



Universidade Federal do ABC

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BACHARELADO EM QUÍMICA

**Síntese e Caracterização de Polímeros de Impressão Molecular para
Determinação de Canabinóides e seus Metabólitos em Esgoto Doméstico**

Lindomar José Calumby Albuquerque

Professora Orientadora: Elizabete Campos de Lima

Santo André

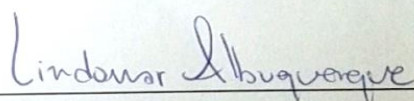
2014

Universidade Federal do ABC

**Síntese e Caracterização de Polímeros de Impressão Molecular para
Determinação de Canabinóides e seus Metabólitos em Esgoto Doméstico**

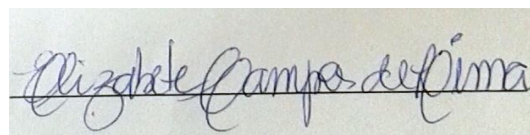
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do ABC como parte dos
requisitos necessários para se obter o título de
Bacharel em Química.

Aluno: Lindomar José Calumby Albuquerque



Lindomar Albuquerque

Orientadora: Elizabete Campos de Lima



Elizabete Campos de Lima

Santo André

2014

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	7
3. Metodologia	8
3.1. Síntese do Polímero de Impressão Molecular	8
3.2. Caracterização do Polímero de Impressão Molecular	10
3.3. Desenvolvimento da Metodologia de CG/MS.....	10
4. Resultados e Discussões.....	11
4.1. Simulações por Química Quântica	11
4.2. Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular	14
4.3. Análise de Morfologia dos MIPs.....	14
4.4. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho	15
4.5. Método CG/MS	18
5. Conclusão	20
6. Referências Bibliográficas	21

Resumo

Polímeros de impressão molecular (MIPs) são materiais sintéticos que possuem sítios de reconhecimento molecular específicos para um determinado analito de interesse (molécula molde), e têm sido empregados para a pré-concentração e extração em amostras complexas, considerando a maior seletividade em relação aos sorventes convencionais empregados na extração em fase sólida. A escolha dos reagentes utilizados na síntese de um MIP deve ser feita de forma criteriosa, a fim de que sejam gerados sítios de ligações específicos e para que o solvente não interfira na eficiência do MIP obtido.

A partir de predições de estudos computacionais para MIPs de THC-COOH, foi elaborado um fatorial experimental para a síntese dos MIPs, onde foi variado o monômero presente (Ácido Acrílico e Ácido Metacrílico) em quatro solventes simulados (água, acetonitrila, metanol e água) para avaliação da interferência do solvente na eficiência do MIP obtido e qual dos monômeros apresentaria uma maior interação com a molécula molde. Dentro deste fatorial variáveis como o tempo de síntese e a incubação dos reagentes foram fatores levados em conta para sua elaboração.

Foi realizada a análise dos MIPs por espectroscopia na região do infravermelho e foram avaliados os comprimentos de onda de absorção das ligações C=O e O-H para análise da formação de interações por ligação de hidrogênio, sendo verificado que quando o solvente utilizado é o clorofórmio, ocorre redução da banda de C=O e da banda de O-H no espectro do MIP em relação ao NIP, indicando a ocorrência da interação por ligação de hidrogênio de forma mais pronunciada neste solvente, conforme predito nas simulações teóricas. Utilizando um microscópio óptico foi observado a morfologia desses polímeros e constatou-se uma grande variação de tamanhos entre seus grãos, mostrando uma morfologia não uniforme. Em paralelo foi desenvolvido um método de CG/MS para determinação e quantificação dos metabólitos provenientes do Δ^9 -THC.

O fatorial experimental construído a partir de predições da Química Teórica e de resultados obtidos com a caracterização dos MIPs se mostrou eficiente, porém testes de eficiência envolvendo extração em fase sólida e o religamento da molécula molde devem ser realizados para uma avaliação completa da eficiência do MIP.

Palavras Chave: polímeros de impressão molecular, infravermelho, canabinóides, fatorial.

1. Introdução

O Relatório Mundial sobre Drogas divulgado em agosto de 2011, aponta um aumento na tendência do consumo de maconha na América do Sul, também foi apontado uma prevalência de uso estimada em 2,6 % da população entre 15 e 64 anos. No Brasil, esse índice se agrava entre alunos do ensino médio, na faixa de 15 a 16 anos com uma prevalência de uso de 6,3 %.¹ No ranking nacional de consumo de drogas, a cocaína e a maconha aparecem como as drogas mais usadas, seguida pelas anfetaminas e ópio.²

O Brasil é responsável por 3% das apreensões mundiais de canabinóides, algo em torno de 200.000 kg. No entanto, o Brasil permaneceu com uma tendência estável no número de apreensões da maconha, enquanto nações como a Bolívia apresentaram um aumento adicional de 74 % no número de apreensões.¹

As drogas ilícitas são consideradas persistentes em ecossistemas aquáticos, sendo classificadas como poluentes orgânicos emergentes (POE) de interesse, quando uma dessas drogas é consumida ela passa por modificações de forma e gera metabólitos, parte dessa droga inicial e dos seus metabólitos são excretados na urina, essa urina é levada diretamente aos esgotos, que passam pelas estações de tratamento de esgoto (ETE), que na maioria das vezes não possuem o tratamento eficiente para a eliminação das mesmas. No Brasil e em outros países, o esgoto tratado acaba sendo lançado em corpos hídricos. Sendo assim, ocorre a contaminação destes corpos hídricos, e mesmo após passar pelo sistema de tratamento nessas águas os metabólitos e pequenas dosagens das drogas ainda persistem e chegam muitas vezes à população que depende dessa água para sobreviver.

O efeitos tóxicos da ingestão de canabinóides variam muito de individuo para individuo, entre os principais fatores de variação estão a idade, a criatividade, a intelectualidade, o senso artístico, temperamento, poder de vontade, sensualidade, entre outros, todas características que na maioria das vezes são únicas, fazendo com que o efeitos da cannabis variem muito. Porém alguns estudos conseguiram determinar alguns padrões, para um consumo de 5 a 10 mg do Δ^9 -THC inicialmente ocorre um período de euforia, que segundo os usuários traz uma sensação de bem-estar e felicidade. Na

seqüência, o usuário passa por um momento de relaxamento, seguido por uma sonolência ou depressão, o usuário perde a percepção de tempo, tem sua coordenação motora diminuída. Esse comportamento foi observado no consumo a curto prazo. Em pesquisas realizadas a longo prazo, os resultados são ainda mais devastadores, ocorre perda da memória recente, o usuário passa a ter falha nas funções intelectuais e cognitivas (ocorre um aumento no número de ideias, porém o usuário não consegue falar o que pensa).³

Após o consumo, o Δ^9 -THC é rapidamente metabolizado, por via hepática, para a forma farmacologicamente ativa, o 11-hidróxi- Δ^9 -THC(11-OH-THC), para a forma inativa 11-nor-9-carbóxi- Δ^9 -THC(THC-COOH) e algumas outras formas, como a 8-hidróxi- Δ^9 -THC e 8,11-dihidróxi- Δ^9 -THC. A via metabólica do Δ^9 -THC está representada na Figura 1.⁴

