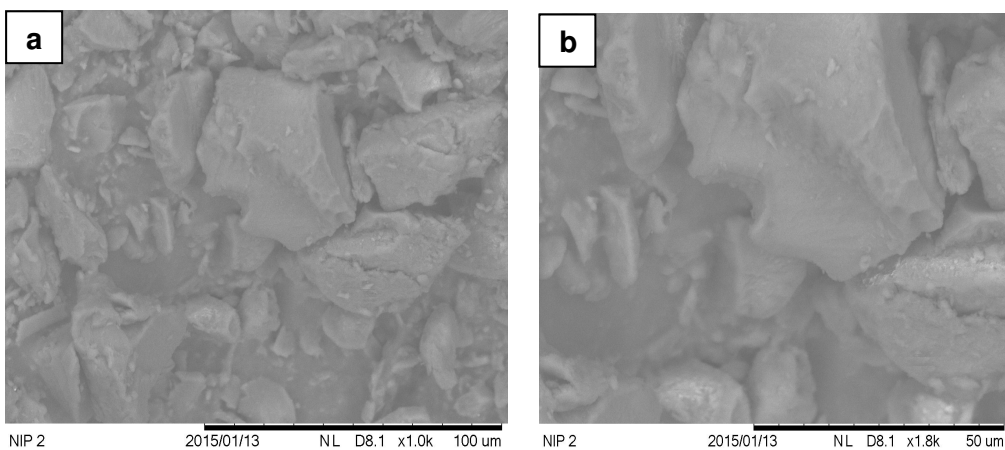


Figura 24: Micrografia para o NIP-2. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).

Na literatura ainda não está esclarecida a influência da molécula molde no tamanho das partículas sintetizadas. Alguns autores referem-se que não verificaram uma relação, enquanto outros observaram que as partículas não impressas eram maiores que as impressas (GRANADO, 2011).

Aparentemente não se observou nenhuma diferença entre as micrografias para os NIPs (1 e 2) e para os MIPs (4, 6 e 8). A presença da Phe parece não ter afetado a morfologia superficial do polímero.

4.2.3. ANÁLISE TÉRMICA (TG e DSC)

A curva termogravimétrica e sua derivada para a fenilalanina são apresentadas na Figura 25. As curvas mostradas nessa figura indicam a perda de massa (%) e a derivada dessa perda (DrTG ou DrTGA), ambas em função da temperatura (°C).

Ao analisar a Figura 25, notam-se dois eventos de perda de massa entre 200 e 400°C. No primeiro evento térmico ocorre uma perda de massa em torno de 65% da quantidade inicial de massa analisada. Já no segundo evento, a perda foi de 34%, aproximadamente. A quantidade de resíduo foi um pouco menor do que 1%. As temperaturas onde a degradação é máxima nesses dois eventos térmicos, observadas a partir da curva DrTG, foram de 267 e 318°C, respectivamente.

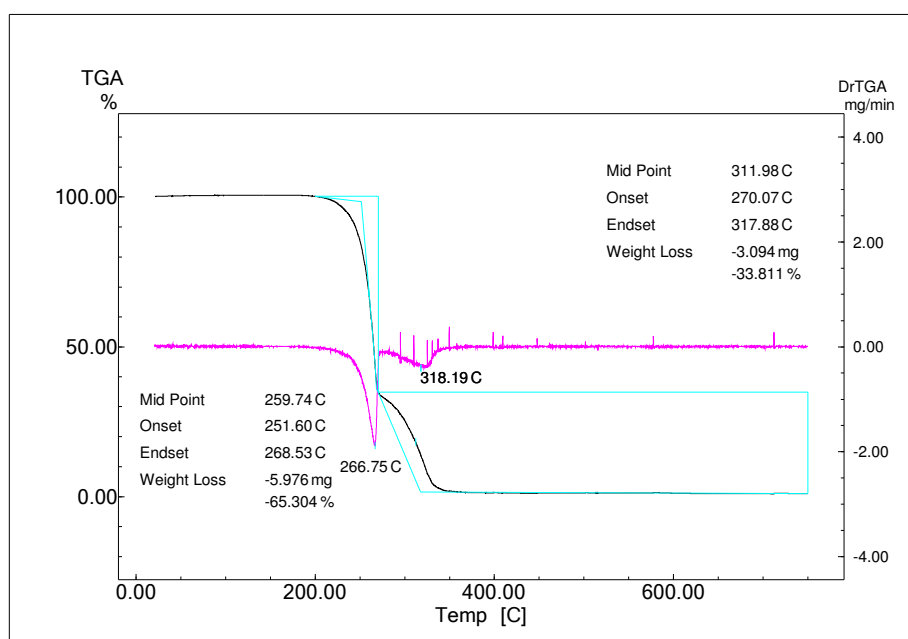


Figura 25: Curvas TG e DrTG para a fenilalanina.

A curva DSC para a molécula molde (Phe) é apresentada na Figura 26. Pode-se notar nessa curva que existem 3 picos endotérmicos muito próximos entre 200 e 300°C. Esses picos podem ser devido à fusão da fenilalanina e de sua degradação, observada na curva TG por meio das duas perdas de massa consecutivas. Esses dois eventos térmicos para Phe, fusão e degradação, parece que ocorrem em temperaturas muito próximas. Para separação e melhor distinção desses dois eventos seria interessante fazer outras análises térmicas (TG e DSC) com razões de aquecimento menores e isotermas entre esses dois eventos.

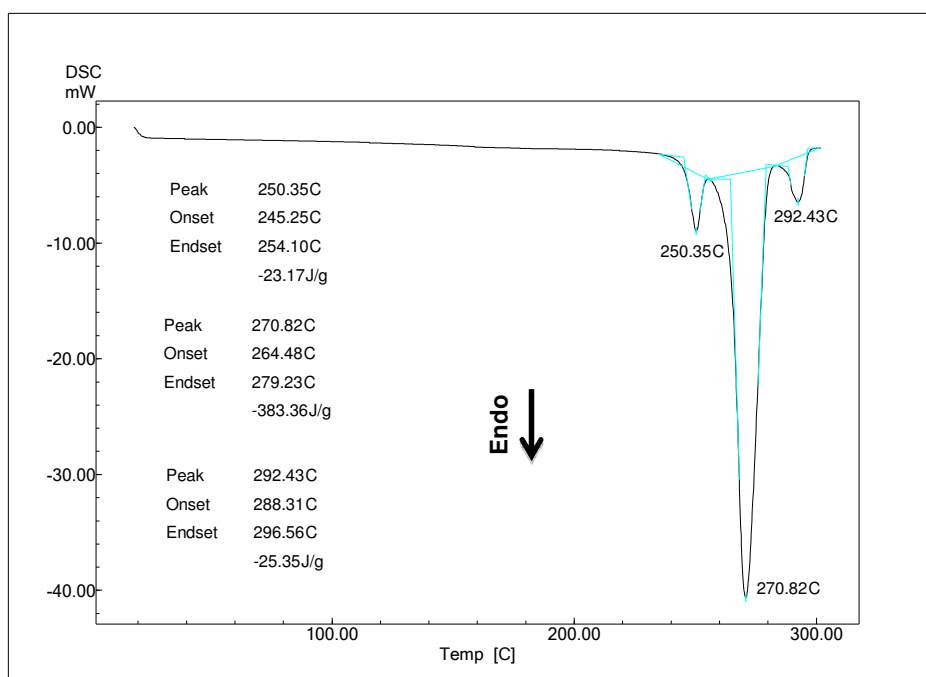


Figura 26: Curva DSC para a fenilalanina.

As curvas TG para os MIPs (antes da extração) e NIPs, bem como para a fenilalanina, são mostradas juntas na Figura 27. As curvas TG e suas derivadas (DrTG) para os MIPs (antes da extração) e NIPs sintetizados são mostradas nas Figuras 28 a 32, respectivamente. Percebe-se que o perfil das curvas TG para todas essas amostras é bem semelhante, apresentando uma perda de massa entre a temperatura ambiente e 160°C e duas perdas de massa sequenciais entre 200 e 500°C. A primeira perda de massa, em torno de $22 \pm 3,4\%$ (exceto para o MIP-8), pode ser devido às moléculas não reagidas do agente reticulante, visto que seu ponto de ebulição encontra-se entre 98 e 100°C, e/ou algum solvente residual. Tal fato justifica uma maior perda, em torno de 40%, para o MIP-8, que teve a quantidade de EGDMA aumentada em 5x em relação aos outros MIPs e NIPs. As outras duas perdas de massa, que totalizaram por volta de

75±2,4% e 60%, aproximadamente, para o MIP-8, devem estar relacionadas com a degradação das cadeias poliméricas dos MIPs e NIPs e, também, da fenilalanina, no caso dos MIPs.

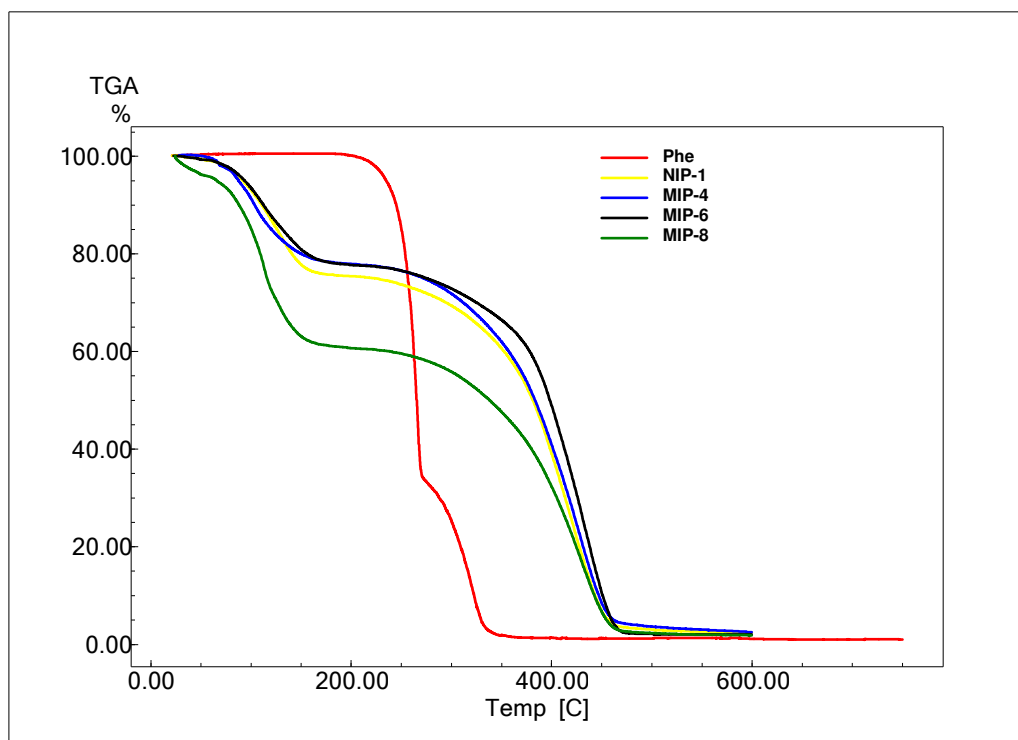


Figura 27: Curvas TG para a Phe, o NIP-1 e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8 antes da extração da Phe.

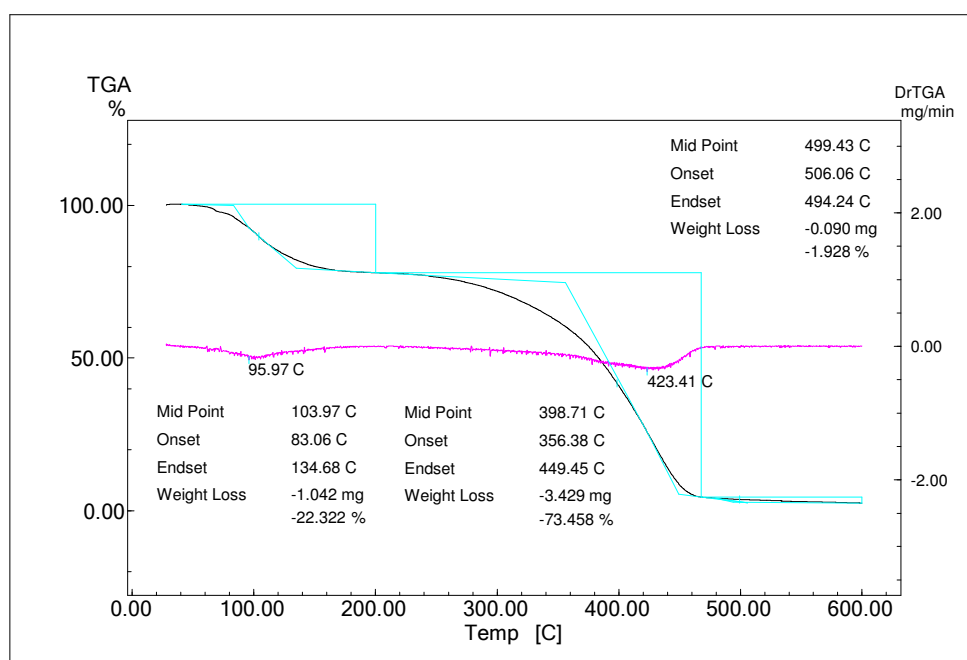


Figura 28: Curvas TG e DrTG para o MIP-4.

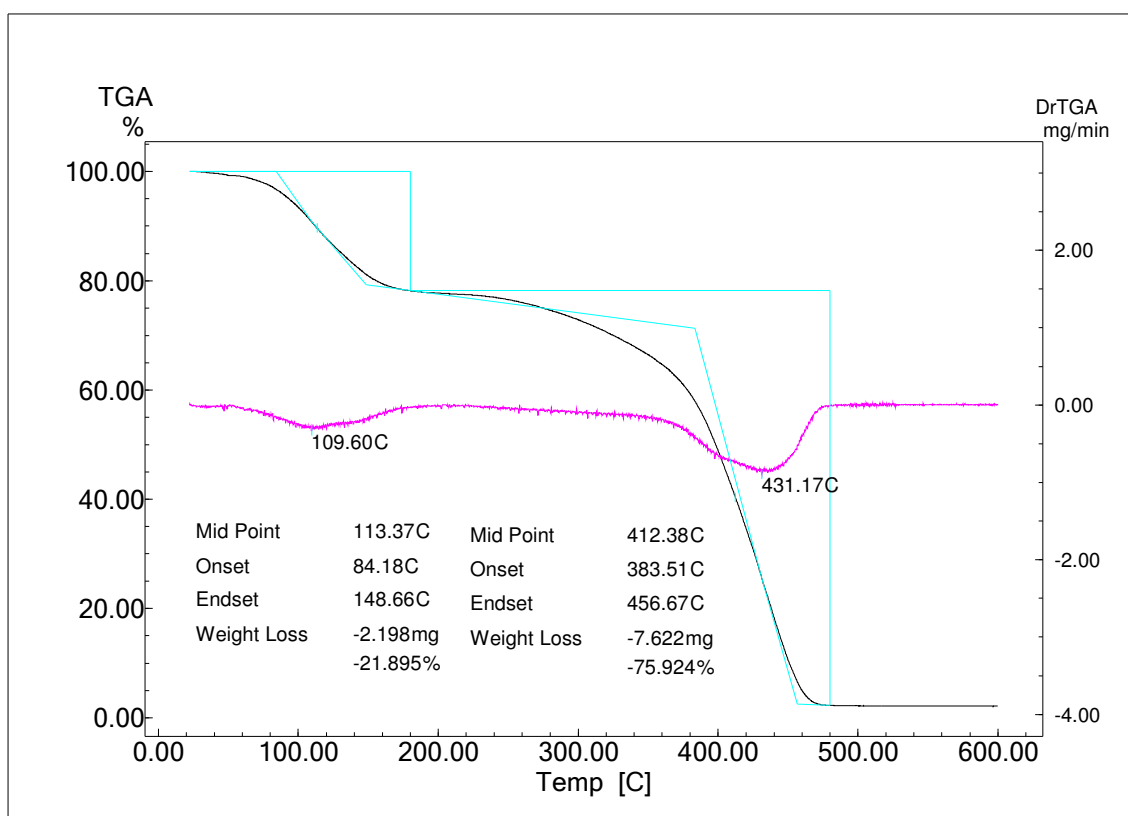


Figura 29: Curvas TG e DrTG para o MIP-6.

