



Universidade Federal do ABC
Centro de Ciências Naturais e Humanas
Bacharelado em Química



Ana Luiza Neves Soares

Extração em fase sólida utilizando polímeros de impressão molecular para determinação de estrógenos em cursos d'água

Trabalho de Conclusão de Curso em Química

Santo André – SP
Abril de 2015

Ana Luiza Neves Soares

Extração em fase sólida utilizando polímeros de impressão molecular para determinação de estrógenos em cursos d'água

Trabalho de Conclusão de Curso em Química

Trabalho apresentado à Universidade
Federal do ABC, como pré-requisito para
obtenção de grau de Bacharel em Química

Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Campos de Lima

Santo André – SP
Abril de 2015

**Extração em fase sólida utilizando polímeros de impressão molecular
para determinação de estrógenos em cursos d'água**

Santo André – SP, 15 de abril de 2015

Aluna: Ana Luiza Neves Soares

Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Campos de Lima

Resumo

Foram elaboradas e testadas rotas de síntese de polímeros de impressão molecular com o objetivo de empregá-los como fase sorvente no processo de pré-concentração de estrógenos por extração em fase sólida e posterior análise dos analitos por HPLC. Os resultados cromatográficos, comparados ao cromatograma padrão de calibração, mostraram uma recuperação de 77% para um dos polímeros. Este, por apresentar melhor potencial para reter os os analitos alvo (estrógenos) em seus sítios seletivos, foi classificado como o MIP que mais atende ao que se propõe no trabalho, embora sua caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura não tenha apresentado o que se esperava como resultados mais satisfatórios, a saber, regularidade de grãos e porosidade. Sendo assim, pode-se dizer que a rota e as condições de síntese deste polímero, a saber, em ausência de solvente e com o monômero funcional da reticulação sendo somente a molécula molde, apresentou porosidade suficiente para a interação com a matriz e maior seletividade frente aos demais, sendo a irregularidade de seus grãos desprezível para tal finalidade.

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. Metodologia	6
3.1. Síntese dos polímeros de impressão molecular	6
3.2. Análise e caracterização dos materiais poliméricos	8
3.2.1. Microscopia eletrônica de varredura	8
3.3. Extração em Fase sólida	9
3.4. Método HPLC	10
4. Resultados e discussão	10
4.1. Análise e caracterização dos polímeros de impressão molecular	10
4.1.1. Análise qualitativa (visual) dos polímeros	10
4.1.2. Análise dos filtrados após extração de template via HPLC	11
4.2. Teste dos MIP: análise dos extratos pós SPE da matriz simulada via HPLC	12
4.3. Caracterização dos polímeros de impressão molecular	13
4.3.1. Resultados morfológicos: MEV	13
4.4. Potencial pré-concentrador dos polímeros	14
5. Conclusão	15
6. Referências	16
Anexos	19

1. Introdução

Poluentes ou contaminantes emergentes consistem numa classe de compostos orgânicos de origem variada que podem ser encontrados em matrizes ambientais e biológicas e muitas vezes não são controlados pelas agências regulatórias o que não exclui, contudo, seu potencial risco à saúde humana e ao meio ambiente.¹ Vale ressaltar que tais compostos são denominados emergentes uma vez que apesar de já serem utilizados há décadas, só puderam ser avaliados e monitorados com o recente avanço e desenvolvimento de métodos mais sensíveis de análise².

Os poluentes emergentes são derivados de diversas classes de compostos com amplas aplicações como: fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e reguladores lipídicos); produtos de beleza (bronzeadores, antissépticos, repelentes de insetos e fragrâncias); produtos químicos industriais (plastificantes, preservantes de madeira, produtos de limpeza, anticorrosivos e aditivos de gasolina); pesticidas; hormônios³⁻⁵.