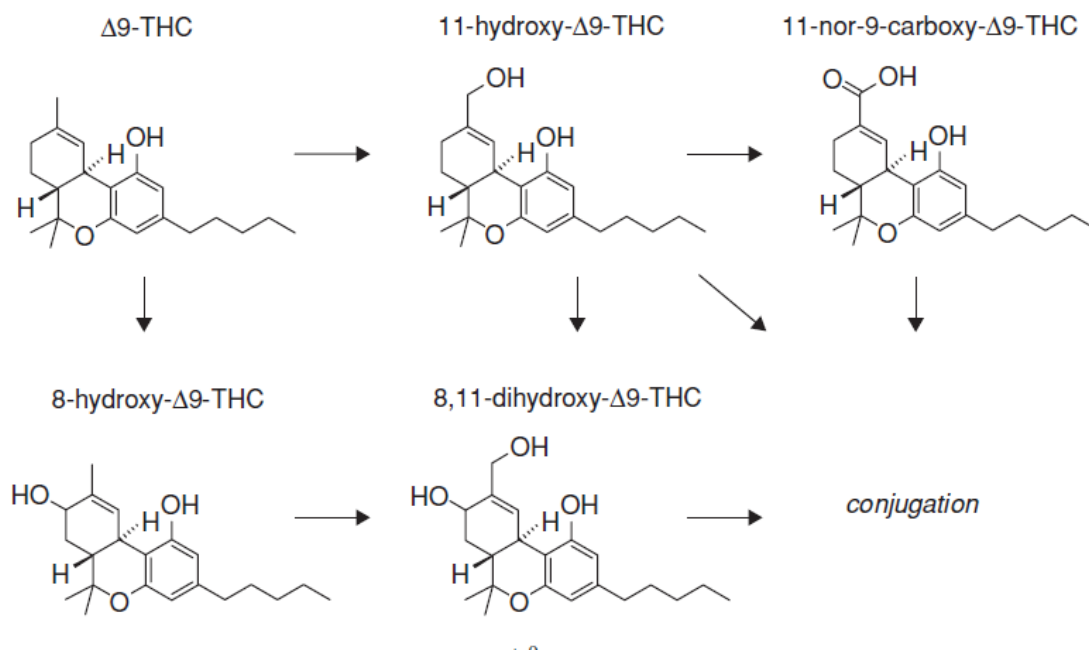


Figura 1. Metabolismo do Δ^9 -THC em humanos⁵

Cerca de 70% da dose de Δ^9 -THC utilizada é excretada dentro de 72 horas após o consumo na forma de urina e nas fezes, sendo a maioria na forma de metabólitos. O THC-COOH é o principal metabólito excretado na urina; o 11-OH-THC (na forma conjugada) representa apenas 2% de uma dose,

e o Δ^9 -THC na forma inalterada está presente apenas como vestígios na urina. A maior parte do THC-COOH é conjugada e excretada como ácido glucorônico solúvel em água. Contudo, depois da excreção, ele é rapidamente hidrolisado de volta nas águas residuais para a forma de ácido livre pelas β -glucuronidases presentes nas bactérias fecais⁵. Dos metabólitos do Δ^9 -THC, o THC-COOH é o mais utilizado como alvo de análise para estimar o consumo de *Cannabis sativa* por meio da análise de águas residuais⁶⁻⁷. O 11-OH-THC e o Δ^9 -THC também costumam ser considerados, entretanto devido suas características lipofílicas, eles não são facilmente encontrados⁵⁻⁷.

O estudo da distribuição dessas drogas ilícitas em diferentes compartimentos hídricos é de grande interesse científico. Os principais pontos de coleta e posterior liberação dos poluentes emergentes no meio ambiente são as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), já que os poluentes emergentes chegam ao sistema aquático principalmente por meio da água de esgoto doméstico, hospitalar ou provenientes de processos industriais e de descarte de produtos comerciais.

A medida dos valores de drogas ilícitas em águas de esgoto pode fornecer dados em tempo real para estimar o abuso de drogas ao nível da comunidade onde está localizada a estação de tratamento de esgoto e água. Esta estratégia foi primeiramente proposto por Daughton⁸ em 2001 e implementada quatro anos mais tarde por Zucatto et al.⁹ para estimar o abuso de cocaína no norte da Itália. Essas estimativas, obtidas de uma forma razoavelmente barata e anônima (para evitar conflitos de privacidade potencial) e permitir a adoção imediata de medidas adequadas por parte das autoridades responsáveis para combater o abuso de drogas pela população.

A eficiência a remoção de drogas ilícitas em estações de tratamento de esgoto e água é desconhecida e devem ser monitoradas a fim de controlar sua liberação para o ambiente e evitar possíveis efeitos danosos em ecossistemas aquáticos oriundos da toxicidade destes compostos.¹⁰

Com o intuito de monitorar os metabólitos de canabinóides em águas residuais, alguns procedimentos analíticos têm sido utilizados, dentre eles os que se utilizam da análise por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁵⁻⁷. Todos os métodos incluem a etapa de extração e pré-concentração do analito, empregando a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) ou a micro extração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*), antes da análise quantitativa.

Geralmente, a seletividade dos sorventes comerciais de SPE é baixa, o que é um problema quando uma extração seletiva a partir de uma matriz complexa tem que ser realizada. Para elevar a seletividade molecular em SPE, polímeros de impressão molecular (MIPs, do inglês *molecularly imprinted polymers*) têm sido empregados, porque em sua síntese são formados sítios de ligação específicos para determinado analito de interesse, podendo ser empregados nas etapas de pré-concentração e extração no preparo de amostras, no método denominado MISPE (do inglês *molecularly imprinted solid phase extraction*)¹¹⁻¹⁴.

Os materiais de impressão molecular são estáveis para armazenagem à longo prazo, são de fácil preparo e econômicos.¹⁵ O potencial deste material é alto, uma vez que oferecem resistência mecânica e às altas temperaturas e pressão e são inertes frente a condições extremas de ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos.¹⁶ Os MIP são materiais sintéticos que possuem cavidades específicas desenhadas para uma molécula molde envolvendo um mecanismo de retenção baseado no reconhecimento molecular. A tecnologia de uso dos MIPs possui ampla faixa de aplicação no preparo de amostras, podendo ser utilizados em extrações SPE e SPME, em técnicas de separação como a CLAE, eletroforese capilar (EC), eletrocromatografia capilar (ECC) e cromatografia em camada delgada (CCD). Diversos tipos de analitos podem ser determinados, tais como proteínas, peptídeos, enzimas, hormônios, nucleotídeos e fármacos. Existe também a associação dos MIP com técnicas eletroanalíticas, com amplo campo de pesquisa¹⁷.

O fenômeno do reconhecimento molecular pode ser definido como a ligação preferencial de um composto a um receptor com alta seletividade sobre outros analitos. Os exemplos de reconhecimento molecular encontrados na natureza têm levado alguns pesquisadores a desenvolver receptores sintéticos com alta seletividade ou especificidade para analitos alvo. Esses materiais sintéticos com sítios de reconhecimento produzidos artificialmente são os polímeros de impressão molecular.

O processo de impressão molecular é composto de quatro etapas:

- 1) Preparo de um complexo entre monômeros funcionais e analito alvo (molécula-molde) através de ligações covalentes ou não-covalentes (presentes nos polímeros desse trabalho).
- 2) Polimerização do conjugado monômero – molécula-molde.

- 3) Remoção da molécula-molde do material polimérico.
- 4) Polimerização com molécula alvo (*template*)

O processo como um todo é mostrado esquematicamente na figura 2.