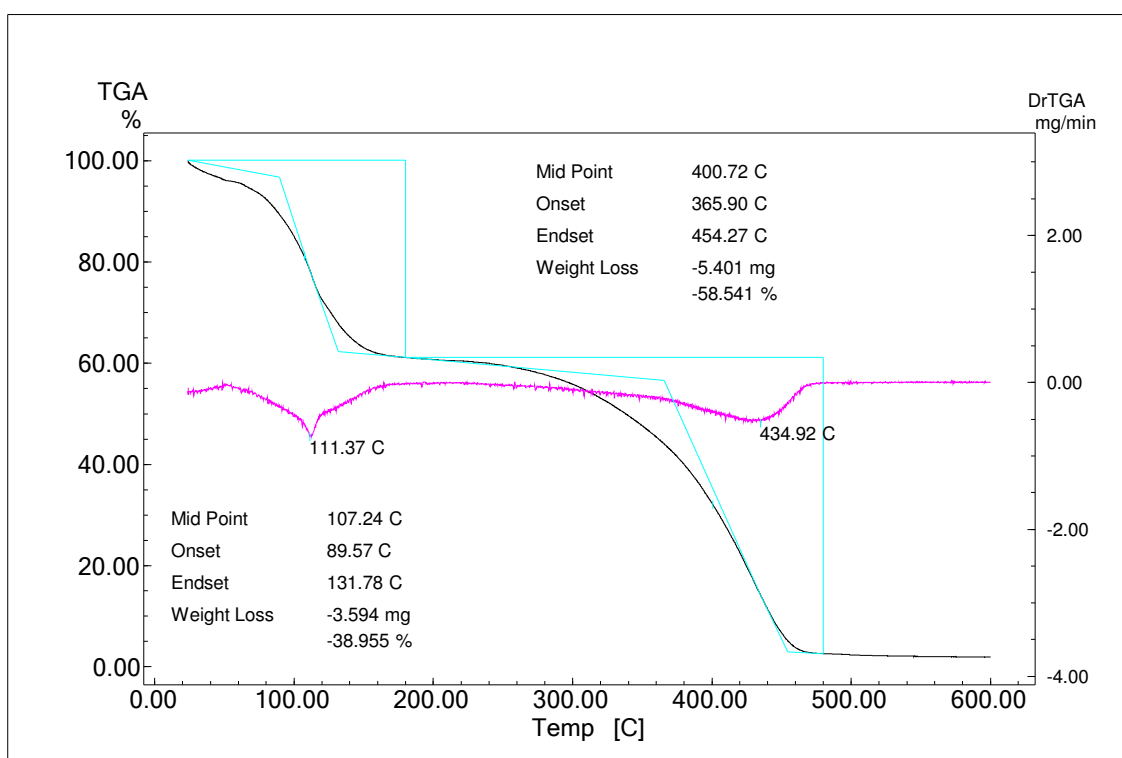


Figura 30: Curvas TG e DrTG para o MIP-8.

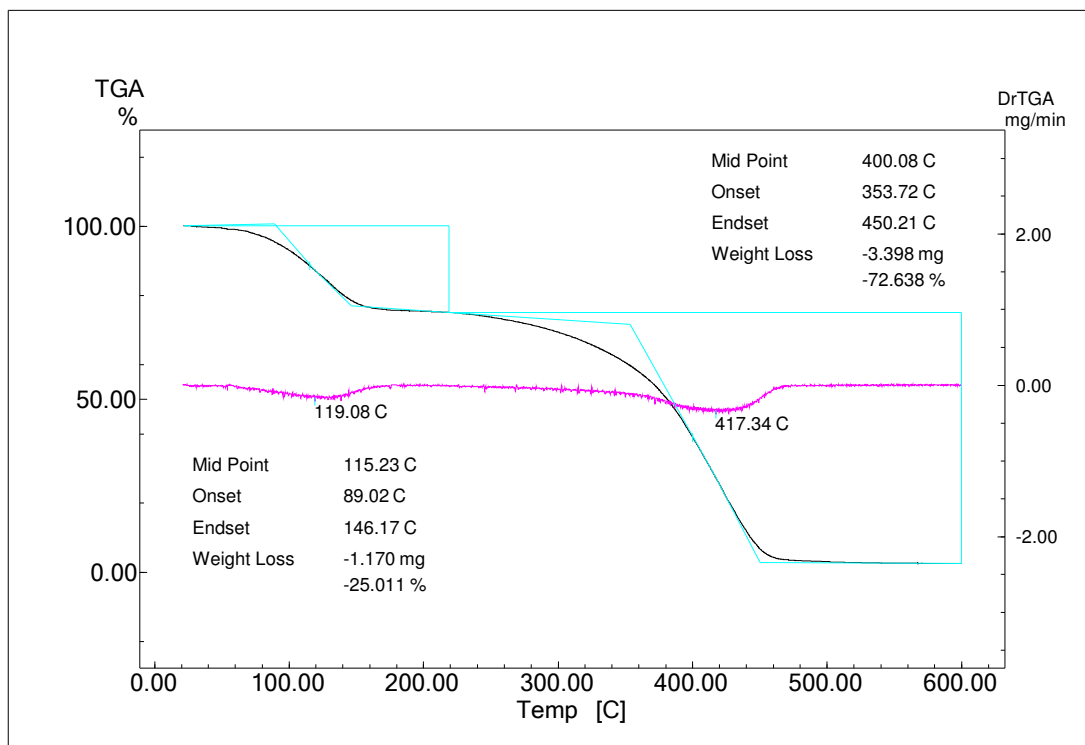


Figura 31: Curvas TG e DrTG para o NIP-1.

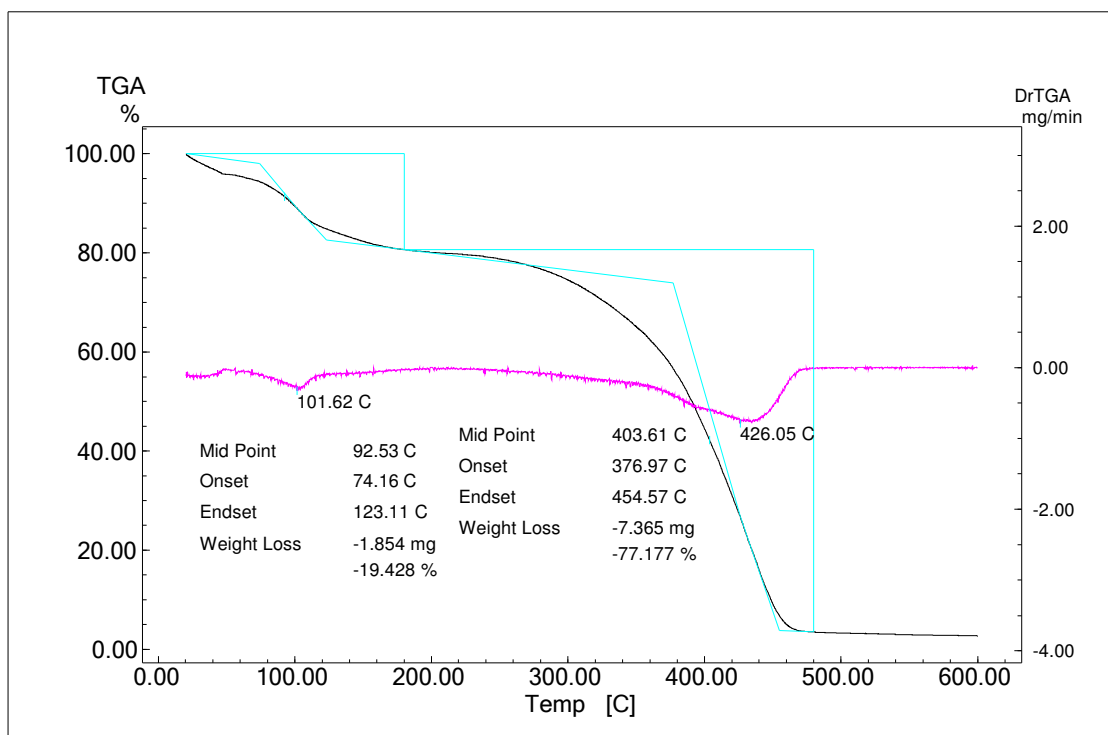


Figura 32: Curvas TG e DrTG para o NIP-2.

As curvas DSC para a Phe, o NIP-1 e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, antes da extração da Phe, são apresentadas juntas na Figura 33. As curvas DSC dos MIPs antes da extração da molécula molde e dos NIPs sintetizados são mostradas nas Figuras 34 a 38, respectivamente.

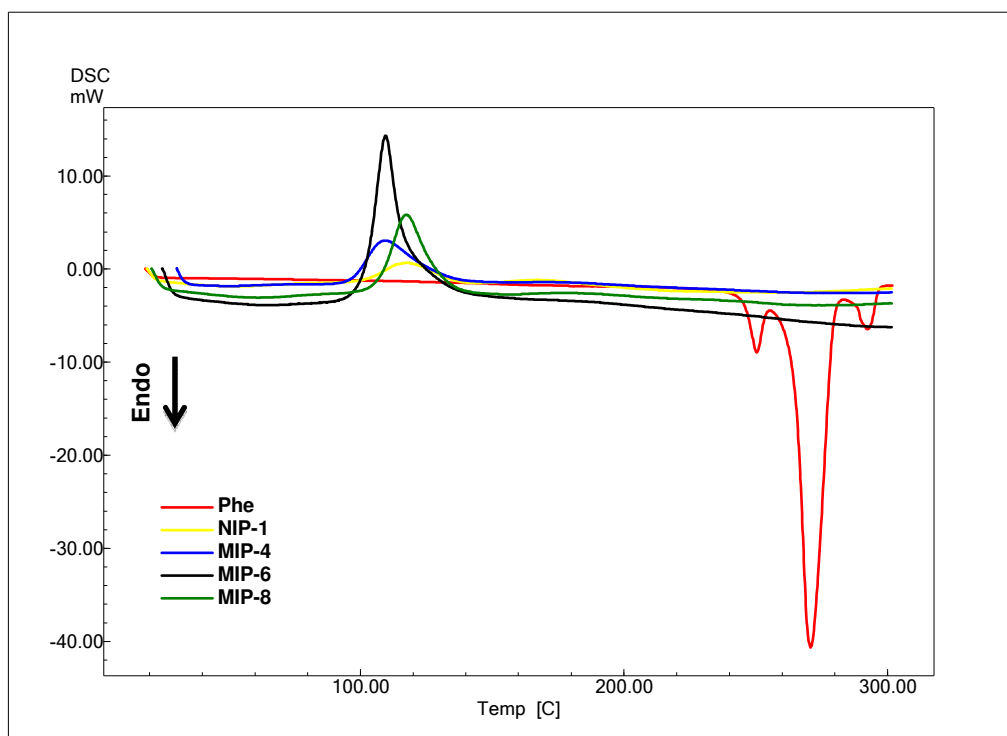


Figura 33: Curvas DSC para a Phe, o NIP-1 e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, antes da extração da Phe.

As curvas DSC dos MIPs antes da extração da molécula molde e do NIP sintetizados, mostradas na Figura 33, apresentaram basicamente o mesmo perfil. Percebe-se claramente um pico exotérmico entre 80 e 160°C. Acredita-se que esse pico pode estar relacionado ao fluxo líquido de calor devido à polimerização de moléculas de ácido metacrílico, ainda presentes na estrutura dos MIPs e NIP, e à vaporização do EGDMA e/ou algum solvente residual, ambos fenômenos ocorrendo com o aumento da temperatura e dentro do mesmo intervalo. A reação de polimerização do ácido metacrílico é extremamente exotérmica, prevalecendo sobre o evento endotérmico envolvendo a perda de massa, conforme foi observado nas curvas TG desses polímeros. As curvas DSC para os MIPs não apresentaram picos relacionados à fusão e degradação da Phe presente nesses polímeros. Talvez isso tenha ocorrido devido às interações dessa substância com as cadeias poliméricas dos MIPs, deixando de

apresentar uma fusão cristalina e sua degradação ocorrendo em temperatura superiores, junto com as cadeias dos polímeros.

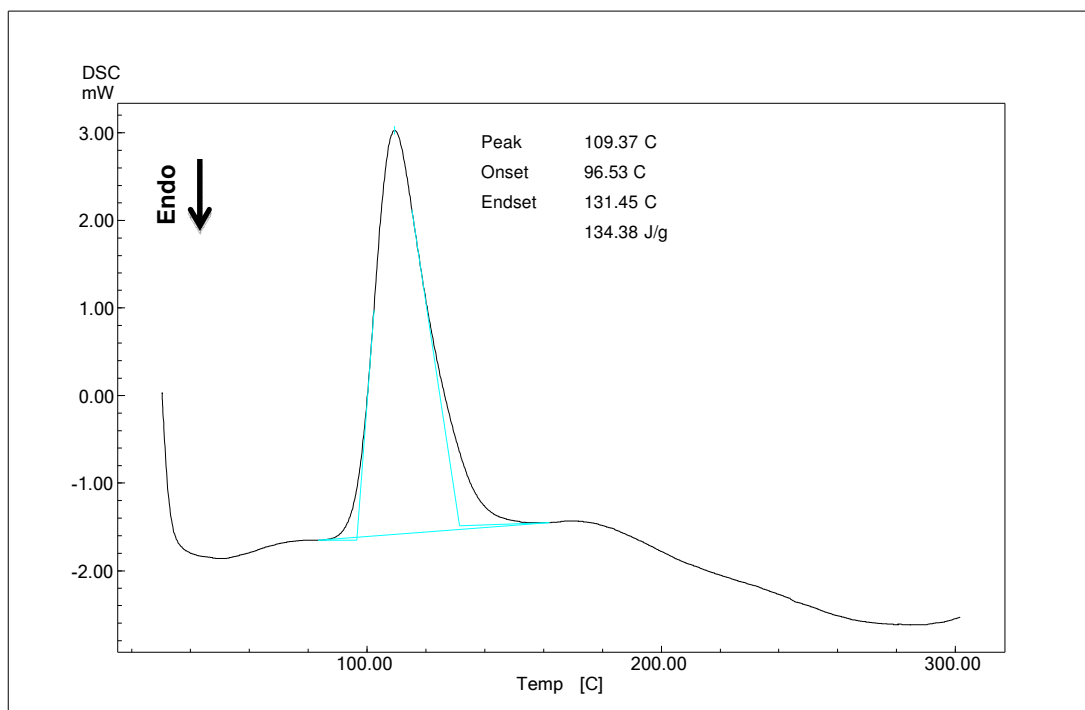


Figura 34: Curva DSC para o MIP-4, antes da extração.

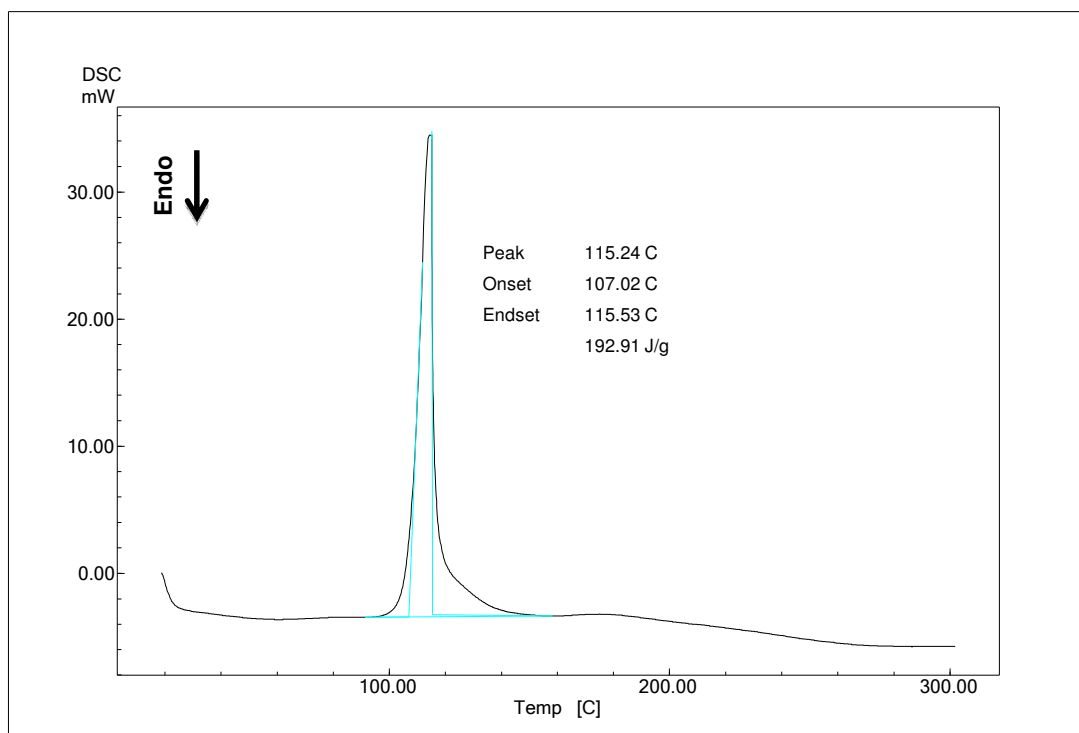


Figura 35: Curva DSC para o MIP-6, antes da extração.