A EPA, do inglês United States Environmental Protection Agency, adere a classificação dos contaminantes emergentes em função dos seus efeitos, usos ou características químicas e biológicas. Uma classe tratada com importante relevância no presente estudo é a dos interferentes endócrinos (IEs) comumente encontrados no solo, ar, alimentos e, com destaque para o objetivo do trabalho, em cursos d'água⁶.

Em seu trabalho *“Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências.”* Dezotti atribui à contaminação de recursos hídricos a responsabilidade de ser um dos maiores problemas ambientais da atualidade e ressalva que a preocupação com os micropoluentes - substâncias que se manifestam em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} - tem aumentado expressivamente nos últimos anos⁷.

Para fins de estudos os hormônios são subdivididos em várias classes. Dentre elas os sexuais merecem destaque quando o quesito é contaminação de efluentes. Estes podem ser subdivididos em femininos (estrógenos); masculinos (andrógenos) e de gravidez (progestógenos)⁸. Os estrógenos, por sua vez, despertam maior preocupação dos

sanitaristas visto que são muito ativos biologicamente e são continuamente introduzidos no meio ambiente⁹.

Várias técnicas de preparo de amostras a níveis traços são discutidas atualmente. Dentre elas a SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*, uma técnica que visa remover os efeitos de matriz, isolar e concentrar os analitos viabilizando a análise e quantificação dos mesmos ainda que em quantidades traços. Trata-se de uma técnica líquido-sólido e, além de ser empregada em extração de analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas, é também útil para amostras sólidas pré-extraídas com solventes¹⁰.

Tecnicamente, fases sólidas são recheadas em cartuchos e atuam como sorventes, enquanto a amostra que contém o analito é depositada no topo do cartucho e percola a coluna ao sofrer uma leve pressão, quando ocorre a separação das partículas.

A Figura 1 apresentada a seguir mostra as etapas em que a SPE acontece. Inicialmente as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra precisam ser reguladas. Isto é feito condicionando o sorvente com solvente adequado; em seguida, a amostra é introduzida e, ao percolar a coluna, o analito e alguns interferentes são retidos; a coluna é, então, limpa para a retirada dos interferentes (processo conhecido como *clean-up*) e, finalmente, a eluição do analito de interesse é feita.

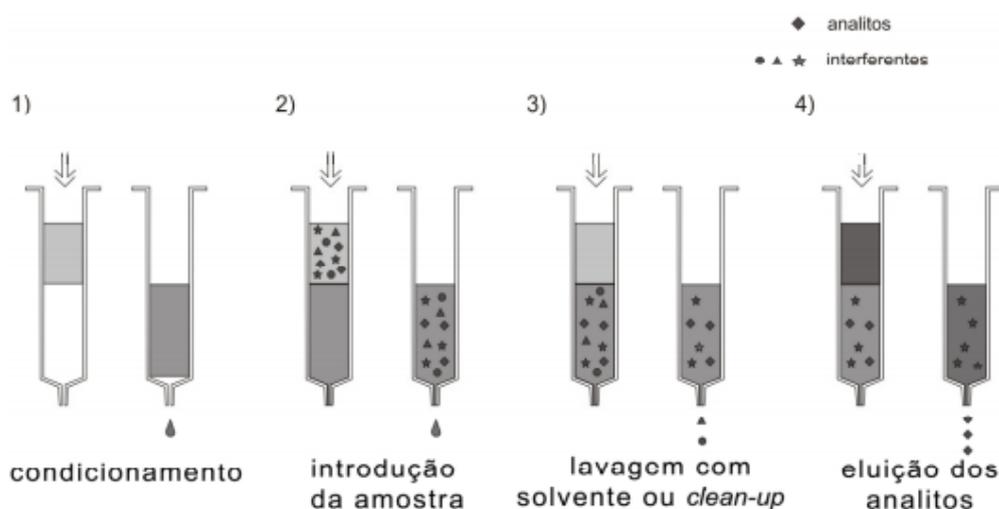


Figura 1: Etapas da SPE para concentração e/ou isolamento do analito alvo. Extraída de: Scientia Chromatographica; Instituto Internacional de Cromatografia¹¹.