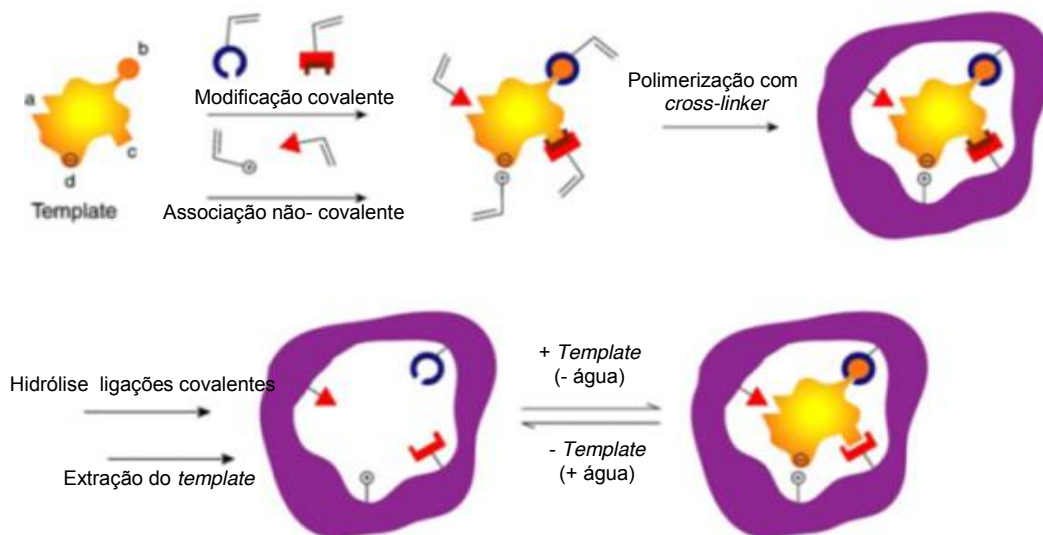


Figura 2: Representação esquemática do processo de impressão molecular.¹⁸

Na primeira etapa, os monômeros funcionais e a molécula-molde interagem, formando um complexo estável monômero molécula-molde (M-T). Na etapa seguinte ocorre a polimerização, juntamente com um monômero reticulante ao redor do complexo M-T, produzindo um polímero mecanicamente estável. Na terceira etapa do processo, as moléculas-molde são removidas do polímero, deixando neste microcavidades com tamanho, forma e estrutura complementar a molécula-molde. Em condições próprias, o analito alvo ou análogos estruturais a ele são extraídos seletivamente. Em sua última etapa o polímero é colocado junto ao composto alvo e se repete a etapa de síntese do mesmo.

A ideia em utilizar uma molécula-molde alvo para se ligar seletivamente a um sítio de reconhecimento foi sugerida primeiramente por Mudd em 1932¹⁸ e Pauling em 1940¹⁹ para explicar como funcionava o sistema imunológico.²⁰

A polimerização por radicais livres ou crescimento em cadeia é um dos métodos de síntese mais importante para conversão de monômeros em polímeros. Podem ser realizados em condições reacionais

onde não influenciam de modo significativo os grupos funcionais nos monômeros e impurezas no sistema. Por essa razão a polimerização por radicais livres constitui em geral o método selecionado para preparo dos MIPS. Essa polimerização por radicais livres se caracteriza por três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. A velocidade de crescimento da cadeia (propagação) é muito superior à etapa de iniciação. Logo que é iniciada a formação da cadeia sua propagação ocorrerá num curto período de tempo originando uma molécula com peso molecular elevada. O radical livre fica ativo durante todas as etapas de polimerização.²¹

Os monômeros polimerizam de forma a originar macromoléculas lineares. Contudo, os monômeros multifuncionais presentes na polimerização conduzem a obtenção de polímeros não lineares de diferentes arranjos moleculares, dado que tendem a serem espécies quimicamente insolúveis conferindo rigidez e estabilidade mecânica dos locais de ligação com capacidade de reconhecimento molecular. Os monômeros multifuncionais permitem ligar quimicamente duas ou mais cadeias poliméricas lineares, dessa forma são designados agentes reticulantes.²¹

O solvente constitui o meio onde estão presentes todos os reagentes do processo de polimerização. Além disso, outra função de extrema importância é na formação dos poros nos polímeros macroporosos. Sua natureza e concentração influenciam na morfologia do polímero e no volume de poros.²¹

Os grupos funcionais dos MIPS ficam com uma organização tridimensional obtida da formação de uma ligação não covalente entre os monômeros funcionais e a molécula-molde durante a polimerização. Um monômero simples, como o ácido metacrílico, pode criar locais de ligações adequados para uma grande variedade de moléculas molde com grupos funcionais aceitadores de prótons ou que estabilizam ligações de hidrogênio. Esse sítios de reconhecimento tem grande capacidade de discriminar pequenas diferenças estruturais da molécula-molde de forma semelhante a seletividade apresentada pelos anticorpos.²¹

Com base no que foi exposto até aqui e em resultados de simulações por DFT realizadas por *Fernandes*²⁶ em 2014, foi construído um fatorial experimental com a variação dos solventes, monômeros

e tempo de síntese para a construção de um planejamento experimental mais efetivo e a obtenção de MIPs com alta eficiência.

2. Objetivos

- ✓ Sintetizar e caracterizar polímeros de impressão molecular para determinação de canabinóides em amostras de esgoto;
- ✓ Construção de um fatorial experimental a partir de resultados de simulações teóricas;
- ✓ Avaliar qual o melhor solvente (água, acetonitrila, clorofórmio ou metanol) para obter um MIP mais eficiente;
- ✓ Avaliar qual o melhor monômero (ácido acrílico ou ácido metacrílico) para obter um MIP mais eficiente;
- ✓ Desenvolver um método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas íon trap para determinação de canabinóides;

3. Metodologia

3.1. Síntese do Polímero de Impressão Molecular

O método empregado na síntese foi o de polimerização em “bulk”, onde a reação é realizada em sistema homogêneo, em frascos fechados (selados) contendo todos os reagentes de síntese. Foram sintetizados os MIPs e seus respectivos brancos analíticos (Polímero não impresso, NIP, do inglês *Non-Imprinted Polymer*) utilizando-se o monômero AA (Ácido Acrílico) e também com o monômero AMA (Ácido Metacrílico).

Os polímeros foram sintetizados com a variação de algumas variáveis como o solvente, o monômero e o tempo de contato entre o monômero e a molécula molde antes da polimerização (4 horas de incubação em sistema fechado), a sequencia realizada durante a síntese é apresentada na forma de fluxograma na figura 3.