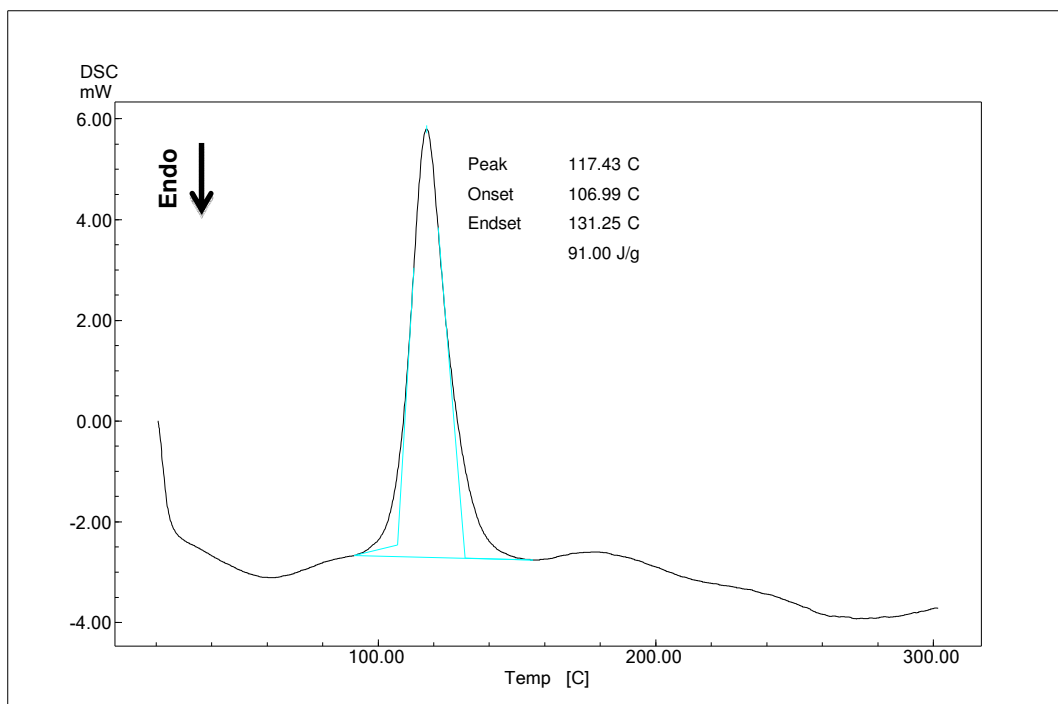


Figura 36: Curva DSC para o MIP-8, antes da extração.

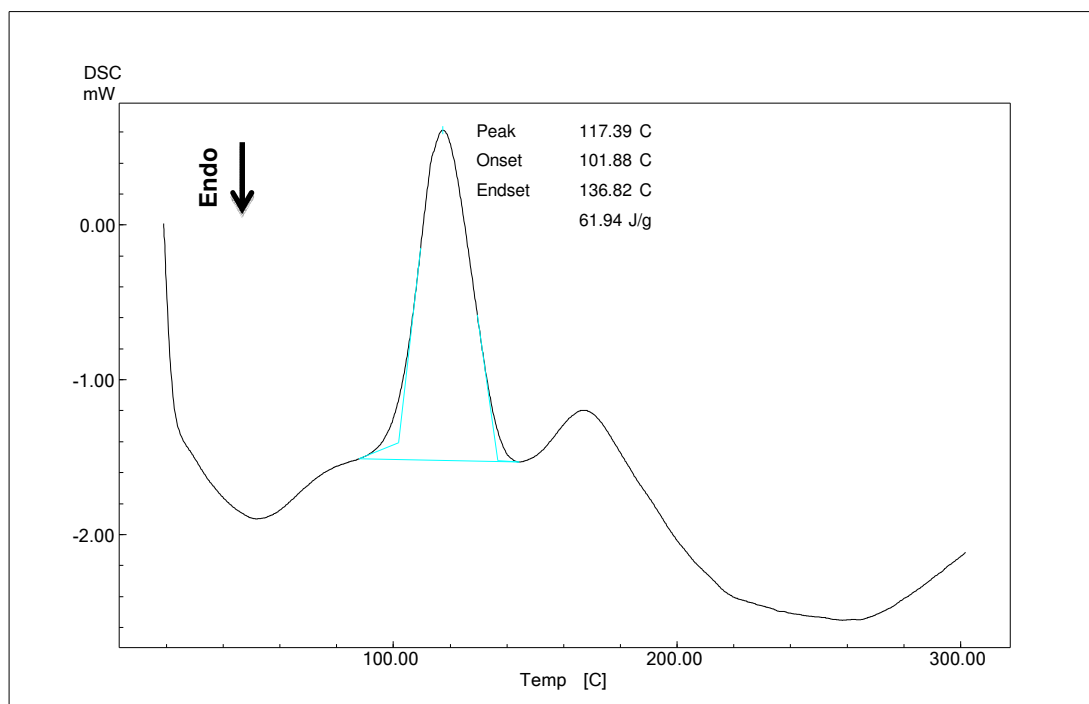


Figura 37: Curva DSC para o NIP-1.

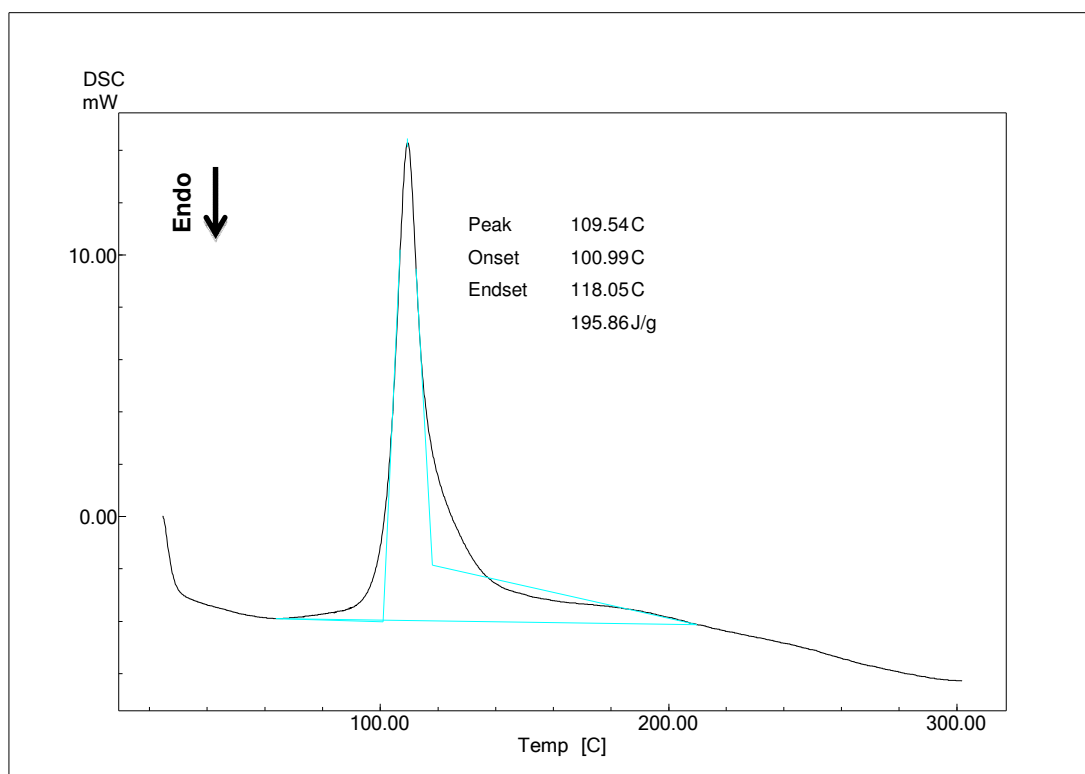


Figura 38: Curva DSC para o NIP-2.

A partir das curvas DSC mostradas nas Figuras 34 a 38, não foi possível observar a temperatura de transição vítrea desses polímeros. Outras análises por DSC precisariam ser realizadas para averiguar se esses polímeros apresentam ou não essa transição.

4.3. ENSAIO DE EXTRAÇÃO DA FENILALANINA

Os espectros FTIR referentes à fenilalanina e aos MIP-4, MIP-6 e MIP-8, após a extração da Phe, são apresentados na Figura 39. Os espectros FTIR individuais para os MIPs (4, 6 e 8), após a extração da Phe, podem ser vistos no Anexo II (Págs. 89 e 90).

As bandas características dos monômeros utilizados na síntese e que podem ser visualizadas nos espectros FTIR dos polímeros após a extração, mostrados na Figura 39, são as de EGDMA e MAA na região de 1700cm^{-1} , correspondentes ao estiramento de C=O do grupo éster e carboxila do ácido, em 1150cm^{-1} , correspondente à deformação axial de C-O de éster e na região de 1300 a 1200cm^{-1} , característica de deformação axial de C-O de ácido carboxílico. Na região de 2900cm^{-1} foram evidenciadas bandas com características de estiramento de O-H de ácido carboxílico e C-H.

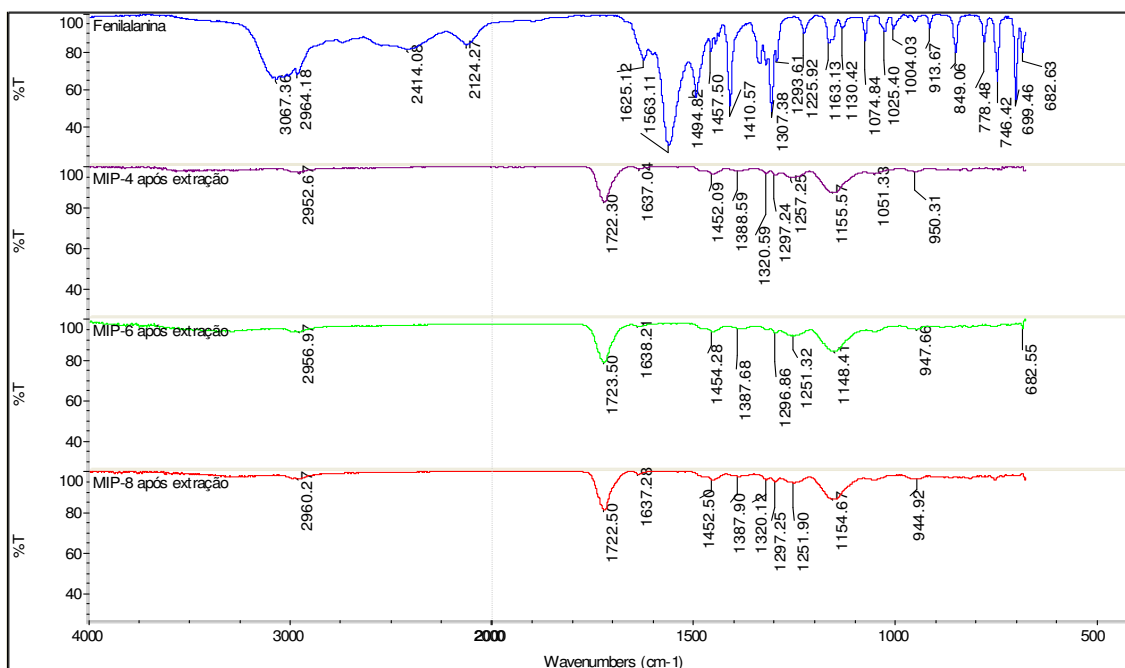


Figura 39: Espectros FTIR para a Phe e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, após extração da fenilalanina.

Além disso, foi possível observar nos espectros dos MIPs, após a extração (Fig. 39), a ausência das bandas características da Phe como, por exemplo, as bandas em 2414 e 2124cm^{-1} , que são bandas características de aminoácidos, além da banda em 3067cm^{-1} , correspondente ao estiramento das ligações de C-H de anel aromático, o que é um forte indício da extração da fenilalanina.

Os espectros FTIR para os MIPs (4, 6 e 8) após extração e para os NIPs (1 e 2) são mostrados na Figura 40 para comparação e análise.

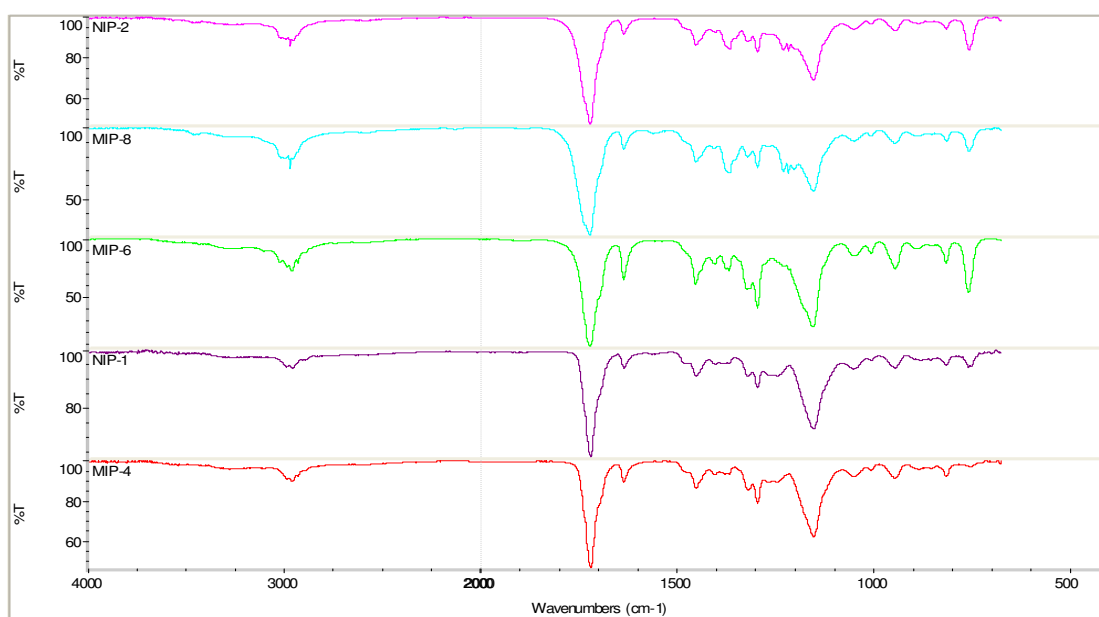


Figura 40: Espectros FTIR para os MIPs 4, 6, 8 (após extração) e NIPs 1 e 2.

Com base nos resultados apresentados, pode-se observar na Figura 40 que não são caracterizadas diferenças significativas nos espectros FTIR, indicando que a composição química dos MIPs e NIPs é semelhante. Esse fato era esperado uma vez que ambos os materiais foram sintetizados da mesma forma, exceto pela adição da molécula molde aos polímeros não impressos (NIPs). Uma vez extraída a MM, eles deveriam apresentar a mesma composição.

Além disso, esse resultado é um indício de que as lavagens dos MIPs durante o processo de extração no Soxhlet foram eficientes para a remoção da fenilalanina do polímero final, pois pelos resultados dos espectros de FTIR apresentados na Figura 40 parece que a Phe não está presente na estrutura polimérica.

As micrografias dos MIPs 4, 6 e 8, após a extração da molécula molde, são mostradas nas Figuras 41 a 43, respectivamente.

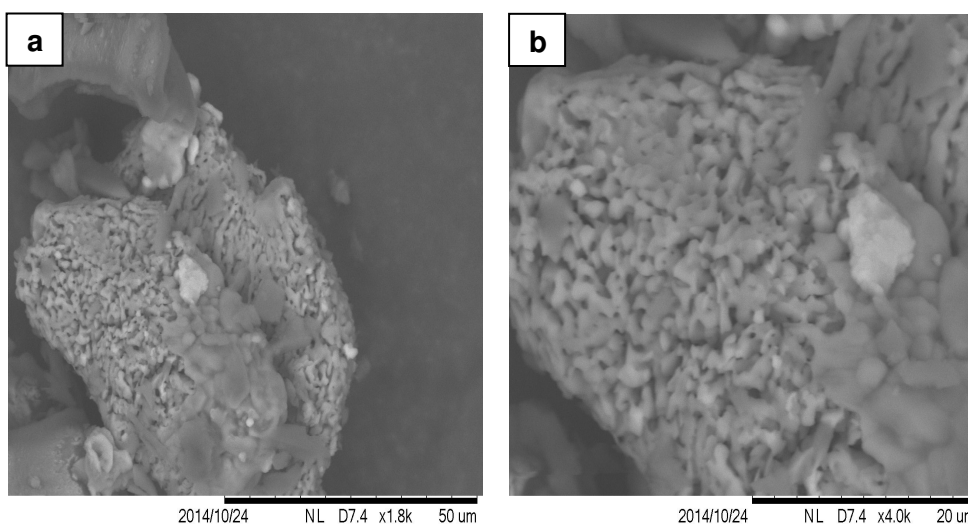


Figura 41: Micrografia para o MIP-4, após extração. Aumento de 1800x (a) e 4000x (b).