Quanto aos mecanismos de retenção sorvente-analito, destacam-se: adsorção,

partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão. As forças atuantes entre as moléculas do analito e do sorvente são, comumente, as ligações de hidrogênio, as interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido e interações iônicas¹².

Diversos sorventes são comercialmente disponíveis. Grande parte deles baseia-se em grupos orgânicos, a saber, C₁₈, C₈, C₂, cicloexil, fenil, cianopropil, aminopropil (NH), ligados quimicamente à sílica; também muito utilizados são os que incluem fases poliméricas como o metacrilato entrecruzado e o copolímero poliestireno divinilbenzeno¹³.

Castillo et al. elucida que a extração de contaminantes emergentes pelo uso de cartuchos tem apresentado índices altamente satisfatórios em diferentes faixas de concentração. Geralmente cartuchos típicos de SPE consistem em tubos de polipropileno com 50 a 500 mg de material sorvente que é fixado no tubo por dois filtros porosos¹⁴. Outras alternativas de dispositivos de SPE são encontradas na literatura. Uma delas é o disco de extração no qual os analitos são imobilizados em uma matriz inerte e estável de microfibras de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro. Atualmente, a junção de cartuchos e discos tem sido testadas com o intuito de se obter técnicas de extração ainda mais eficientes¹⁰.

O presente trabalho dispõe da SPE no modo *off-line* onde a amostra é pré-tratada e depois analisada convencionalmente por métodos cromatográficos. Todavia, existem equipamentos que agrupam a SPE - dispositivos para extração, *clean-up* e eluição da amostra, e o cromatógrafo, comumente líquido, fornecendo, então, um preparo de amostra e quantificação automatizada e contínua.

Apesar das vantagens dos sorventes comerciais de serem de fácil acesso, homogêneos, poderem atuar em SPE como fases reversas, apresentarem estruturas altamente cristalinas, dentre outras, a baixa seletividade torna tais opções inviáveis para estudos específicos. Neste sentido, imunossorventes, polímeros de impressão molecular (MIP), e as fases de acesso restrito (RAM) surgem como alternativas para sorventes seletivos a serem empregados em técnicas de SPE¹⁴.

A extração em fase sólida utilizando polímero de impressão molecular (MISPE, do inglês *molecularly imprinted polymer solid-phase extraction*) é, portanto, uma alternativa interessante para análise quantitativa precisa de analitos alvo em matrizes complexas tais como cursos d'água em concentrações traços. Nesta técnica, os polímeros molecularmente impressos com sítios específicos de interação são empregados como fases estacionárias,

conferindo maior eficiência e precisão ao processo SPE.

Joseph e colaboradores descrevem o reconhecimento molecular como um fenômeno onde a ligação de uma molécula a um receptor é preferencial e seletiva frente a outras moléculas e ressalta a importância destes sistemas em aplicações de estudos da química analítica¹⁵.

O uso de polímeros de impressão molecular é uma estratégia promissora no quesito seletividade e já se encontram na literatura aplicações destes materiais em várias técnicas, tais como cromatografia líquida, eletrocromatografia capilar e eletroforese capilar, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, e como adsorventes seletivos em sensores químicos¹⁶.

Polímeros de impressão molecular (do inglês *molecularly imprinted polymers* – MIP) são polímeros com capacidade de reconhecimento molecular, uma vez dotados de sítios específicos estereoquimicamente moldados a partir da molécula ou analito de interesse³. A síntese destes materiais se dá ao redor da molécula molde (MM) por ligações covalentes ou não covalentes, iniciando-se com a formação de um complexo entre o analito de interesse (MM) e o monômero funcional (MF)¹⁷. O processo de polimerização é iniciado pelo agente iniciador radicalar (IR) e então propagado. Os complexos são fixados por reações de entrecruzamento dos polímeros e, por fim, as moléculas molde são extraídas da matriz polimérica, resultando nos sítios específicos de ligação desejados com afinidade exclusiva à molécula molde. A Figura 2 a seguir apresenta esquematicamente uma visão geral de síntese de MIP.