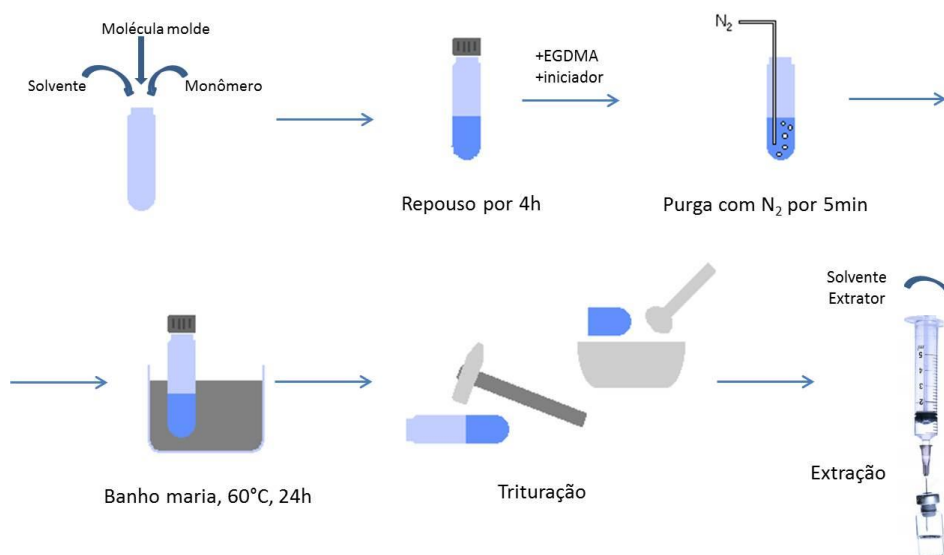


Figura 3: Fluxograma da síntese experimental dos polímeros de impressão molecular

Inicialmente adiciona-se a um tubo de ensaio, o solvente, a molécula molde e o monômero, alguns polímeros passaram pelo processo de incubação, com duração de 4 horas. Após esse período de 4 horas, adicionou-se o agente reticulante e o iniciador radicalar, e o sistema foi agitado no vórtex para melhor homogeneização do meio reacional. Na sequencia, a mistura foi submetida á purga de nitrogênio

por 5 minutos para eliminar possíveis interferentes na polimerização como oxigênio. Após esta etapa os frascos foram selados com parafilm e colocados em banho maria a 60°C por 24 horas. A descrição de cada polímero sintetizado encontra-se na tabela 1, esses polímeros foram preparados com o auxílio de resultados de simulações de química teórica que foram utilizados para a construção dos fatoriais experimentais, conforme *Fernandes, 2014*.²⁶.

Tabela 1. Relação dos Polímeros Preparados e Brancos. (AMA – Ácido Metacrílico, AA – Ácido Acrílico, EDMA – Etileno GlicolDiamina, 1,1 Azobis – 1,1 Azobis-(ciclohexanocarbonitrila).

Polímero	Monômero	Molécula Molde (THC-COOH)	Solvente (1,5 ml)	Método
1	AMA (170 µL)	Presente	Clorofórmio	Incubação
2	AMA (170 µL)	Ausente	Clorofórmio	Incubação
3	AA (150 µL)	Presente	Clorofórmio	Incubação
4	AA (150 µL)	Ausente	Clorofórmio	Incubação
5	AMA (170 µL)	Presente	Clorofórmio	Sem Incubação
6	AA (150 µL)	Presente	Clorofórmio	Sem Incubação
7	AMA (170 µL)	Presente	Acetonitrila	Incubação
8	AMA (170 µL)	Ausente	Acetonitrila	Incubação
9	AA (150 µL)	Presente	Acetonitrila	Incubação
10	AA (150 µL)	Ausente	Acetonitrila	Incubação
11	AMA (170 µL)	Presente	Acetonitrila	Sem Incubação
12	AA (150 µL)	Presente	Acetonitrila	Sem Incubação
13	AMA (170 µL)	Presente	Metanol	Incubação
14	AMA (170 µL)	Ausente	Metanol	Incubação
15	AA (150 µL)	Presente	Metanol	Incubação
16	AA (150 µL)	Ausente	Metanol	Incubação
17	AMA (170 µL)	Presente	Metanol	Sem Incubação
18	AA (150 µL)	Presente	Metanol	Sem Incubação
19	AMA (170 µL)	Presente	Água	Incubação
20	AMA (170 µL)	Ausente	Água	Incubação
21	AA (150 µL)	Presente	Água	Incubação
22	AA (150 µL)	Ausente	Água	Incubação
23	AMA (170 µL)	Presente	Água	Sem Incubação
24	AA (150 µL)	Presente	Água	Sem Incubação

Após a polimerização, o conteúdo sólido do tubo foi triturado em almofariz e pistilo e deixado em descanso para secagem à temperatura ambiente, sendo pequenas alíquotas separadas para posterior

caracterização por análise da morfologia com uso da microscopia ótica e análise espectroscópica na região do infravermelho. O restante da alíquota foi suspenso em 5 ml da mistura 9:1 de Metanol:Ácido Acético e submetidos a extração em um sonificador.²² Foram realizados 3 ciclos de extração com duração de 5 minutos. Com o auxílio de uma seringa de vidro acoplada com microfiltro, foi realizada a filtração do MIPs e NIPs para posterior quantificação da molécula molde por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

3.2. Caracterização do Polímero de Impressão Molecular

Inicialmente, pequenas porções do polímero triturado foi levado ao microscópio ótico, onde com aumento de 50 e 100 vezes, foi verificado a morfologia dos grãos, analisando-se forma e tamanho.

Em seguida, a caracterização do MIP e NIP foi realizada empregando a técnica de espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) para avaliar os grupos funcionais existentes nos materiais, sendo as análises conduzidas em um espectrofotômetro modelo 640 IR da Varian. As amostras foram previamente prensadas com brometo de potássio anidro, para formar pastilhas adequadas para análises. Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4.000 a 400 cm^{-1} , empregando uma resolução de 4 cm^{-1} e uma taxa de 48 varreduras por minuto.

3.3. Desenvolvimento da Metodologia de CG/MS

Na etapa de desenvolvimento do método GC/MS para determinação dos canabinóides, foram preparadas soluções padrões de 2 mgL^{-1} dos metabólitos de 11-OH-THC, canabinol e Δ^9 -THC em acetona e acetonitrila. Essas soluções padrões foram injetadas no sistema GC/MS Íon Trap: Cromatógrafo a gás modelo CP-4000 acoplado com espectrômetro de massa modelo 4500 MS, injector SPI, injector split/splitless, software Varian Saturno e coluna capilar CG ZEBRON ZB-DRUG com dimensões de 10mm x 0,18mm x 0,18 μm da Varian. Alguns parâmetros do método cromatográfico foram variados, como a rampa de aquecimento, volume de injeção e modo de varredura até obtermos um método seletivo, com uma boa relação sinal-ruído e alta precisão.

4. Resultados e Discussões

4.1. Simulações por Química Quântica

Antes da síntese dos MIPs ser reproduzida no laboratório, os resultados obtidos por simulações de DFT foram analisadas para a construção do fatorial.²⁶ Entre os principais resultados obtidos por *Fernandes 2014*, está a variação de energia obtida da simulação da interação entre monômeros (ácido acrílico e ácido metacrílico) e o Δ^9 -THC utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) que consiste na resolução da Equação de Schrödinger para obtenção de propriedades do sistema. A DFT trabalha considerando a densidade eletrônica dos átomos, ou seja a resolução dos cálculos leva em conta interações entre os núcleos e os elétrons diferente da Mecânica Clássica onde os átomos são considerados como esferas para os cálculos. Com esse método é possível descrever a estrutura eletrônica de moléculas e avaliar diversos parâmetros físico-químicos de interações entre moléculas. Os cálculos do DFT foram feitos utilizando o funcional de troca e correlação híbrido B3LYP e o conjunto de função de base 6-311 G(d,p) contidos nos programas Gaussian 09²⁵ e Gaussian 03²⁴, sendo o primeiro utilizado para a simulação da interação entre a molécula molde e o monômero e o segundo para a interação entre a molécula molde e o solvente, esse softwares foram disponibilizados pelo setor de Computação Científica da Universidade Federal do ABC bem como as máquinas de alto desempenho cobalto e cromo.