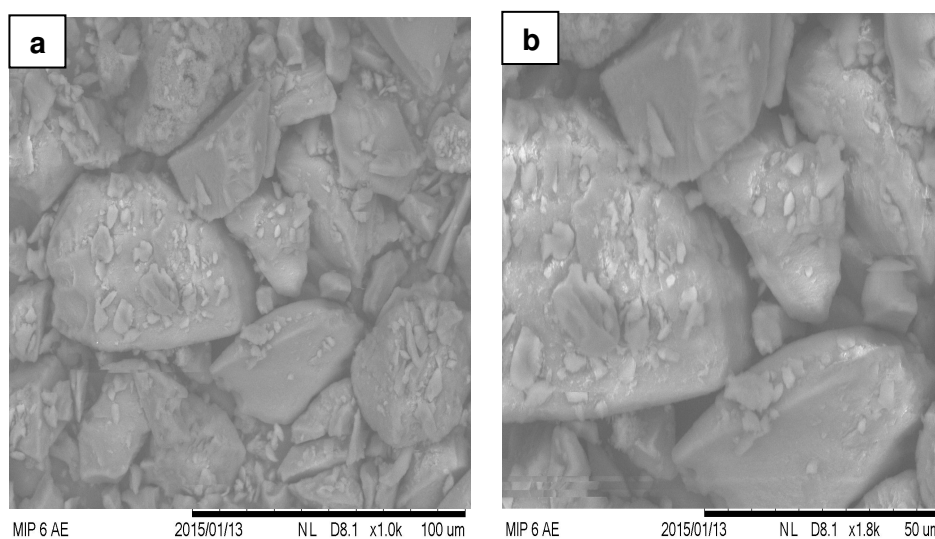


Figura 42: Micrografia para o MIP-6, após extração. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).

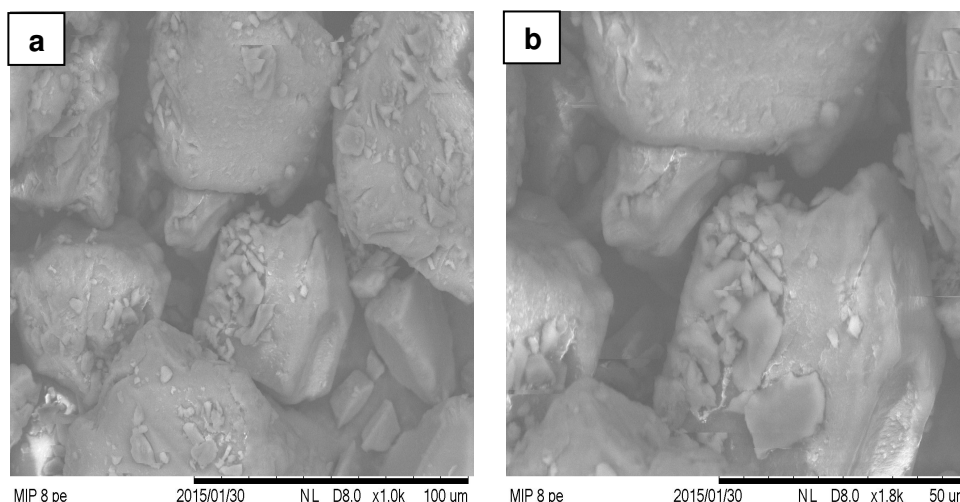


Figura 43: Micrografia para o MIP-8, após extração. Aumento de 1000x (a) e 1800x (b).

Comparando as micrografias para os MIP-6 e MIP-8, antes (Figs. 23 e 24) e depois (Figs. 42 e 43) do processo de extração da Phe, não foi percebido nenhuma mudança significativa na morfologia da superfície desses polímeros. No entanto, nota-se que o processo de extração de Phe afetou a morfologia do MIP-4, deixando-o com o aspecto mais poroso (Fig. 41), após extraída a fenilalanina dele.

De acordo com Farrington e Regan (2007), os polímeros molecularmente impressos que possuem maiores áreas superficiais e volume de poros tendem a adsorver uma maior quantidade da molécula molde. Como será apresentado no item 4.4, referente aos ensaio de adsorção da fenilalanina, o MIP-4 foi o polímero que teve o maior grau de adsorção da fenilalanina.

As curvas TG para os MIPs 4, 6 e 8, após a extração, bem como para a fenilalanina, são apresentadas juntas na Figura 44. As Figuras 45 a 47 apresentam as curvas TG e DrTG para os MIPs 4, 6 e 8, após a extração. Nota-se nessas curvas, o mesmo perfil de perda de massa, sendo possível observar três eventos de perda de massa. No primeiro evento, da temperatura ambiente até 200°C, ocorre uma perda de massa entre 1 e 3% da quantidade inicial de massa analisada, que pode ser devido a algum solvente residual. Entre 200 e 500°C, observa-se duas perdas de massa consecutivas em torno de 95%, podendo ser proveniente da decomposição de metacrilatos (degradação das cadeias poliméricas dos MIPs). Comparando as curvas TG dos MIPs, após extração da Phe, com a curva TG da Phe, percebe-se que esses polímeros não contêm essa substância, indicando que o processo de extração dela foi eficiente.

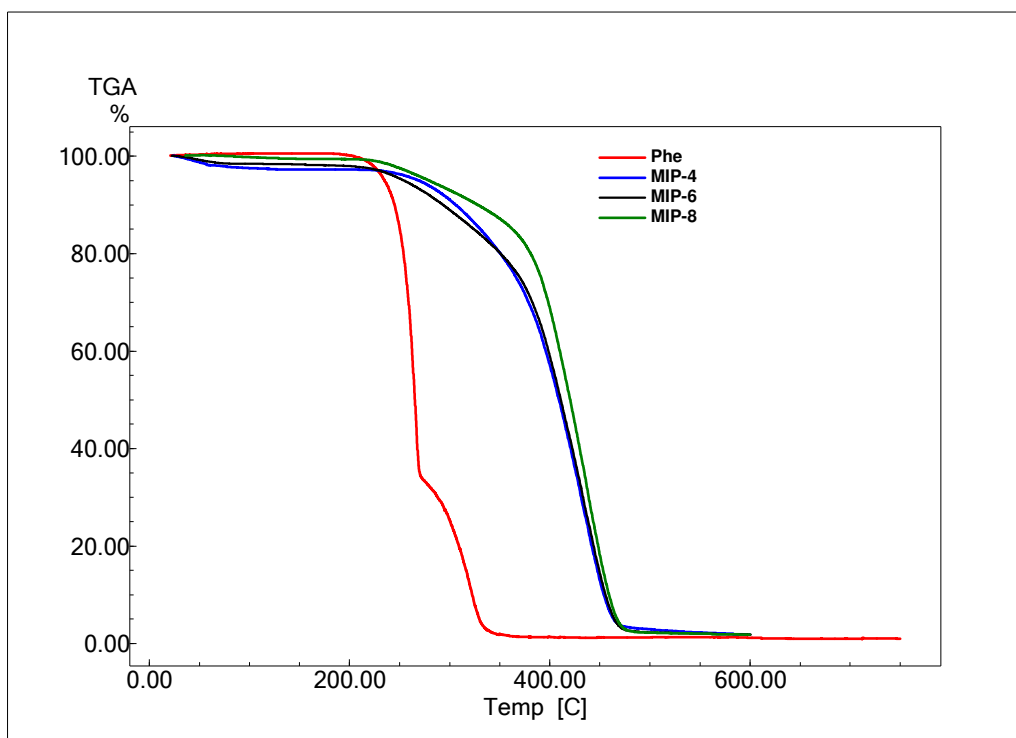


Figura 44: Curvas TG para a Phe e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, após a extração da Phe.

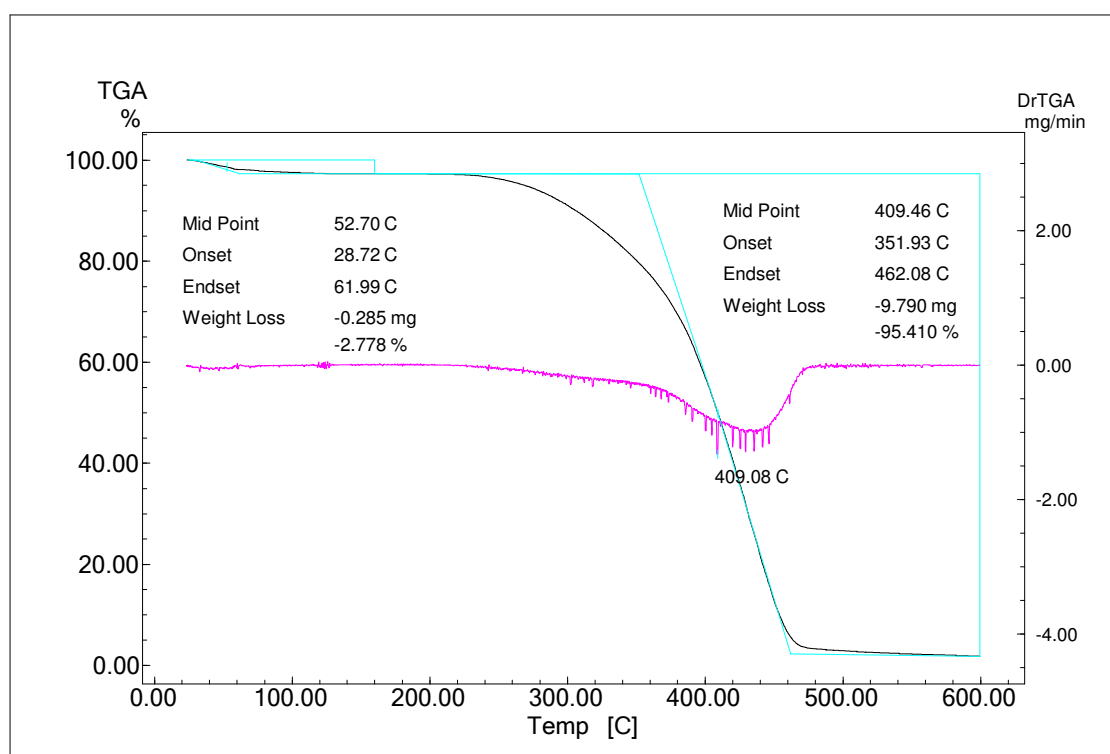


Figura 45: Curvas TG e DrTG para o MIP-4, após extração da fenilalanina.

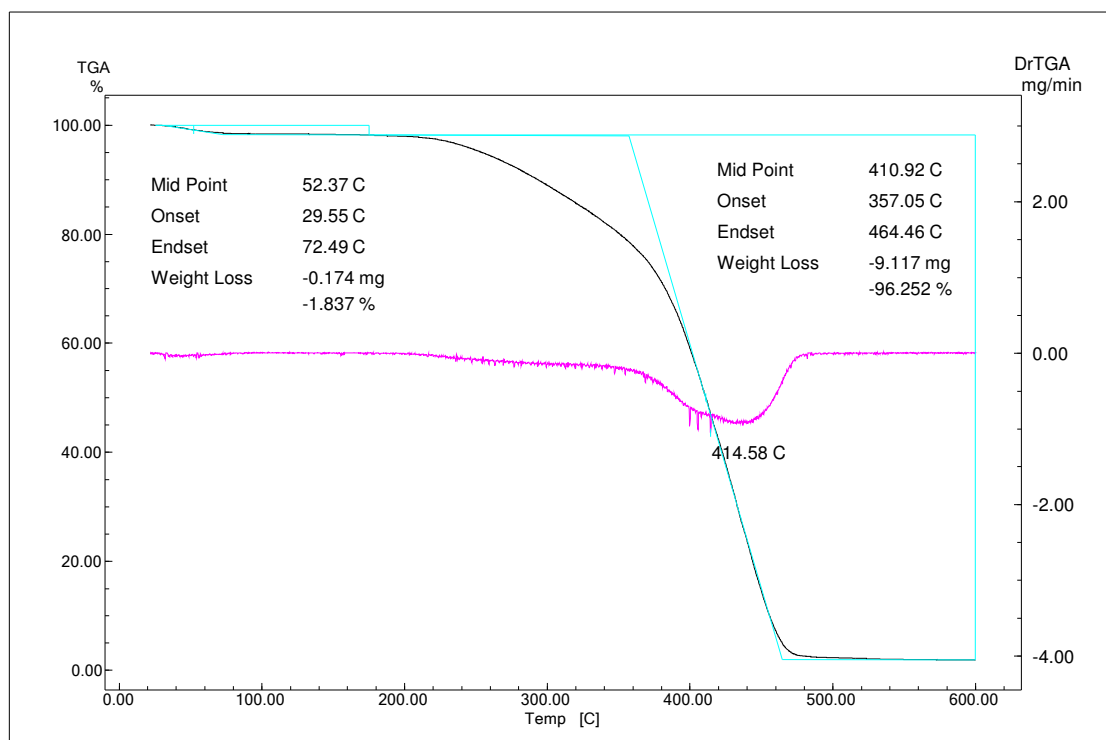


Figura 46: Curvas TG e DrTG para o MIP-6, após extração da fenilalanina.

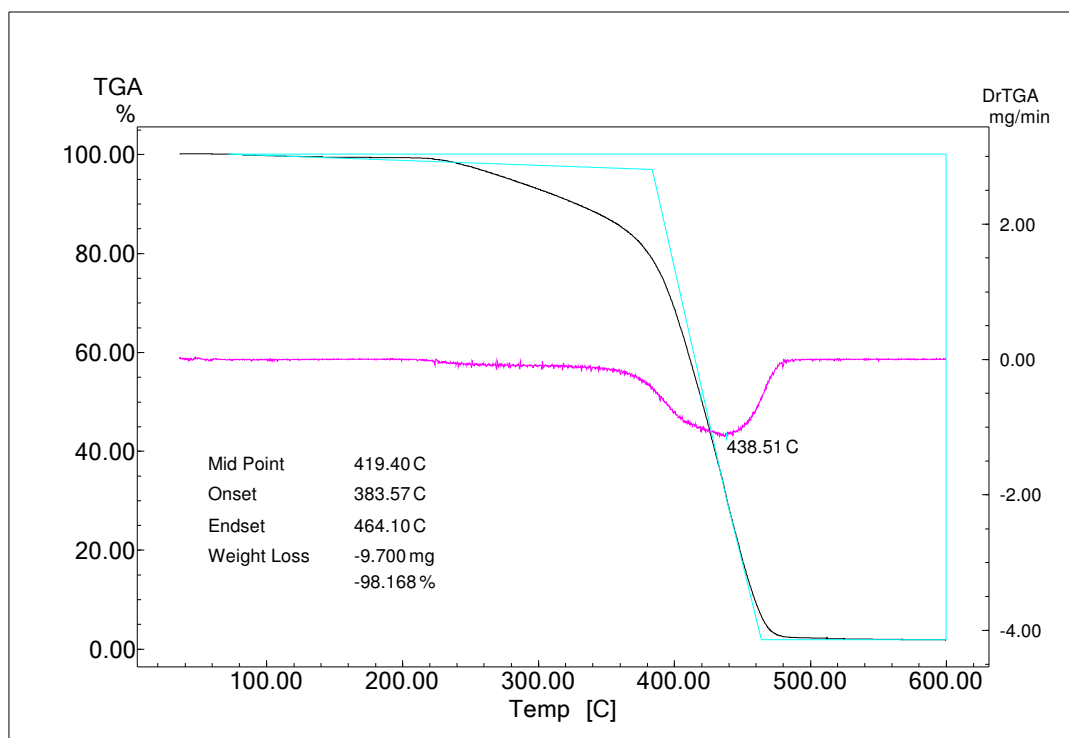


Figura 47: Curvas TG e DrTG para o MIP-8, após extração da fenilalanina.

As curvas DSC para a Phe e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8 após a extração da Phe, são apresentadas juntas na Figura 48. As curvas DSC para os MIPs 4, 6 e 8, após a extração da molécula molde, são mostradas nas Figuras 49 a 51, respectivamente. Percebe-se um evento endotérmico entre a temperatura ambiente e 120°C nas curvas DSC para os MIPs, possivelmente devido à presença de solvente residual nesses polímeros proveniente do processo de extração da fenilalanina. A partir de 180°C pode-se ver o início de outro pico endotérmico, pouco intenso e largo, talvez relacionado ao início da fusão e degradação dos polímeros. Comparando a curva DSC para a Phe com as curvas DSC para os MIPs, poderia utilizar-se da suposição feita anteriormente, para a situação dos MIPs antes da extração da Phe. No entanto, em função dos resultados apresentados por FTIR e TG, acredita-se que ela não esteja presente nesses polímeros após o processo de extração.