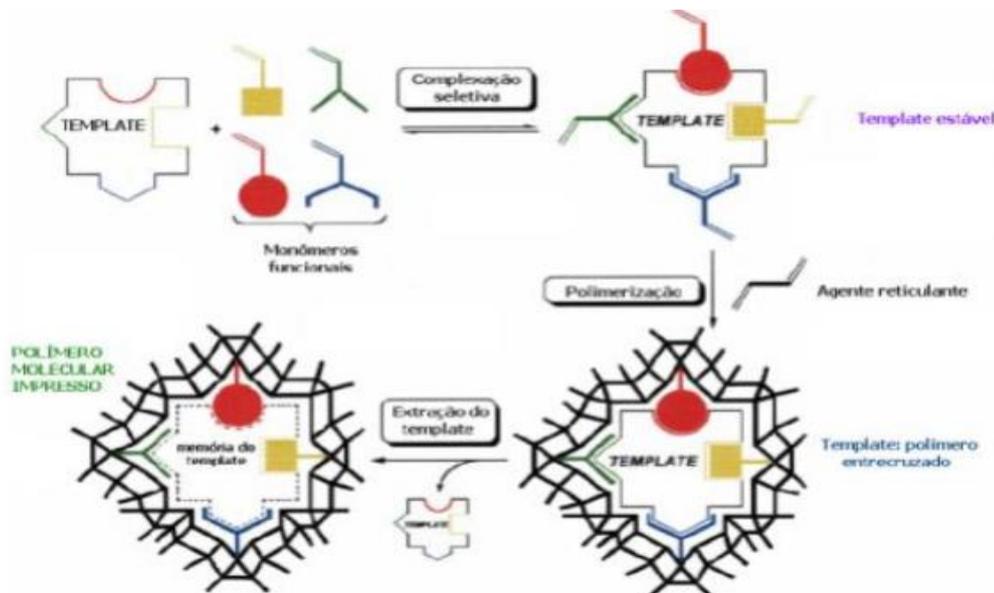


Figura 2: Representação esquemática do processo de impressão molecular. Extraída de Silva, 2009 ¹⁸.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Sintetizar uma fase MISPE para determinação de hormônios estrógenos em efluentes.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver rotas de sínteses variando parâmetros do processo de polimerização e analisar qualitativamente os materiais obtidos;
- Quantificar as moléculas molde extraídas dos polímeros a fim de verificar se houve extração satisfatória;
- Caracterizar os polímeros quanto à sua estrutura, morfologia e porosidade;
- Testar a eficiência, precisão e seletividade dos polímeros impressos empregando-os em extração em fase sólida para pré-concentração dos analitos de interesse analisando os extratos MISPE obtidos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Definir e/ou elencar melhor rota de síntese para obtenção da fase MISPE a partir dos resultados de análise HPLC avaliados.

3. Metodologia

3.1. Síntese dos polímeros de impressão molecular

As rotas de síntese desenvolvidas consistem em processos de polimerização *in Bulk*, onde a molécula molde (template) e o monômero funcional são dissolvidos no mesmo solvente e se ligam em posições específicas. Em seguida, o agente de ligação cruzada é adicionado à mistura para promover a interligação entre as moléculas e a formação de uma rede polimérica; e o iniciador radicalar, responsável por disponibilizar radicais livres para propiciar e manter a reação de polimerização¹⁹⁻²¹. Outras definições desta técnica são ainda encontradas. Andersson H.S. e seus colaboradores, em “*A historical perspective of the development of molecular imprinting.*” adota uma abordagem mais ampla acerca da polimerização *in bulk*. Segundo eles esta metodologia de síntese consiste simplesmente em dispor os reagentes em uma ampola lacrada que, sob determinadas condições formam um monólito que será em seguida macerado e lavado para a remoção do template. O resultado, contudo, espera-se que seja o mesmo: partículas de consistência rígida e de tamanho homogêneo, contudo de formato irregular, devido a necessidade de maceração²².