Na figura 3 pode-se observar uma imagem da interação entre o monômero e a molécula molde, todas as moléculas passaram por otimização de geometria em busca da conformação de menor energia e por uma análise de cargas atômicas antes da avaliação da interação entre as mesmas. Em suas simulações, *Fernandes 2014*, utilizou 6 diferentes monômeros alguns deles com caráter mais ácido, outros com caráter básico, e esses monômeros interagiram de forma diferente com a molécula molde, seja por ligações de hidrogênio ou por interações intermoleculares como van der Waals, por exemplo.

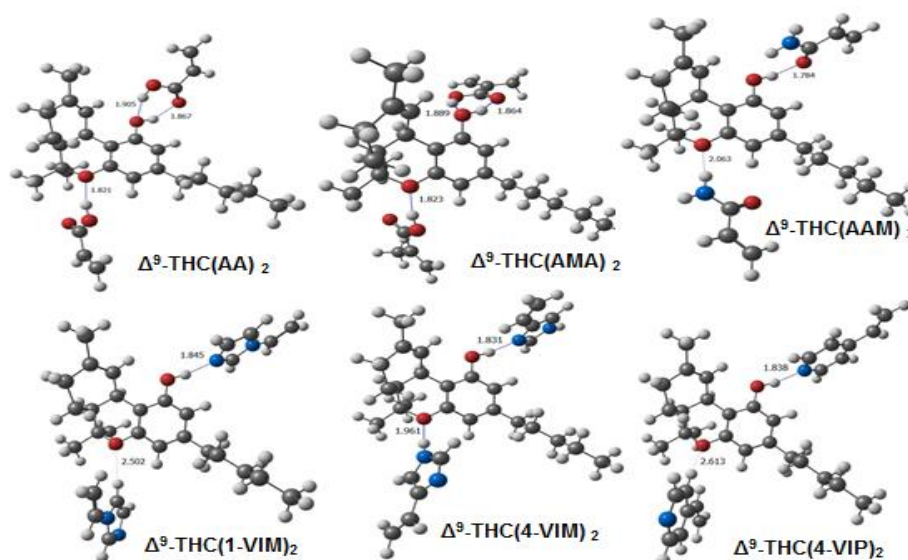


Figura 3: Complexos de interação formados entre a molécula molde Δ^9 -THC e os monômeros funcionais: AA – Ácido Acrílico, AMA – Ácido Metacrílico, AAM – Acrilamida, 1-VIM – 1 Vinilimidazol, 4-VIM – 4 Vinilimidazol e 4-VIP – 4 Vinilpiridina.²⁶

Com a geometria otimizada para os complexos foram calculados os valores de ΔE das moléculas de Δ^9 -THC complexadas com cada monômero de acordo com a equação 1, a partir dos valores da

$$\Delta E = E_{\text{complexo MM-MF}} - E_{\text{molécula molde}} - \sum E_{\text{monômero}} \quad (\text{Equação 1})$$

energia total das moléculas conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Energia de interação (ΔE) entre a molécula Δ^9 -THC e os monômeros funcionais estudados.

Molécula	ΔE (kcal/mol)
Δ^9 -THC (AA) ₂	-18,15
Δ^9 -THC (AMA) ₂	-18,01
Δ^9 -THC (AAM) ₂	-15,65
Δ^9 -THC (1-VIM) ₂	-12,51
Δ^9 -THC (4-VIM) ₂	-16,25
Δ^9 -THC (4-VIP) ₂	-11,33

De acordo com os resultados da comparação das energias de interação entre o Δ^9 -THC e os monômeros selecionados, verifica-se que o maior variação do valor de ΔE é obtido com o MIP sintetizado com AA, porém com pouca diferença em relação ao ΔE obtido quando se utiliza o monômero AMA, indicando que ocorre uma interação mais forte entre essas moléculas e, portanto, espera-se uma maior seletividade à molécula de Δ^9 -THC. Observando-se a magnitude do ΔE obtido para cada conformação é possível estabelecer uma ordem de correlação direta com a quantidade de ligações de hidrogênio formadas. Foi realizado o estudo para as moléculas de THC-COOH como molécula molde e constatou-se resultados semelhantes aos obtidos para o Δ^9 -THC, sendo assim foram escolhidos os monômeros Ácido Metacrílico (AMA) e Ácido Acrílico (AA) para a síntese em laboratório.

Utilizando o programa Gaussian 03, *Fernandes 2014*, realizou cálculos para a interação entre o solvente e a molécula THC-COOH, principal metabólito do Δ^9 -THC. Os possíveis complexos de interação para a molécula de THC-COOH com moléculas de água (H_2O) e metanol (MeOH), bem como com as moléculas do solvente acetonitrila (MeCN) e clorofórmio ($CHCl_3$) para análise da interferência dos solventes na formação de interações por ligação de hidrogênio são apresentados na Figura 5.

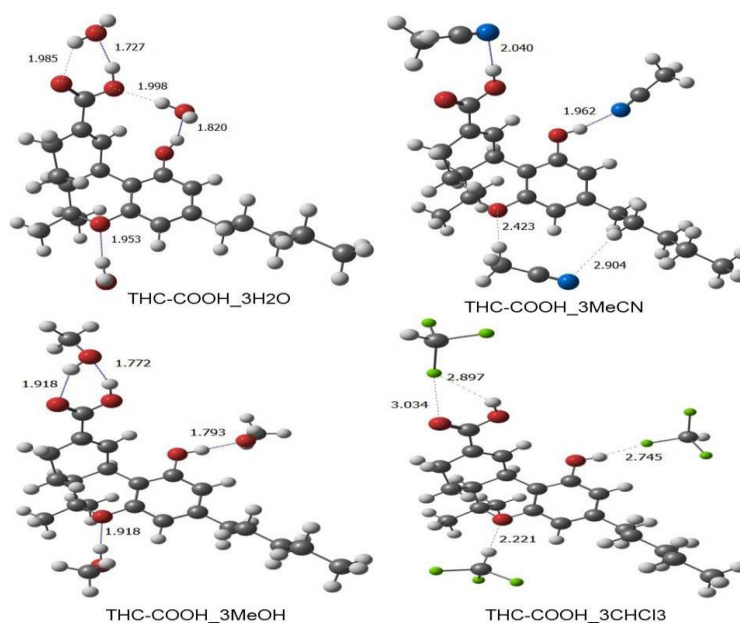


Figura 5: Complexos de interação formados entre a molécula molde THC-COOH e os solventes H_2O (água), MeCN (acetonitrila), MeOH (metanol) e $CHCl_3$ (clorofórmio).

Na molécula de THC-COOH, os três sítios ativos podem interagir por ligações de hidrogênio com a molécula de água e metanol. Já para as moléculas de acetonitrila apenas o sítio carboxílico e hidroxílico podem ser considerados. Nenhuma ligação de hidrogênio é observada na interação com o clorofórmio

Os valores de ΔE obtidos na formação dos complexos de interação, calculados de acordo com a equação 1, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Energia de interação (ΔE) entre a molécula THC-COOH e os monômeros funcionais e solventes estudados.