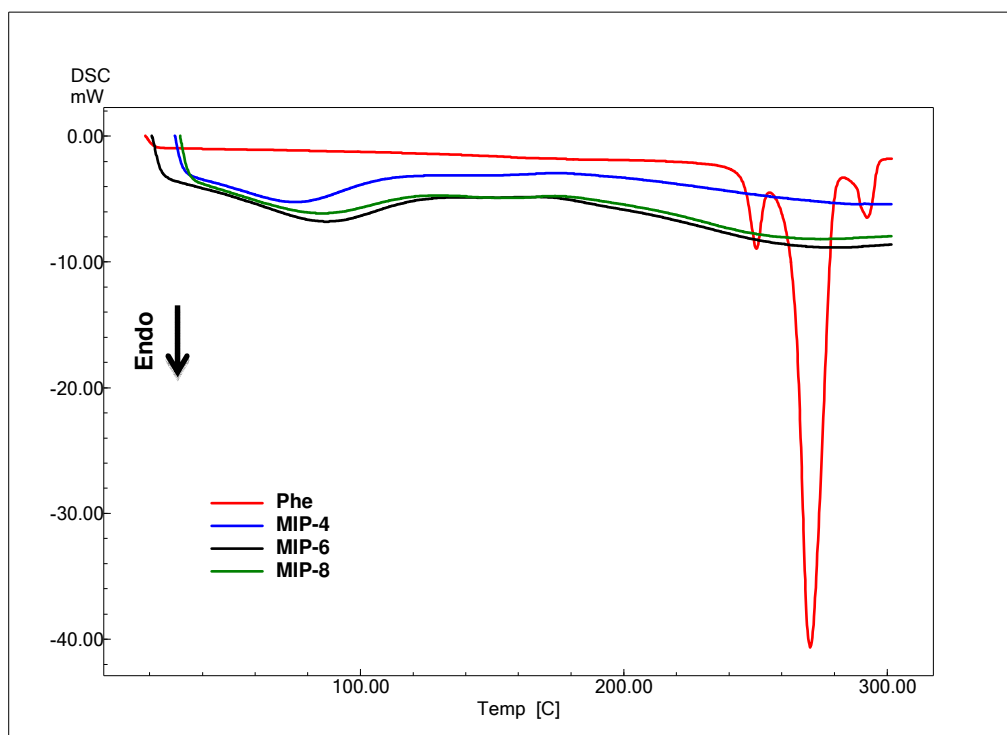


Figura 48: Curvas DSC para a Phe e os MIP-4, MIP-6 e MIP-8, após a extração da Phe.

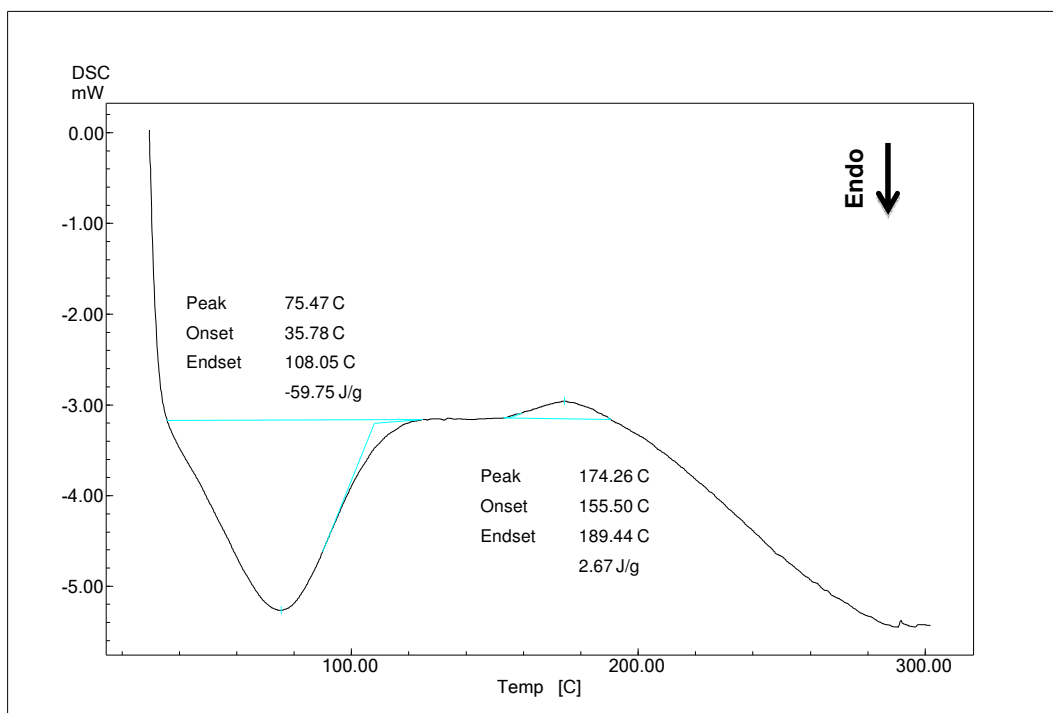


Figura 49: Curva DSC para o MIP-4, após extração.

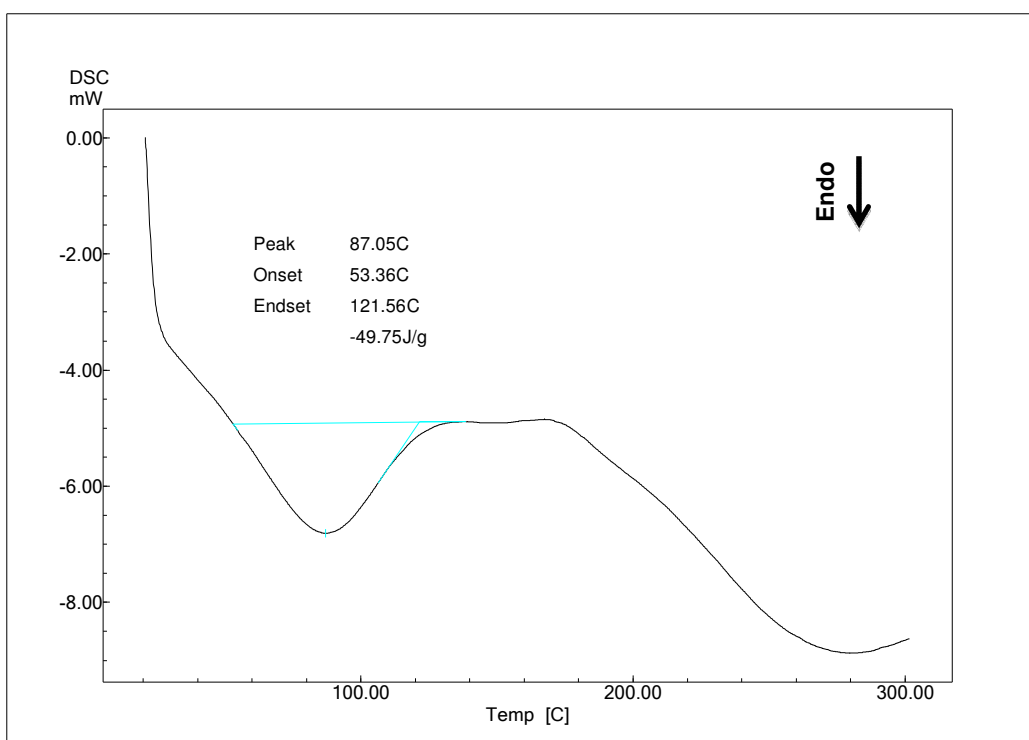


Figura 50: Curva DSC para o MIP-6, após extração.

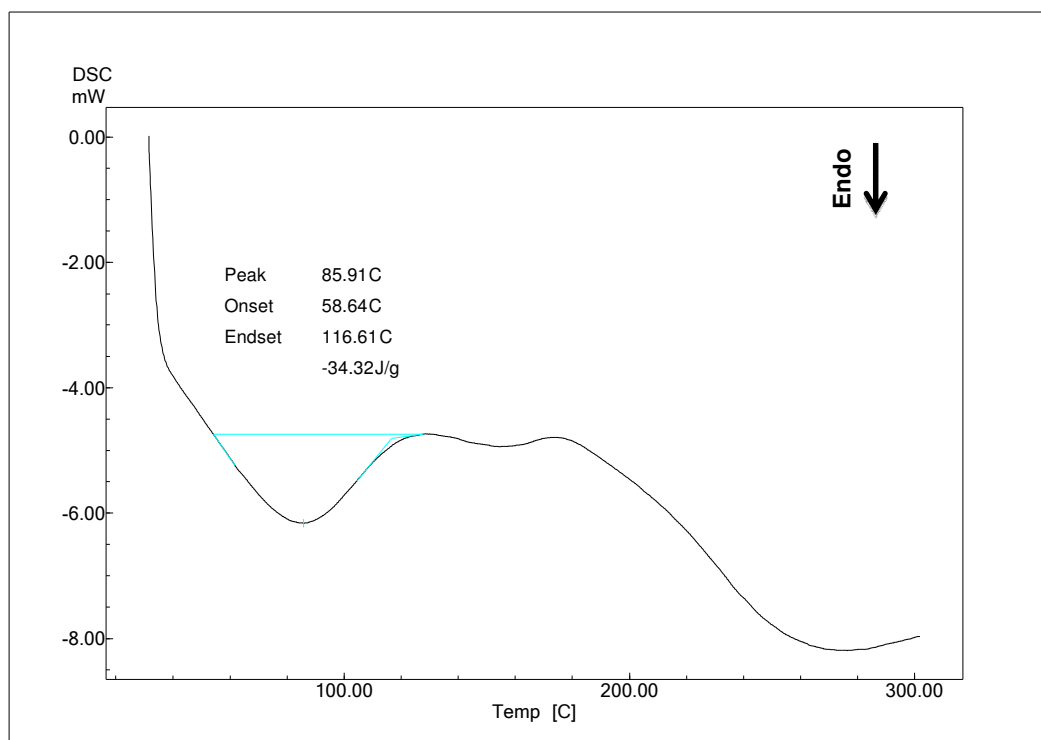


Figura 51: Curva DSC para o MIP-8, após extração.

4.4. ENSAIO DE ADSORÇÃO DA FENILALANINA

O ensaio de adsorção foi realizado de forma a avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros sintetizados. Assim, a adsorção da fenilalanina nos polímeros MIPs (após a extração de Phe) e NIPs foi verificada variando a quantidade de polímero e mantendo a concentração inicial da solução entre 448,9 a 449,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os cálculos para o ensaio de adsorção foram feitos determinando a concentração livre de Phe no sobrenadante, de acordo com a curva de calibração da Phe em água (Figura I.2 - ANEXO I, Pág. 86).

A concentração de Phe adsorvida (C) pelos polímeros MIPs e NIPs (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi estimada pela Equação 1:

$$C = (I - F) \quad (\text{Eq. 1})$$

em que:

- I é a concentração inicial da solução (teoricamente, 450 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

- F é a concentração de analito livre ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O grau de adsorção da Phe (G_{ad} , em %) foi calculado pela Equação 2:

$$G_{\text{ad}} = (C / I) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Os resultados do estudo de adsorção contendo o grau de adsorção da fenilalanina nos polímeros MIPs e NIPs são apresentados nas Tabelas 6 a 10.

Tabela 6: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero MIP-4.

Massa (mg)	I ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	F ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	G_{ad} (%)	Média e desvio padrão G_{ad} (%)
25	448,9	411,4	37,5	8,35	
25	448,9	423,3	25,6	5,70	7,03 \pm 1,9
50	448,9	267,2	181,7	40,48	
50	448,9	284,3	164,6	36,67	38,58 \pm 2,7
100	448,9	207,5	241,4	53,78	
100	448,9	194,9	254	56,58	55,18 \pm 2,0

Tabela 7: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero MIP-6.

Massa (mg)	I ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	F ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	G_{ad} (%)	Média e desvio padrão G_{ad} (%)
25	449,8	446,9	2,9	0,64	
25	449,8	448,9	0,9	0,20	0,42 \pm 0,3
50	449,8	446,8	3	0,67	
50	449,8	447,4	2,4	0,53	0,60 \pm 0,1
100	449,8	444,1	5,7	1,27	
100	449,8	448,4	1,4	0,31	0,79 \pm 0,7

Tabela 8: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero MIP-8.

Massa (mg)	I ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	F ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	G_{ad} (%)	Média e desvio padrão G_{ad} (%)
25	449,8	401,3	48,5	10,78	
25	449,8	399,1	50,7	11,27	11,03 \pm 0,3
50	449,8	348,1	101,7	22,61	
50	449,8	339,8	110,0	24,46	23,54 \pm 1,3
100	449,8	309,6	140,2	31,17	
100	449,8	312,9	136,9	30,4	30,81 \pm 0,5

Tabela 9: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero NIP-1.

Massa (mg)	I ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	F ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	G_{ad} (%)	Média e desvio padrão G_{ad} (%)
25	448,9	418,9	30	6,68	
25	448,9	414,9	34	7,57	7,13 \pm 0,6
50	448,9	404,9	44	9,80	
50	448,9	396,8	52,1	11,61	10,71 \pm 1,3
100	448,9	404,1	44,8	9,98	
100	448,9	388,9	60	13,37	11,68 \pm 2,4

Tabela 10: Ensaio de adsorção variando a quantidade (massa) do polímero NIP-2.

Massa (mg)	I ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	F ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	G_{ad} (%)	Média e desvio padrão G_{ad} (%)
25	449,8	416,3	33,5	7,45	
25	449,8	419,5	30,3	6,74	7,1 \pm 0,5
50	449,8	403,6	46,2	10,27	
50	449,8	401,3	48,5	10,78	10,53 \pm 0,4
100	449,8	401,8	48,0	10,67	
100	449,8	400,4	49,4	10,98	10,83 \pm 0,2

Os graus de adsorção da fenilalanina em função da massa dos polímeros MIP-4, MIP-6, MIP-8, NIP-1 e NIP-2 são apresentados na Figura 52.

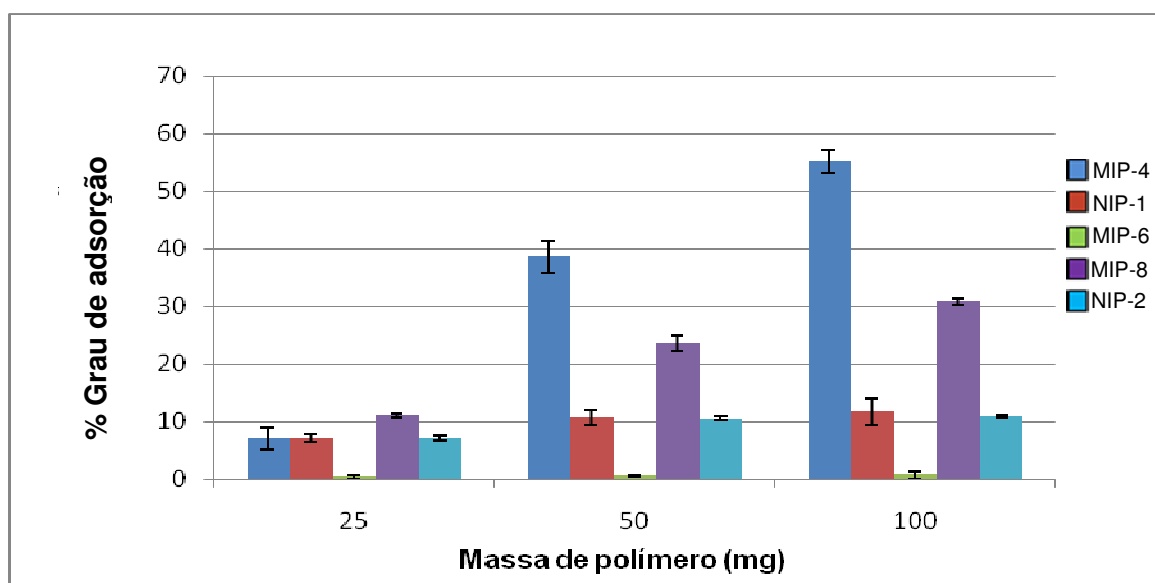


Figura 52: Grau de adsorção da fenilalanina em função das massas de polímero nos MIP-4, MIP-6, MIP-8, NIP-1 e NIP-2.