Algumas rotas foram executadas mantendo-se a proporção aproximada de 1:10 molécula molde e agente reticulante, respectivamente, de modo a garantir o deslocamento do equilíbrio para a formação de mais sítios específicos, como sugere Andersson e colaboradores¹⁶.

Empregou-se os estrógenos estrona e estriol variando-se os agentes reticulantes etilenoglicol trimetacrilato (EDMA) e trimetilpropano trimetacrilato (TRIS), nos solventes clorofórmio e acetonitria, como apresenta a Tabela 1.

Tabela 1: Reagentes, quantidades e condições de polimerização (onde MM é a Molécula Molde, MF o monômero funcional, AR o agente reticulante, e IR o iniciador radicalar).

Polímero	MM (mol)	MF (mol)	AR (mol)	IR (mol)	T (°C)	t (h)	Solvente (ml)
1	Estrona $1,80 \cdot 10^{-4}$	-	EDMA $2,12 \cdot 10^{-3}$	ABCN $4,91 \cdot 10^{-4}$	60	24	-
2	Estrona $1,78 \cdot 10^{-4}$	-	TRIS $2,12 \cdot 10^{-3}$	ABCN $4,91 \cdot 10^{-4}$	60	24	-
3	Estrona $1,73 \cdot 10^{-4}$	Ác. Metacrílico 0,0266	EDMA $2,12 \cdot 10^{-3}$	ABCN $4,91 \cdot 10^{-4}$	60	24	Acetonitrila 3
4	Estrona $1,36 \cdot 10^{-4}$	Ác. Metacrílico 0,0266	EDMA $2,12 \cdot 10^{-3}$	ABCN $4,91 \cdot 10^{-4}$	60	24	Clorofórmio 3
5	Estriol $1,69 \cdot 10^{-4}$	-	EDMA $2,12 \cdot 10^{-3}$	ABCN $4,91 \cdot 10^{-4}$	60	24	Clorofórmio 3
6	Estriol $1,76 \cdot 10^{-4}$	-	TRIS $2,12 \cdot 10^{-3}$	ABCN $4,91 \cdot 10^{-4}$	60	24	Clorofórmio 3
7	Estriol $1,56 \cdot 10^{-4}$	Ác. Metacrílico 0,0266	EDMA $2,12 \cdot 10^{-3}$	ABCN $4,91 \cdot 10^{-4}$	60	24	Clorofórmio 3

A Figura 3 apresenta esquematicamente a marcha analítica adotada. Inicialmente os reagentes de polimerização são adicionados ao tubo de ensaio e submetidos à banho maria à 60°C nos tempos apresentados na Tabela 1. Em seguida foram expostos ao ambiente para secagem e triturados com almofariz e pistilo. A extração das moléculas molde foi então executada com sonicação com metanol, em 3 ciclos de 5 minutos. Após cada sonicação o material foi filtrado em papel de filtro quantitativo e submetido à secagem em temperatura ambiente. O extrato filtrado foi submetido à análise em HPLC a fim de se monitorar a extração das moléculas molde.

Os polímeros não impressos (NIP, do inglês *Non Imprinted Polymer*) foram sintetizados sob as mesmas condições, um para cada MIP, salvo o emprego da molécula molde.