Molécula	ΔE (kcal/mol)
THC-COOH(AA)3	-35,5045
THC-COOH(AMA)3	-35,1431
THC-COOH(3H ₂ O)	-26,4916
THC-COOH(3MeCN)	-16,2249
THC-COOH(3MeOH)	-26,6679
THC-COOH(3CHCl ₃)	-5,8622

Os dados da tabela 3 mostram que os valores de ΔE se tornam mais distintos e evidenciam a característica de solvente prótico da água e do metanol em interação com os sítios carboxílicos da molécula de THC-COOH, quando mais inferior o valor de ΔE significa uma menor interação do composto com a molécula alvo, para o solvente o clorofórmio apresentou os melhores resultados.

4.2. Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular

Os MIPs foram sintetizados sem maiores problemas conforme metodologia descrita. Na etapa de trituração do polímero, deve-se ressaltar que a não uniformidade e a rigidez do polímero dificultam esta etapa e em decorrência ocorre perda de massa. A massa média dos polímeros foi de 540 mg.

4.3. Análise de Morfologia dos MIPs

As imagens obtidas com o microscópio ótico do material polimérico é apresentada na Figura 6. Percebe-se a heterogeneidade da forma e do tamanho dos grãos, que variam de 20 a 500 μm . Esse comportamento é característico de MIPs sintetizados pelo método *bulk*¹⁷, já que as partículas são obtidas pela pulverização do bloco polimérico formado.

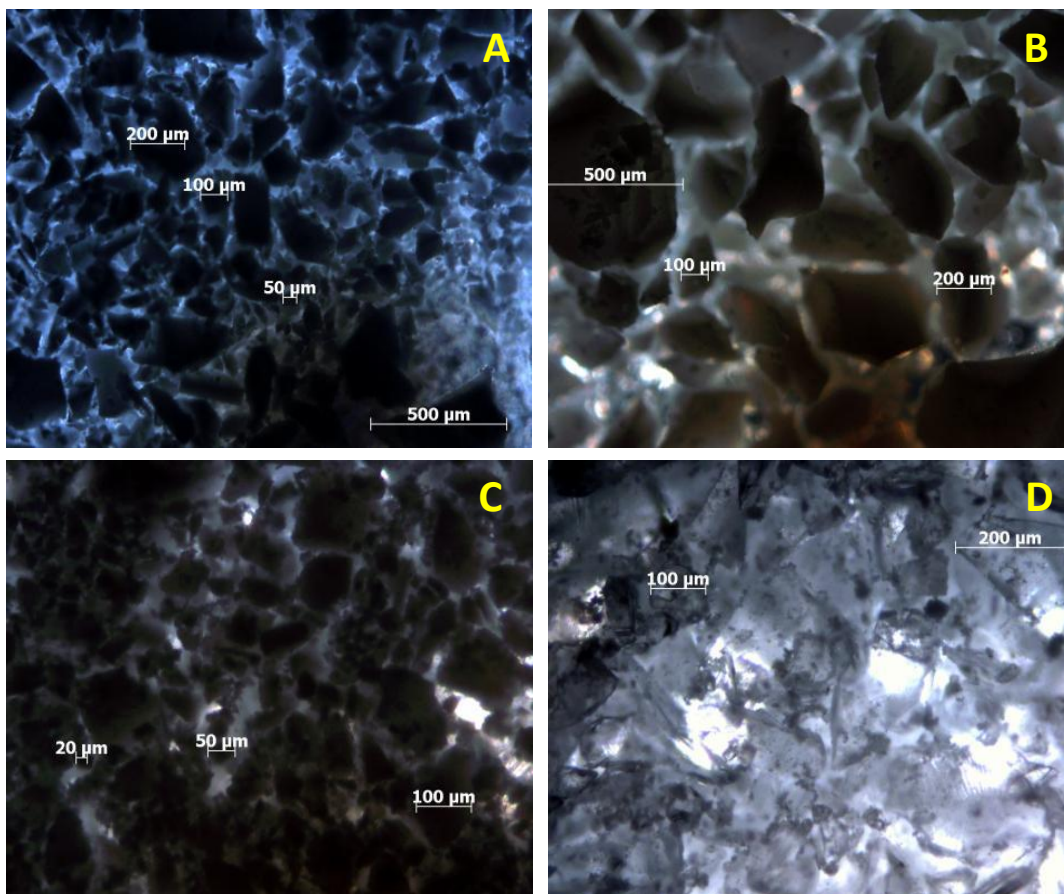


Figura 6: Microscopia ótica do MIP sintetizado em (a) Clorofórmio (aumento de 50x), (b) Acetonitrila (aumento de 50x), (c) Metanol (aumento de 50x) e (d) Água (aumento de 100x)

4.4. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos MIPs, sintetizados com Ácido Acrílico e Ácido Metacrílico nos quatro solventes são apresentados de forma comparativa nas figuras 7 e 8. Em relação aos NIPs observou-se que não há diferenças entre os espectros obtidos para o MIP e para o NIP, considerando que a concentração da molécula molde é muito baixa e com isso a composição do MIP e NIP é praticamente a mesma.

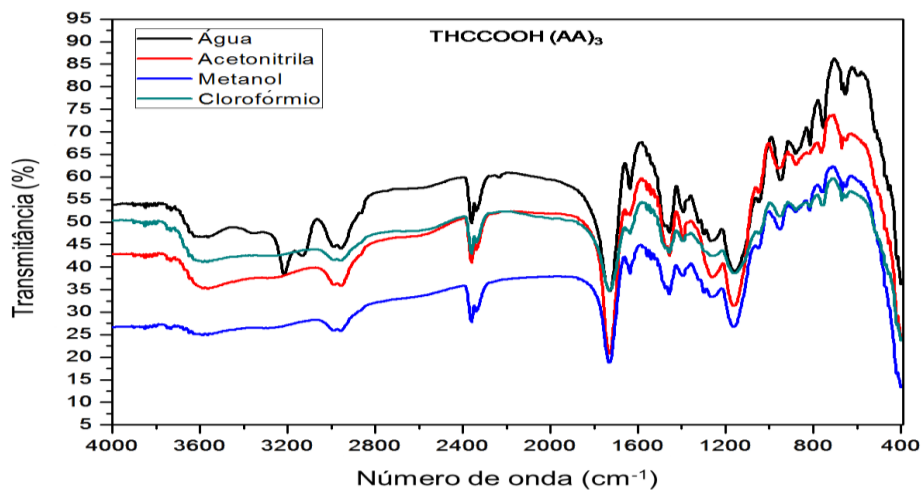


Figura 7: Espectro de absorção no infravermelho para MIP sintetizados com Ácido Acrílico em diferentes solventes.