A partir das Tabelas 6 a 10 ou da Figura 52, percebe-se que, para os MIPs 4 e 8, com o aumento da massa de polímero de 25 para 100mg, a quantidade de fenilalanina adsorvida também aumenta, passando de $7,0 \pm 1,9$ para $55,2 \pm 2,0$ e de $11,0 \pm 0,3$ para $30,8 \pm 0,5$, respectivamente. Esses resultados indicam que, mantendo-se fixa a relação entre a quantidade de MM e MF, o aumento de massa de polímero nesses MIPs tende a aumentar a quantidade de Phe adsorvida de forma bem significativa, dentro da variação de massa estudada. Comparando-se os MIPs 4 e 8, nota-se que as quantidades de MM, MF, AR, IR e solvente (Tabela 2) foram aumentadas em 5 vezes ao passar do MIP-4 para o MIP-8, sendo mantido constante o tempo de reação em 6 horas. Ambos apresentaram a mesma tendência quanto à adsorção de fenilalanina, porém o MIP-4 adsorveu uma quantidade maior de Phe com o aumento de massa do polímero, exceto para 25mg ($7,0 \pm 1,9$ para o MIP-4 e $11,0 \pm 0,3$ para o MIP-8). Apesar da relação estequiométrica ter sido mantida constante para todas essas variáveis de síntese, em termos de estrutura obtida durante a polimerização, parece que foram obtidos mais sítios específicos no MIP-4, para permitir a interação com a Phe. Esse maior número de sítios pode ser devido à reação de formação desses polímeros ser um processo aleatório, permitindo essa diferença. Ou então, pode ser que o tempo de reação para o MIP-8 tenha sido menor do que o necessário para a formação de número de sítios similar ou próximo dos obtidos para o MIP-4. Para melhor entendimento dessa questão é necessário a obtenção de outros MIPs variando-se as condições de síntese, bem como outros ensaios de adsorção de Phe.

Os NIPs 1 e 2 foram sintetizados nas mesmas condições para todas as variáveis de síntese (Tabela 3). Os resultados apresentados por ambos, em termos de grau de adsorção de Phe e em função de massa de polímero empregada, são praticamente iguais, com variação muito pequena (insignificante). Para esses dois NIPs, o grau de adsorção de fenilalanina passou de $7,1 \pm 0,5$, com 25mg de massa de polímero, para $10,71 \pm 1,3$, com o dobro de massa de polímero. Duplicando a massa de polímero usada nos ensaios de adsorção mais uma vez, percebe-se que a grau de adsorção de Phe não sofreu variação significativa, ficando em torno de $11,68 \pm 2,4$. Esses resultados indicam que a síntese desses dois polímeros não impressos foi reprodutível.

Ao comparar os resultados de grau de adsorção de Phe obtidos com os MIPs 4 e 8 com os NIPs 1 e 2 (apresentados nas Tabelas 6, 8, 9 e 10 e na Figura 52), percebe-se claramente a influência que a fenilalanina tem na formação de sítios específicos de sua interação com o MF durante o processo de polimerização dos MIPs. A única diferença

entre os MIPs 4 e 8 com os NIPs 1 e 2 é que esses foram sintetizados sem a Phe. As quantidades usadas nas variáveis de síntese (Tabelas 2 e 3) foram as mesmas, exceto para o MIP-6 que teve um aumento de 1,9x em relação ao MIP-4 e o MIP-8 que teve todos os valores dessas variáveis multiplicados por fator de 5. Os MIPs, após extração da Phe, apresentaram o mesmo grau de adsorção, aproximadamente, com 25mg de massa de polímero. Porém, com o aumento dessa massa para 50 e 100mg o grau de adsorção de Phe aumentou significativamente. Para o MIP-4, comparado ao seu polímero controle, NIP-1, o aumento foi de 28% e 44%, respectivamente. Já o MIP-8 apresentou um acréscimo com as massas de polímeros usadas de 13% e 20%, respectivamente, em relação ao NIP controle. Portanto, fica evidenciado, de forma clara, que o MF (ácido metacrílico) sintetizado com a MM (fenilalanina) permite um maior número de interações específicas MF-MM no polímero sintetizado com a MM e após extração da mesma desse polímero do que o polímero sintetizado sem a MM.

Dentre os MIPs sintetizados, o MIP-6 foi o polímero impresso que menos adsorveu a MM, observando-se graus de adsorção abaixo de 2%. Quando comparado com os graus de adsorção observados para os NIPs, percebe-se que o mesmo não foi seletivo para fenilalanina, visto que o grau mínimo de adsorção dos NIPs foi de $7,1 \pm 0,6\%$. Tal fato pode ser explicado em virtude da variável molécula molde, no MIP-6, ter sido aumentada quase o dobro (1,85) com relação ao MIP-4, enquanto que a quantidade de monômero funcional não foi alterada. Conforme dito anteriormente, para que se obtenha MIPs com sítios mais específicos, é necessário que se tenha uma quantidade tal de MF que seja suficiente para complexar com todos os possíveis sítios ativos da MM e, assim, obter sítios específicos. A interação analito-monômero é governada por um processo em equilíbrio, quantidades superiores do monômero em relação ao analito devem ser empregadas com intuito de deslocar o equilíbrio, para formar maior quantidade de complexos "analito-monômero". Nesse caso, o aumento da MM pode ter desfavorecido a formação desse complexo, impedindo ou diminuindo drasticamente a criação dos sítios específicos para essa interação.

A partir desses resultados, pode-se inferir que uma maior massa de polímero, proporciona maior área de contato, e, portanto maior adsorção da molécula durante um mesmo intervalo de tempo.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A síntese dos MIPs e NIPs foi realizada conforme planejada e esperada, pois o produto formado apresentou-se com aspecto característico de síntese via polimerização em massa, além disso, os resultados obtidos por meio das técnicas FTIR, MEV, TG e DSC foram bastante coerentes com o que se espera de um polímero impresso molecularmente, ou seja, a formação de sítios específicos de reconhecimento para a molécula molde, estabilidade física e térmica do material.

Por meio da técnica FTIR foi possível notar as bandas características dos grupos químicos presentes na fenilalanina nos MIPs antes da extração, com destaque para as bandas características de aminoácidos. A eficiência do processo de extração pôde ser comprovada nos espectros FTIR obtidos após a extração, nos quais as bandas características da Phe estavam ausentes. Por meio da técnica de MEV foi possível observar que o processo de extração afetou a morfologia do polímero deixando-o com o aspecto mais poroso, aspecto de extrema importância para seu uso como adsorvente em SPE. Por meio das curvas TG dos MIPs após extração foi verificada a ausência da Phe nesses MIPs.

Quanto ao estudo de adsorção, o MIP-4 apresentou maior capacidade adsortiva no ensaio realizado em solução aquosa, obtendo-se grau médio de adsorção entre 54 e 56%. Comparando-o aos NIP, para o qual foi obtido grau de adsorção em 11,7%, foi possível concluir que esse MIP apresentou-se específico para a determinação da MM e com grande potencial para aplicação como adsorvente em SPE.

Vários fatores estão envolvidos na síntese de polímeros molecularmente impressos, tais como: a reação, o solvente empregado na síntese e as proporções dos reagentes de síntese. Esses podem modificar as características do polímero formado e sua capacidade adsortiva. A escolha dos monômeros funcionais e do agente reticulante também deve ser avaliada cuidadosamente para cada analito. Esses fatores devem ser bem estudados para cada molécula molde, avaliando-se quais são as condições ideais de síntese, considerando-se também a aplicação a que se destina o MIP sintetizado.

Como sugestões para trabalhos futuros, pode-se citar:

- Analisar os polímeros formados por RMN com o objetivo de determinar a quantidade de monômero funcional incorporada na matriz polimérica;

- Aplicar o MIP-4 sintetizado nesse estudo na técnica de extração em fase sólida e compará-lo com o sorvente C18;
- Medir a porosidade do polímero, pois a mesma determina a acessibilidade dos analitos aos pontos de união presentes no interior da matriz polimérica.
- Avaliar a cinética de adsorção dos polímeros.
- Realizar estudo de seletividade utilizando outras moléculas molde similares à fenilalanina com o objetivo de confirmar a seletividade dos MIPs sintetizados nesse trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Kindy, S.; Badía, R.; Suárez-Rodríguez, J. L.; Díaz-García, M. E. *Molecularly imprinted polymers and optical sensing applications*. Critical reviews in analytical chemistry 30, 291-309, 2000.
- Amin, M.; Akbar, M.; Salman, M. *Composite and theiraging: an overview*. Science in China Series: Technological Sciences, v. 50, 697-713, 2007.
- Andersson, L., Paprica, A., Arvidsson, T. *A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting*. Chromatographia 46, 57–62, 1997.
- Andersson, L.; Sellergren, B.; Mosbach, K. *Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers*. Tetrahedron Letters 25, 5211-5214, 1984.
- Ansell, R. J. *Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs*. Advanced Drug Delivery Reviews 57, 1809- 1835, 2005.
- Bakas, I.; Oujji, N. B.; Moczko, E.; Istamboulie, G.; Piletsky, S.; Piletska, E.; Ait-Ichou, I.; Ait-Addi, E.; Noguier, T.; Rouillon, R. *Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil*. Analytica Chimica Acta 734, 99-105, 2012.
- Barahona, F.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A. *Molecularly imprinted polymer grafted to porous polyethylene frits: A new selective solid-phase extraction format*. Journal of Chromatography A 1218, 7065-7070, 2011.
- Barros, L. A. *Estudos de Modelagem Molecular visando a Síntese de um Polímero de Impressão Molecular para a Determinação de Fenitrotiona em Tomate*. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, Brasil, 2010.
- Beltran, A.; Borrull, F.; Cormack, P.A.G.; Marcé R.M. *Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions*. Trends in Analytical Chemistry 29, 1363-1375, 2010.
- Boos, K-S.; Fleischer, C. T.; *Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP)*. Fresenius J Anal Chem 371, 16-20, 2001.

- Boyd, B.; Bjork, H.; Billing, J.; Shimelis, O.; Axelsson, S.; Leonora, M.; Yilmaz, E. *Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers*. Journal of Chromatography A 1174, 63-71, 2007.
- Bravo, J. C.; Garcinuño, R. M.; Fernández, P.; Durand, J. S.; *A new molecularly imprinted polymer for the on-column solid-phase extraction of diethylstilbestrol from aqueous samples*. Anal. Bioanal. Chem. 388, 1039, 2007.
- Brüggemann, O.; Visnjevski, A.; Burch, R.; Patel, P. *Selective extraction of antioxidants with molecularly imprinted polymers*. Analytica Chimica Acta 504, 81-88, 2004.
- Byun, H-S.; Youn, Y-N.; Yun, Y-H.; Yoon, S. D. *Selective separation of aspirin using molecularly imprinted polymers*. Separation and Purification Technology 74, 144-153, 2010.
- Canevarolo Jr., S. V. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo. Ed. Artliber, 2003.
- Caro, E.; Marce, R.M; Borrull, F. *Application of molecularly imprinted polymers to solid phase extraction of compounds from environmental and biological samples*. Trends in Analytical Chemistry 25, 143-153, 2006.
- Carvalho, M. T. B. R. S. *Preparação de Materiais de Impressão Molecular para Fármacos e a sua Aplicação em Técnicas de Extração Miniaturizada Lab-on-valve*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Cidade do Porto, Portugal, 2012.
- Clark, H. L. M. *Remoção de fenilalanina por adsorvente produzido a partir da torta prensada de grãos defeituosos de café*. Dissertação de mestrado. UFMG. Belo Horizonte, Brasil, 2010.
- Coates, J. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. Chichester. Ed. R. A. Meyers, 2000.
- Colthup, N. B.; Lawrence, H. D.; Wiberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. New York. Academic Press, 1975.
- Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z. *Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization*. Journal of Chromatography B.804, 173-182, 2004.

Dai, C-M.; Zhou, X-F.; Zhang, Y-L.; Liu, S-G.; Zhang, J. *Synthesis by precipitation polymerization of molecularly imprinted polymer for the selective extraction of diclofenac from water samples*. Journal of Hazardous Materials 198, 175-181, 2011.

Dedavid, B. A.; Gomes, C. I.; Machado, G. *Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e Preparações de Amostras*. Porto Alegre: Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise (CEMM) do IDEIA. 60p, 2007.

Dickey, F. H. *The preparation of specific adsorbents*. Proc. Natl. Acad. Sci. 35, 227, 1949.

Fernandes, R. M. T. *Polímeros de Impressão Molecular para Extração Seletiva de Fármacos em Matrizes Biológicas e Determinação por LC-MS/MS e MS/MS*. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, Brasil, 2012.

Fernandez-Llano, L.; Blanco-Lopez, M. C.; Lobo-Castanon, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunon-Blanco, P. *Determination of diclofenac in urine samples by molecularly-imprinted solid-phase extraction and adsorptive differential pulse voltammetry*. Electroanalysis 19, 1555, 2007.

Figueiredo, E. C.; Dias, A. C. B.; Arruda, M. A. Z. *Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 44, 361-375, 2008.

Figueiredo, E. C. *Emprego de Polímeros de Impressão Molecular (MIP) na Extração e Pré-concentração de Analitos Orgânicos em Amostras Biológicas seguido de Determinação Espectrofotométrica*. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas. Brasil. 2009.

Freitas, M. B. *Polímeros de Impressão Molecular no Preparo de Amostras por Extração em Fase Sólida na Determinação Cromatográfica de Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma*. Dissertação de Mestrado, UFA, Alfenas, Brasil, 2008.

Freitas, M. B.; Costa, P. R.; Brito, J. O.; Vieira, E. P.; Maia, P. P.; Siqueira, M. E. P. B. *Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma: Extração em Fase Sólida por Polímeros de Impressão Molecular e Sílica Octadecila para Análise Cromatográfica em Fase Líquida de Alta Resolução*. Latin American Journal of Pharmacy 28, 70-79, 2009.

Granado, V. L. V. *Polímeros Molecularmente Impressos para a Determinação da Difenilamina*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2011.

Grassi, V. *Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo*. Tese de Doutorado, USP, Piracicaba, Brasil, 2008.

Haginaka, J. *Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media*. Journal of Chromatography B 866, 3-13, 2008.

He, C.; Long, Y.; Pan, J.; Li, K.; Liu, F. *Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples*. J. Biochem. Biophys. Methods 70, 133-150, 2007.

Hu, X.; Fan, Y.; Zhang, Y.; Dai, G.; Cai, Q.; Cao, Y.; Guo, C. *Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fiber prepared by surface reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization for monitoring of Sudan dyes in chilli tomato sauce and chilli pepper samples*. Analytica Chimica Acta 731, 40-48, 2012.

Hu, Y.; Pan, J.; Zhang, K.; Lian, H.; Li, G. *Novel applications of molecularly imprinted polymers in sample preparation*. Trends in Analytical Chemistry 43, 37-52, 2013.

Hung, C.; Huang, H.; Hwang, C. *Chiral separations of mandelic acid by HPLC using molecularly imprinted polymers*. Eclética Química 30, 67-73, 2005.

Jodlbauer, J.; Maier, N. M.; Lindner, W. *Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction*. Journal of Chromatography A 945, 45-63, 2002.

Katz, A.; Davis, M. E. *Investigations into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers*. Macromolecules. 32, 4113-4121, 1999.

Koster, E. H. M.; Crescenzi, C.; Hoedt, W. D.; ENSING, K., JONG, G. J. D. *Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction*. Analytical Chemistry 73, 3140-3145, 2001.

Kubo, T.; Hosoya, K.; Watabe, Y.; Ikegami, T.; Tanaka, N.; Sano, T.; Kaya, K. *On-column concentration of bisphenol A with one-step removal of humic acids in water*. Journal of Chromatography A 987, 389-394, 2003.

Lanças, F. M. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. São Carlos. Rima. 2004.

Lasáková, M.; Jandera, P. *Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction*. J. Sep. Sci. 32, 799- 812, 2009.

Lin, L.; Zhang, J.; Fu, Q.; He, L.; Li, Y. *Concentration and extraction of sinomenine from herb and plasma using a molecularly imprinted polymer as the stationary phase*. *Analytica Chimica Acta* 561, 178-182, 2006.

Mahony, J. O.; Nolana, K.; Smytha, M. R.; Mizaikoff, B. *Molecularly imprinted polymers-potential and challenges in analytical chemistry*. *Analytica Chimica Acta* 534, 31-39, 2005.

Mano, E. B. *Polímeros como materiais de engenharia*. 1ªed. Rio de Janeiro. Ed. Edgard Blucher Ltda, 1991.

Mano, E. B; Mendes, L. C. *Introdução a polímeros*. 2ªed. São Paulo. Ed. Edgard Blucher Ltda, p. 191, 2001.

Marestoni, L. D.; Sotomayor, M. D. P. T. ; Segatelli, M. G.; Sartori, L. R.; Tarley, C. R. T. *Polímeros Impressos com Íons: Fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica*. *Quim. Nova* 36, 1194-1207, 2013.

Martins Neto, J. R. *Sensor Amperométrico a base de um Polímero de Impressão Molecular com Protoporfirina IX de Ferro para a Determinação de 4-Aminofenol*. Dissertação de Mestrado, UFMA, São Luís, Brasil, 2010.