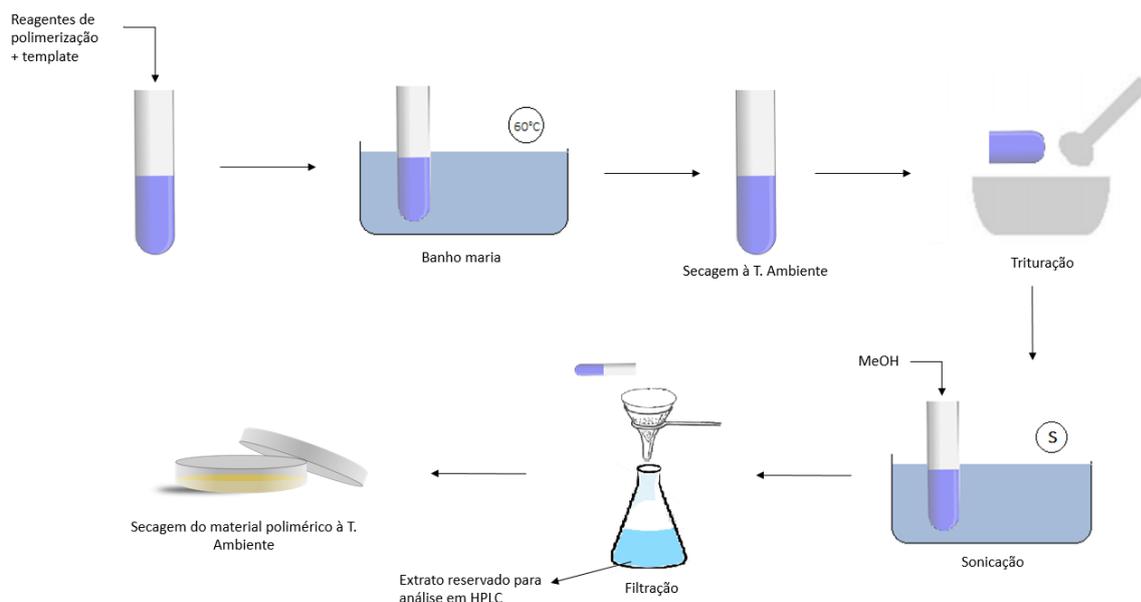


Figura 3: Marcha Analítica de síntese dos materiais poliméricos.

Os polímeros que apresentaram grande heterogeneidade como resultado de uma análise qualitativa por observação a olho nu foram considerados impróprios para continuidade do processo e portanto não foram submetidos às etapas de trituração e extração do solvente. Maiores detalhes acerca destas classificações e desclassificações são tratados nos resultados.

3.2. Análise e caracterização dos materiais poliméricos

3.2.1. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras selecionadas foram colocadas no compartimento de amostras (stubs), como mostra a Figura 4, e introduzidas no equipamento a fim de se analisar aspectos morfológicos dos materiais poliméricos sintetizados. A Figura 5 é uma imagem real do equipamento utilizado.



Figura 4: Porta amostras do MEV compacto



Figura 5: MEV compacto disponível na CEM-UFABC

3.3. Extração em Fase sólida

Para a extração em fase sólida os cartuchos SPE foram preparados de acordo com as seguintes etapas:

Cartuchos SPE comerciais já utilizados e disponíveis foram reaproveitados para colocar as fases MISPE sintetizadas. A fase polimérica comercial foi retirada, a carcaça restante foi lavada e devidamente seca. Dois fragmentos de papel de filtro quantitativo foram depositados no fundo do cartucho que foi em seguida recheado com 100 mg de polímero impresso (MIP). O mesmo foi feito para um cartucho com polímero não impresso (NIP). Sobre o recheio de material polimérico foram colocados mais dois fragmentos do mesmo papel de filtro. A Figura 6 a imagem dos cartuchos prontos para o processo MISPE.



Figura 6: Fotografia dos cartuchos de SPE

A matriz simulada em presença de estrógeno para teste dos materiais poliméricos foi preparada com 1 mg/L de hormônio (estrone e estriol) utilizando-se água de torneira.