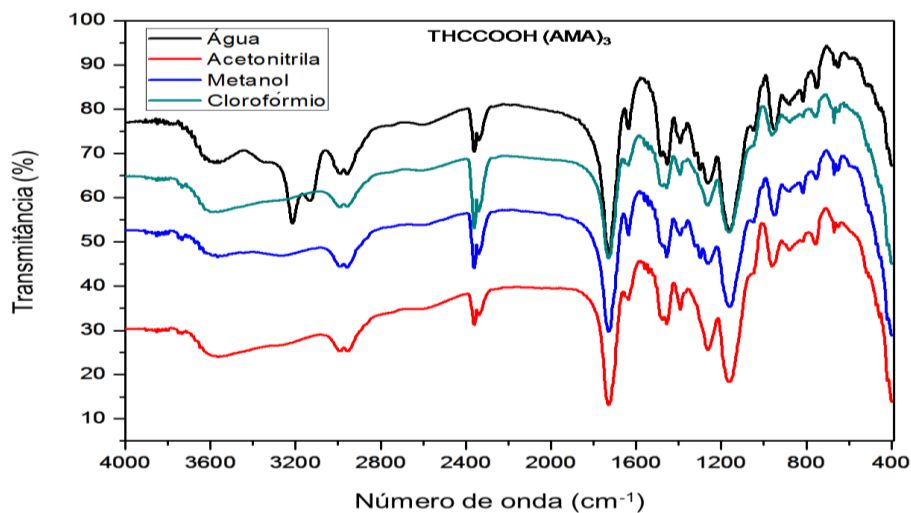


Figura 8: Espectro de absorção no infravermelho para MIP sintetizados com Ácido Metacrílico em diferentes solventes.

Com base nos espectros apresentados nas figuras 7 e 8, constatou-se que quando os MIPs foram sintetizados em água, observa-se faixas de comprimento de onda de absorção:

- na região de 3600 cm⁻¹ característicos dos estiramentos da ligação O-H;
- na região de 3200 cm⁻¹ que indicam a resistência de água residual;
- na região de 3000 cm⁻¹, proveniente da ligação C-H;
- na região de 1700 cm⁻¹, referente á deformação angular dos grupos C=O;

- na região de 1400 cm^{-1} e na região de 1200 cm^{-1} , proveniente da deformação angular C-O;

Já os MIPs sintetizados em acetonitrila, apresentam as mesmas bandas observadas para água são observadas com exceção da banda na região de 3200 cm^{-1} que seria referente à água residual. Quando a síntese ocorre em metanol, nota-se uma redução da banda de adsorção na região de 3600 cm^{-1} e para o Clorofórmio, bandas similares das obtidas para acetonitrila são observadas.²³

Quando comparados os espectros dos MIPs sintetizados com AA e AMA, verifica-se que não há diferença significativa entre eles além da pequena variação na intensidade de absorção nas regiões de 1700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , com os MIPs sintetizados com AMA geralmente apresentando bandas mais intensas nessas regiões.

A redução das intensidades das bandas na região de 3600 cm^{-1} (referente ao estiramento da ligação O-H) e na região 1700 cm^{-1} (referente a deformação do grupo C=O) é um indício da ocorrência de interações por ligações de hidrogênio nos MIPs, provenientes da interação entre a molécula molde e o monômero funcional, conforme foi apontado por Dong e colaboradores²².

Considerando a comparação de cada espectro obtido em determinado solvente (avaliando-se MIP e NIP) e o critério citado anteriormente, constata-se que apenas quando é utilizado o clorofórmio (Figura 9) é que se verifica a redução considerável da intensidade da banda referente à deformação dos grupos C=O e na região do estiramento OH, o que pode indicar a existência das interações por ligação de hidrogênio no MIP. Esse efeito pode estar correlacionado ao fato do clorofórmio possuir menor constante dielétrica ($\epsilon_{\text{água}}=80$, $\epsilon_{\text{acetonitrila}}=37,5$, $\epsilon_{\text{metanol}}=33$ e $\epsilon_{\text{clorofórmio}}=4,8$) em relação a os outros solventes utilizados na síntese, o que gera menor interferência na interação entre a molécula molde e as moléculas do monômero funcional na etapa de pré-polimerização.

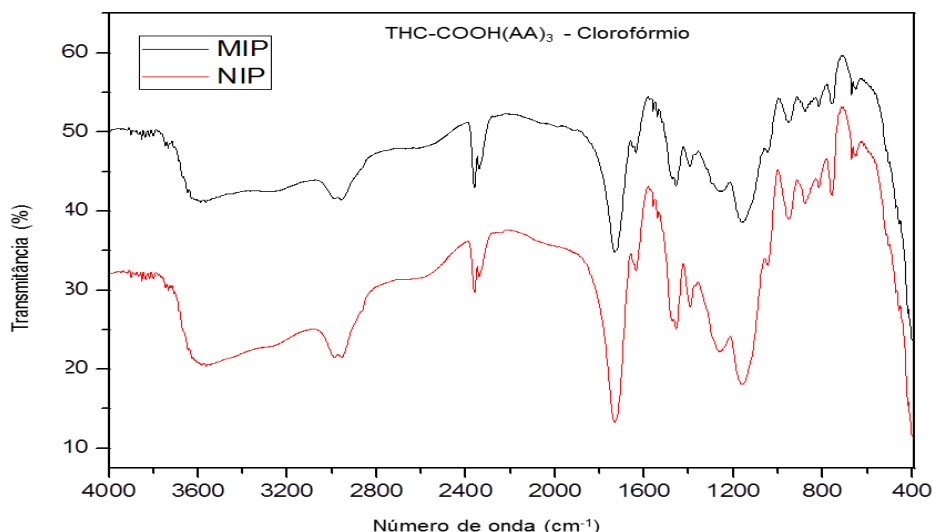


Figura 9: Espectro de absorção no infravermelho para MIP e NIP sintetizados com Ácido Acrílico em Clorofórmio.

4.5. Método CG/MS

O cromatograma obtido com o método desenvolvido é mostrado na figura 10 evidenciando os três picos dos seguintes padrões de canabinóides: 1) 11-OH-THC; 2) Canabinol; 3) Δ^9 -THC. A figura 10 ainda nos traz um espectro realizado no modo MS-MS com os picos de razões massa carga para cada íon. As condições do método desenvolvido são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Condições Cromatográficas. Condições obtidas em sistema GC/MS para determinação de canabinóides e soluções padrão.

Temperatura do injetor	260° C
Volume de Injeção	5 μ L
Programação da Rampa	160°C (1min), 280°C (35°C/min) 30 min
Gás de arraste	Hélio 6.0
Fluxo do gás de arraste	1 ml/min
Temperatura do manifold	50°
Modo de ionização	Ionização por elétrons (70 eV)
Modo de varredura	AMD Scan external
Íons (m/z)	299 (Δ^9 -THC); 231 (CBD); 295 (CBN); 317(Δ^9 -THC -D3)

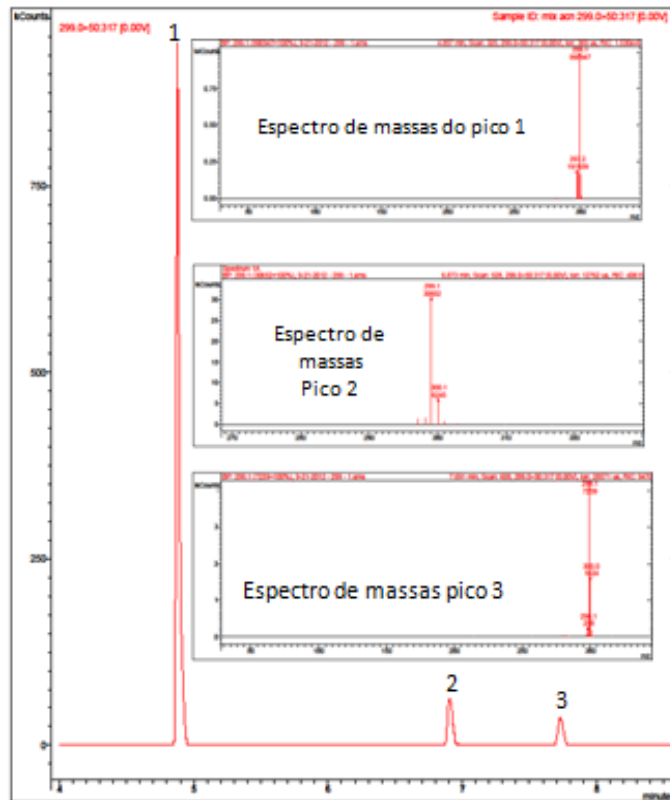


Figura 10: *Total ion Chromatogram* (TIC) obtido para um mix 5mg/L contendo 11-OH-THC, canabinol e Δ^9 -THC usando uma coluna GC capilar CG ZEBRON ZB-DRUG-1, injeção 5 μ L, modo scan AMD external EI. Identificação dos picos: (1) 11-OH-THC, (2)cannabinol, (3) Δ^9 -THC.