Martín-Esteban, A. *Molecularly imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation*. *Trends in Analytical Chemistry* 45, 169-181, 2013.

Martín-Esteban, A. *Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds*. *Fresenius J Anal Chem* 370, 795-802, 2001.

Matsui, J.; Okada, M.; Tsuruoka, M.; Takeuchi, T. *Solid phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor*. *Analytical communications* 34, 85-87, 1997.

Mayes, A. G.; Mosbach, K. *Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase*. *Analytical Chemistry* 68, 3769-3774, 1996.

Mayes, A. G.; Whitcombe, M. J. *Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1742-1778, 2005.

- Minoura, A.; Rachkov, N. *Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, Biochim Biophys. Acta* 1544, 255, 2001.
- Mosbach, K. *Molecular imprinting. Trends in biochemical sciences* 19, 9-14, 1994.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre. 5ªed. Ed. Artmed. 2011.
- Ohlweiler, O. A. *Métodos Termométricos. In: - Métodos Instrumentais de Análise Química*. São Paulo. Livros Técnicos e Científicos, 1978.
- Oliveira, A. M. *Extraction and pré-concentration techniques for chromatographic analysis. Trends in sample preparation*. New York. Nova Science Pub. 136-164, 2007.
- Pauling, L. J. A. *Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies*, J. Am. Chem. Soc. 62, 2643, 1940.
- Peçanha, B. R. B. *Síntese de Polímeros de Impressão Molecular e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida*. Dissertação de Mestrado, UFF, Niterói, Brasil, 2012.
- Peçanha, B. R. B.; Dias, L. R. S.; Spinelli, E.; Muri, E. M. F. *Polímeros de Impressão Molecular Obtidos Através de Polimerização por Precipitação e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida*. Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia, 1-14, 2012.
- Perry, R. H. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2700p., 1984.
- Pichon, V.; Haupt, K. *Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 29, 989-1023, 2006.
- Pérez-Moral, N.; Mayes, A. G. *Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods*. Analytica Chimica Acta 504, 15-21, 2004.
- Pérez-Moral, N.; Mayes, A. G. *Direct rapid synthesis of MIP beads in SPE cartridges*. Biosensors and Bioelectronics 21, 1798-1803, 2006.
- Poole, C. F. *Principles and practice of solid-phase extraction. In: PAWLISZYN, J. Sampling and sample preparation for field and laboratory: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation*. 2. ed. Amsterdam. Elsevier Science, 341-387, 2002.

Qiao, F.; Sun, H.; Yan, H.; Row, K. H. *Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction*. *Chromatographia* 64, 625-634, 2006.

Rodriguez, F. *Chemical engineering series: Principles of polymer system*. 2^a ed. Editora McGraw-Hill, 1982.

Ruela, A. L. M.; Figueiredo, E. C.; Pereira, G. R. *Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems*. *Chemical Engineering Journal* 248, 1-8, 2014.

Scorrano, S.; Mergola, L.; Sole, R. D.; Vasapollo, G.; *Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers for Amino Acid Derivates by Using Different Functional Monomers*. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 1735-1743, 2011.

Sellergren, B. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry, Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Elsevier Amsterdam 23, 2001.

Silva, F. P. *Síntese e Caracterização de Hidrogéis de Poli[(n-isopropilacrilamida)-co-(ácido metacrílico)] e sua Aplicação como Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Brasil. 2006.

Silva, R. G. C. *Materiais Sorventes Impressos Molecularmente Preparados por Processos Sol-Gel*. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas. Brasil. 2009.

Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7^a Edição, Rio de Janeiro: LTC, 200WILLARD, H; MERRITT, L. JR.; DEAN, J. *Análise instrumental*. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 986, 1979.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Numan, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman. 2002. 836p.

Sousa, M. D.; Barbosa, C. M. *Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da liberação de fármacos. Parte 1: Síntese e Caracterização*. *Quim. Nova* 32, 1609-1619, 2009.

Sousa, R. G. *Caracterização Estrutural do Gel Termossensível Poli(N-isopropilacrilamida) e seus Copolímeros com a Acrilamida*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil, 1997.

Spivak, D. A. *Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1779-1794, 2005.

Suedee, R.; Seechamnaturakit, V.; Canyuk, B.; Ovatiarnporn, C.; Martin, G. P. *Temperature sensitive dopamine-imprinted (N,N-methylene-bis-acrylamide cross-linked) polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine*. *Journal of Chromatography A* 1114, 239-49, 2006.

Tai, D.; Lin, C.; Wu, T.; Chen, L.; *Recognition of Dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film*, *Anal. Chem.* 77, 5140, 2005.

Tamayo, F. G.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A. *Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends*. *Journal of Chromatography A* 1152, 32-40, 2007.

Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T. *Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de Extração e Separação*. *Quim. Nova* 28, 1076-1086, 2005.

Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T. *Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 2: Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no Desenvolvimento de Sensores Químicos*. *Quim. Nova* 28, 1087-1101, 2005.

Turiel, E.; Martín-Esteban, A. *Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review*. *Analytica Chimica Acta* 668, 87-99, 2010.

West, A. R. *Solid State Chemistry and its Applications*, John Wiley & Sons, 6ed, New York, 1984.

Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. N. *A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting-synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol*. *Journal of the American Chemical Society* 117, 7105-7111, 1995.

Willard, H; Merritt, L. Jr.; Dean, J. *Análise instrumental*. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979. 986p.

Willians, D. H.; Fleming, Ian. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. London: McGraw-Hill, 1966.

Zurutuza, A.; Bayoudh, S.; Cormack, P.A.G.; Dambies, L.; Deere, J.; Bischoff, R.; Sherrington, D. C. *Molecularly imprinted solid-phase extraction of cocaine metabolites from aqueous samples*. *Anal. Chim.* 542, 14, 2005.

ANEXO I - Curvas de Calibração para a Fenilalanina em Solução Metanol:Ácido Acético (9:1 v/v) e em Água

As curvas analíticas para a fenilalanina em solução metanol:ácido acético (9:1 v/v) e em solução aquosa são apresentadas nas Figuras I.1 e I.2, respectivamente.

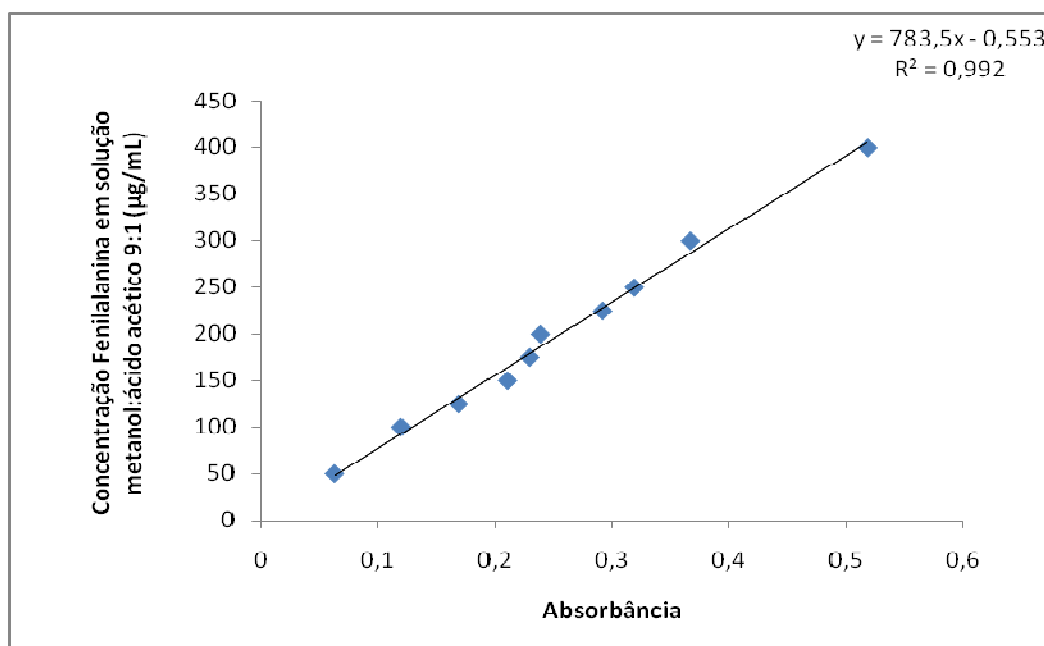


Figura I.1.: Curva de calibração para a fenilalanina em solução metanol:ácido acético (9:1 v/v) ($\lambda = 259\text{nm}$).

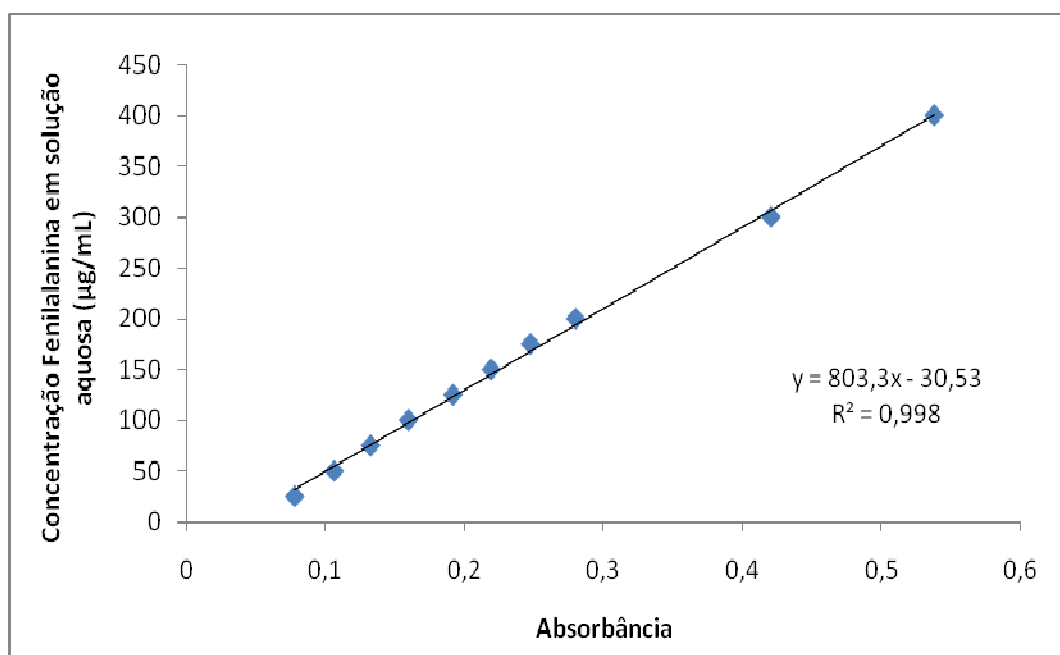


Figura I.2.: Curva de calibração para a fenilalanina em solução aquosa ($\lambda = 258\text{nm}$).

ANEXO II – Espectros FTIR para os MIPs e NIPs sintetizados

Os espectros FTIR para os MIPs e NIPs sintetizados são apresentados nas Figuras II.1 à II.8.

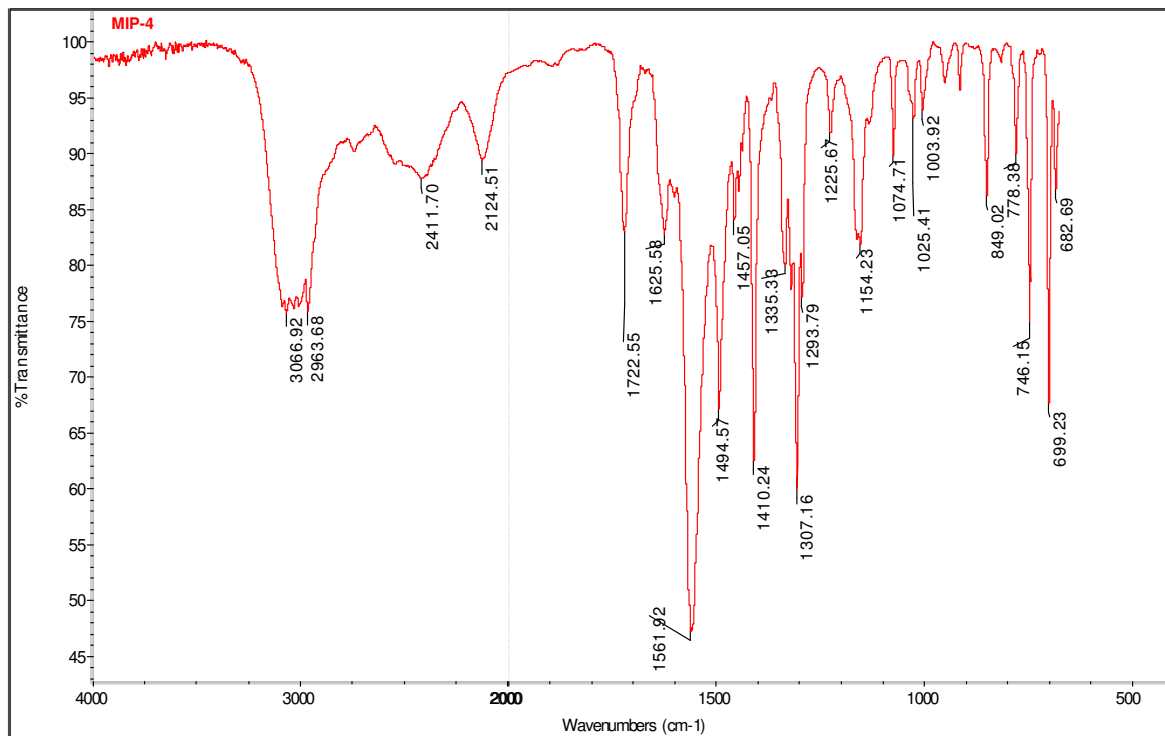


Figura II.1: Espectro FTIR para o MIP-4, antes da extração.

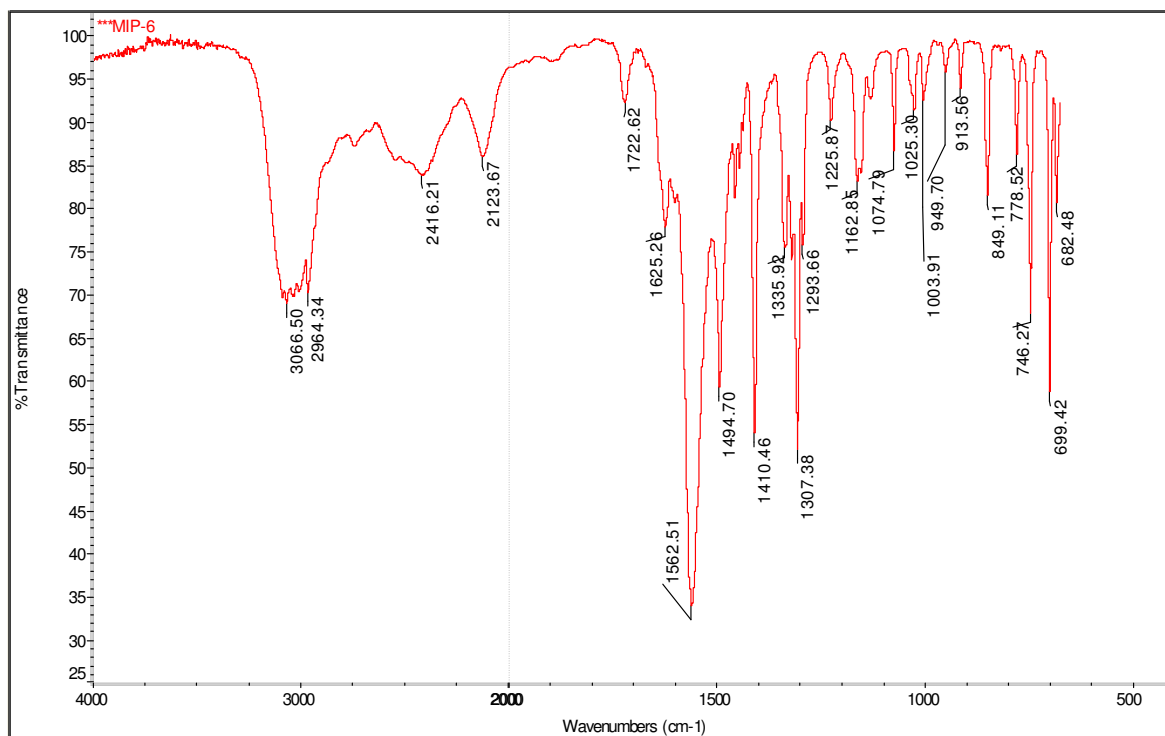


Figura II.2: Espectro FTIR para o MIP-6, antes da extração.