5. Conclusão

A abordagem computacional utilizada nesse estudo proporcionou a avaliação prévia do sistema reacional para a preparação de MIPs e pode ser utilizada como uma ferramenta preliminar e complementar à seleção experimental. O estudo comparativo dos valores de ΔE em cada sítio de interação com os diferentes monômeros de síntese elucidou como pode ocorrer a competição entre as moléculas do meio reacional, informação importante quando se avalia a seletividade dos MIPs obtidos.

A caracterização dos MIPs por infravermelho mostrou que o Clorofórmio é o solvente mais adequado para a síntese dos MIPs, o fato de ser um solvente apolar e de ter uma baixa constante dielétrica, permitem que as interações ocorram de maneira mais fraca entre o monômero e a molécula alvo confirmando os valores encontrados nas simulações por DFT, como essas interações são mais fracas obtemos uma maior eficiência de reticulação do MIP.

A microscopia ótica mostrou um padrão de não uniformidade do tamanho dos grãos dos MIPs, conforme é esperado para MIPs sintetizados pelo método Bulk. Testes de eficiência da extração da molécula molde do polímero sintetizado e testes de religação da molécula molde em soluções teste e amostras de esgoto doméstico devem ser realizadas para que se constate a aplicabilidade dos MIPs em processos de detecção, extração e quantificação.²²

A metodologia desenvolvida para a determinação do Δ^9 -THC e seus metabólitos mostrou-se seletiva e deve ser validada assim que o padrão dos metabólitos estiver disponível. Deve-se salientar o fato de que a metodologia desenvolvida não faz o uso de nenhum reagente derivatizante que são caros e impossibilitam o uso em análises de rotina como é o caso da Polícia Federal.

6. Referências Bibliográficas

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), World Drug Report. Vienna, 2013. Disponível em: <http://www.unodc.org/>, acessado em 20 de Outubro de 2014 às 17:00.
- [2] BARCELÓ, D., PETROVIC, M., RADJENOVIC, J., POSTIGO, C., KUSTER, M. FARRÉ, M., ALDA, M. L. DE. *Emerging Contaminants in Waste Waters: sources an occurrence in Emerging contaminants from Industrial and Municipal Waste – Ocurrence, analysis and Effects*. The Handbook of Environmental Chemistry 5S1, Springer-Verlag, Berlin, 16-20, 2008.
- [3] OGA, S; CAMARGO, M; BATISTUZZO, J; *FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA*. 3º Edição, Editora Atheneu, São Paulo, 112-116, 2008.
- [4] ZUCCATO, E., CASTIGLIONI, S., BAGNATI, R., CHIABRANDO, C., GRASSI, P., FANELLI, R. *Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants*. Water Res. 42, 961–968, 2008.
- [5] MELIS, M., CASTIGLIONI, S., ZUCCATO, E. *Metabolism and Excretion of Illicit Drugs in Humans,” in Illicit Drugs in the Environment*. John Wiley & Sons, Inc., 29–52, 2011.
- [6] BOLEDA, M. R., GALCERAN, M. T., VENTURA, F. *Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra- performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1175, 38–48, 2007.
- [7] BOLEDA, M. R., GALCERAN, M. T., VENTURA, F. *Monitoring of opiates, cannabinoids and their metabolites in wastewater, surface water and finished water in Catalonia, Spain*. Water Res. 43, 1126–1136, 2009.
- [8] DAUGHTON, C. *Illicit drugs in municipal sewage In Pharmaceutical and Personal Care Products in the Environment-Scientific and Regulatory Issues*, Washington, DC: American Chemical Society Symposium Series 791p, 2001.
- [9] ZUCATTO, E., C. CHIABRANDO, S. CASTIGLIONI, R. BAGNATI, R. FANELLI (2008), *Estimating Community Drug Abuse by Wastewater Analysis*, Environ. Health Perspectives, 116:1027-1032, 2008.
- [10] POSTIGO, C., ALDA, M. J. DE., BARCELÓ, D. *Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug use estimation*. Environ. Int., 36: 75-84, 2010.

- [11] ADVINCULA, R. C. *Engineering molecularly imprinted polymer MIP materials: Developments and challenges for sensing and separation technologies*. Korean J. Chem. Eng. 28, 1313–1321, 2011.
- [12] TSE SUM BUI, B. & HAUPT, K. *Molecularly imprinted polymers: synthetic receptors in bioanalysis*. Anal. Bioanal. Chem. 398, 2481–2492, 2010.
- [13] KATAOKA, H., SAITO, K. *Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis*. J. Pharm. Biomed. Anal. 54, 926–50, 2011.
- [14] LASÁKOVÁ, M., JANDERA, P. *Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction*. J. Sep. Sci. 32, 799–812, 2009.
- [15] KATAOKA, H. *New trends in sample preparation for clinical and Pharmaceutical analysis*. Trends Anal. Chem, 22:232-244, 2003.
- [16] PICHON, V. *Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers*, J. Chromatogr. A., 1152:41-53, 2007.
- [17] 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.
- [18] MUDD, S. *A Hypothetical Mechanism of Antibody Formation* J. Immunol, 23: 423-427, 1932.
- [19] PAULING, L. *A theory of the structure and process of formation of antibodies*. J. Am. Chem. Soc., 2643.26, 1940.
- [20] KOMIYAMA, M., TAKECHI, T. MUKAWA, H. ASANUMA. *Molecular Imprinting From Fundamentals to Applications*, Wiley Weinheim, Germany, pp. 75, 2003.
- [21] CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. *Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation*; Journal of Chromatography A, 804, 173-178, 2004
- [22] DONG, W., YAN, M., ZHANG, M., LIU, Z., LI, Y. *A computational and experimental investigation of the interaction between the template molecule and the functional monomer used in the molecularly imprinted polymer*. Anal. Chim. Acta 542, 186–192, 2005.
- [23] PRETSCH, E., BULBMANN, P., BADERTSCHER, M. *Structure Determination of Organic Compounds*. Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [24] FRISCH, M.J. et all. *Gaussian 03*, Revision C.02. 2003.

[25] FRISCH, M.J. et all. *Gaussian 09*, Revision A.1.2009.

[26] FERNANDES, Luciana Sarmiento. Estudo teórico e experimental da síntese racional de polímeros de impressão molecular para extração seletiva de canabinoides em amostras de esgoto doméstico. 2014. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia - Química, Universidade Federal do Abc, Santo André, 2014.