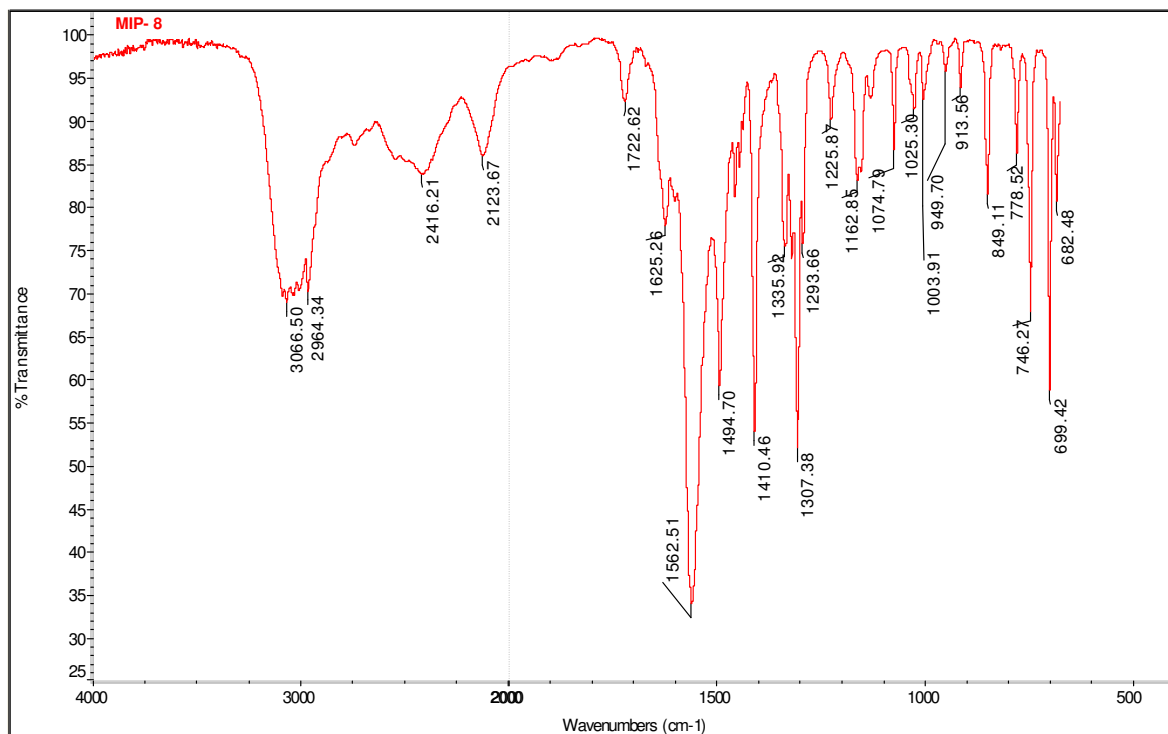


Figura II.3: Espectro FTIR para o MIP-8, antes da extração.

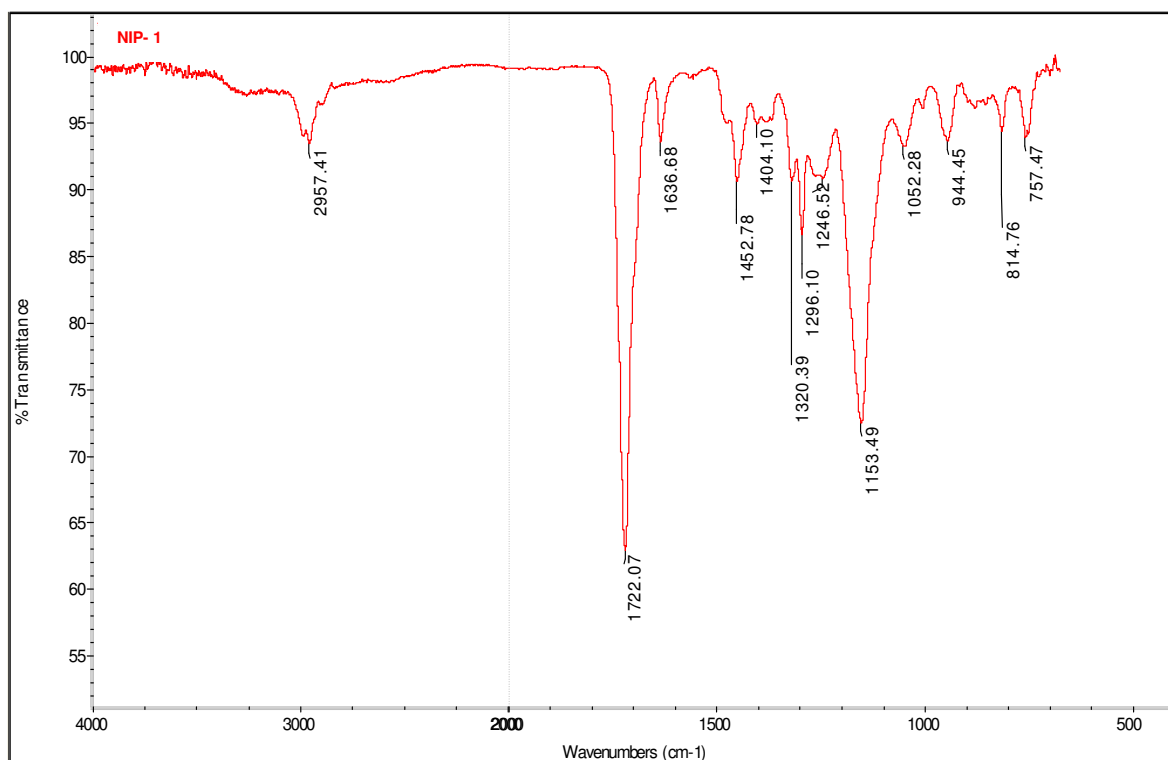


Figura II.4: Espectro FTIR para o NIP-1.

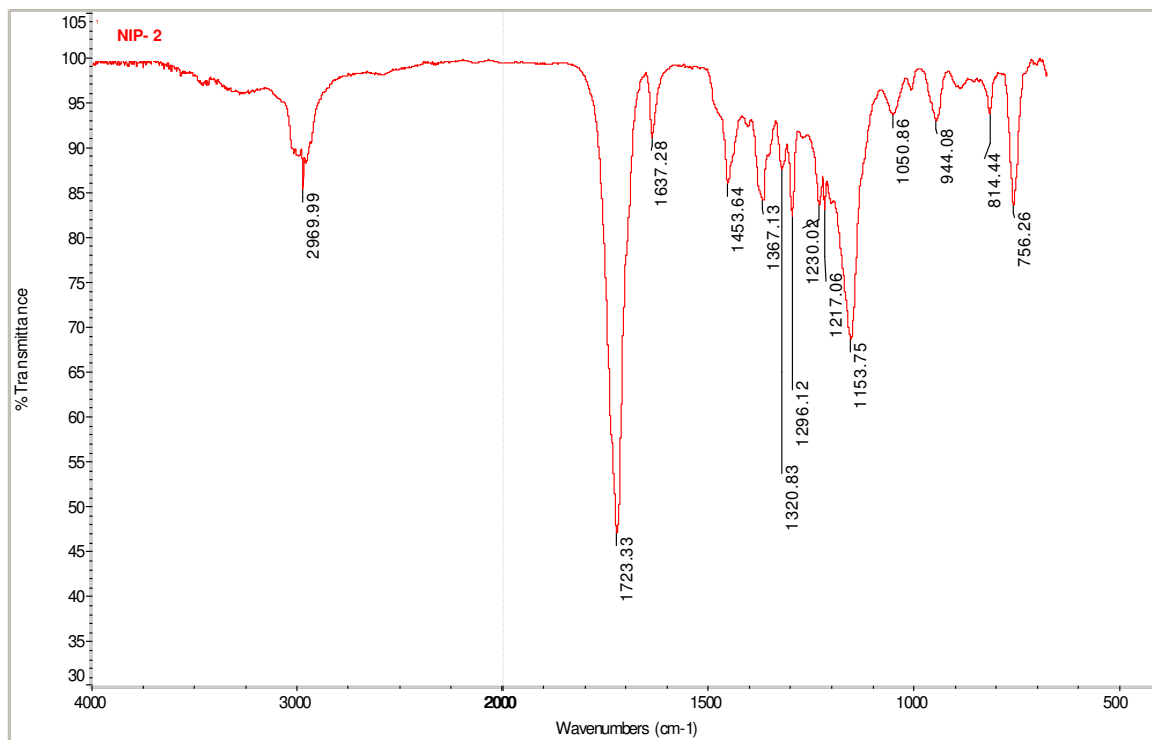


Figura II.5: Espectro FTIR para o NIP-2.

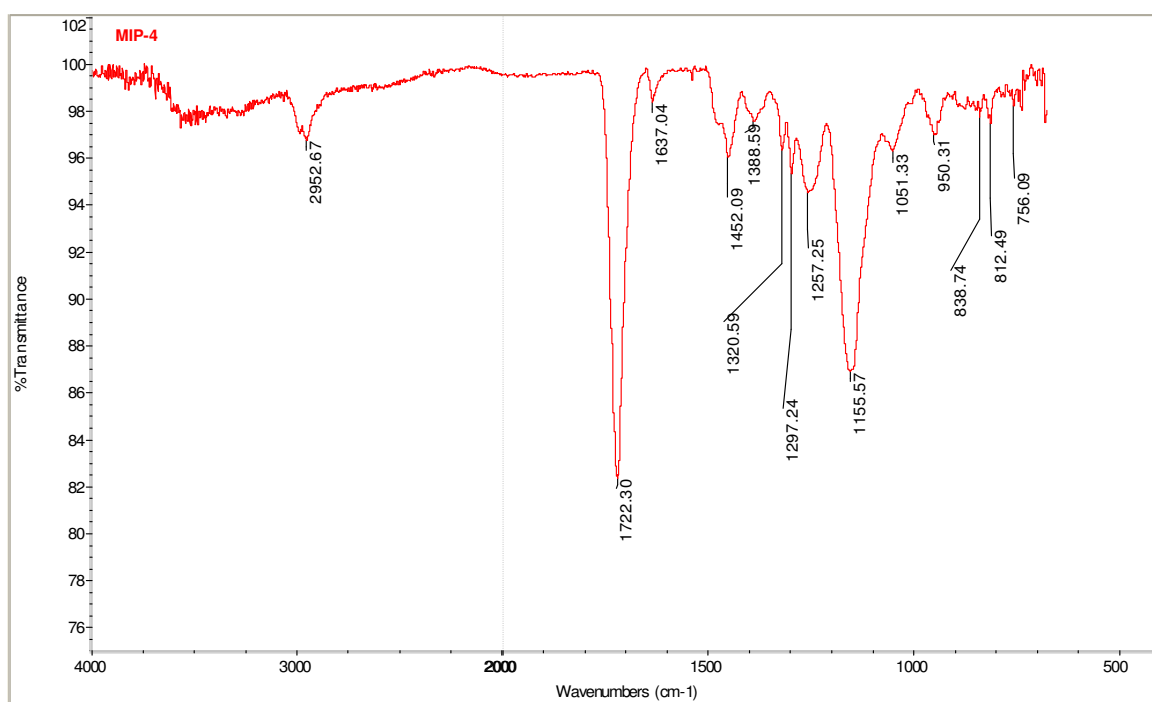


Figura II.6: Espectro FTIR para o MIP-4 após extração.

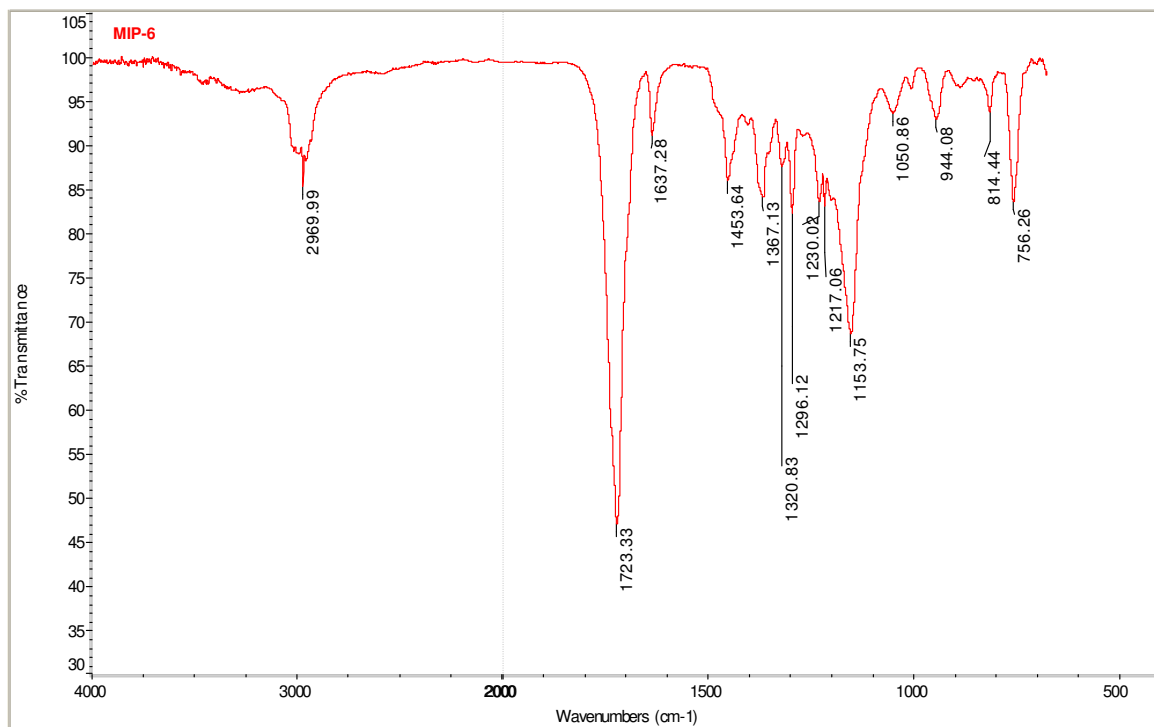


Figura II.7: Espectro FTIR para o MIP-6 após extração.

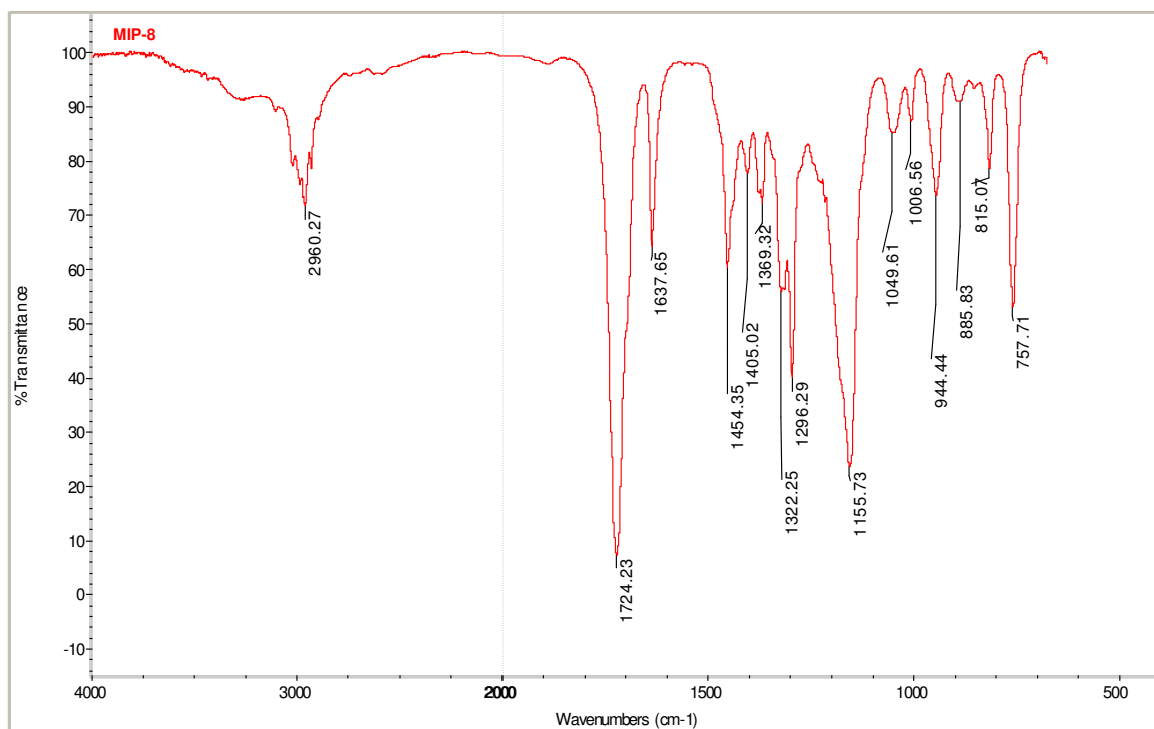


Figura II.8: Espectro FTIR para o MIP-8 após extração.