Cada coluna foi condicionada com 3 mL de água desionizada seguida de 3mL de acetonitrila utilizando-se um vacuum manifold de 12 posições da marca Fenomenex, a vazão foi controlada utilizando-se bomba a vácuo. Após a etapa de condicionamento das fases MISPE e NIPS em cada um dos cartuchos foi feita a aplicação de 100mL da amostra simulada. Após a aplicação das amostras foi feita a eluição dos compostos de interesse retidos nas fases MISPE em estudo utilizando-se 3mL de uma mistura constituída por Acetonitrila e água desionizada na proporção 1:1. A Figura 7 mostra o sistema utilizado para a realização da extração MISPE efetuada.

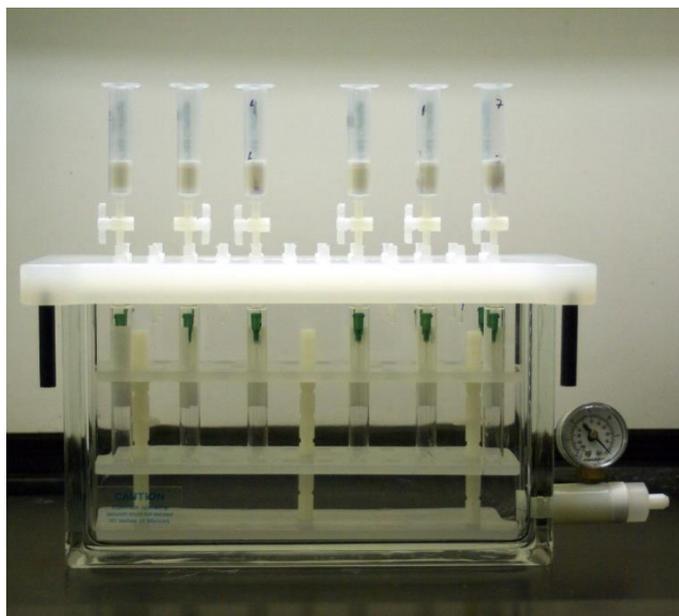


Figura 7: Sistema automatizado de SPE empregado.

3.4. Método HPLC

As condições de análise foram as que seguem: fase móvel 50% ACN:H₂O acidificada com uma solução 3 mmolL⁻¹ de ácido fosfórico (v/v) pH 3,0; coluna C₁₈ (2,1 mm x 250 mm, 5 µm; procedência Supelco), fluxo 1 mLmin⁻¹, injeção 10 µL, λ = 281 nm, T=40°C. Os padrões empregados para otimização do método são de procedência Sigma-Aldrich e em grau analítico. A metodologia foi validada segundo o protocolo ICHQ2R1 (ICH, 2005).

4. Resultados e discussão

4.1. Análise e caracterização dos polímeros de impressão molecular

4.1.1. Análise qualitativa (visual) dos polímeros

A Figura 8 mostra as fases MISPE sintetizadas de acordo com as condições descritas na metodologia. Pode-se observar que os polímeros 2, 3, 5 e 7 apresentam fases bem heterogêneas. Além disto, em todos eles a fase análoga é percebida no MIP e não no NIP. Isto pode sugerir, dada que a única diferença entre eles é a presença e ausência de molécula molde, que a heterogeneidade consiste da molécula molde ou de algum complexo desta. Quanto aos polímeros 3 e 4, analisando as rotas de síntese vê-se que a única diferença entre eles é o solvente: acetonitrila para o 3 e clorofórmio para o 4. Isto pode ser justificado pela diferença de polaridade entre eles. A maior polaridade da acetonitrila frente ao clorofórmio e à molécula molde estrona faz com que a solubilização desta em clorofórmio seja melhor. Quanto aos agentes reticulantes, analisar os polímeros 1 e 2, 5 e 6, nos permite inferir que a

reticulação da estrona com EDMA parece ser mais favorável à obtenção de material homogêneo que com TRIS; ao passo que a reticulação do estriol aparenta ser preferível com TRIS.

Em função dos fatores apresentados torna-se inviável a utilização das demais fases MISPE sintetizadas, o que justifica a escolha de uso das fases 1 e 4 para os estudos realizados.

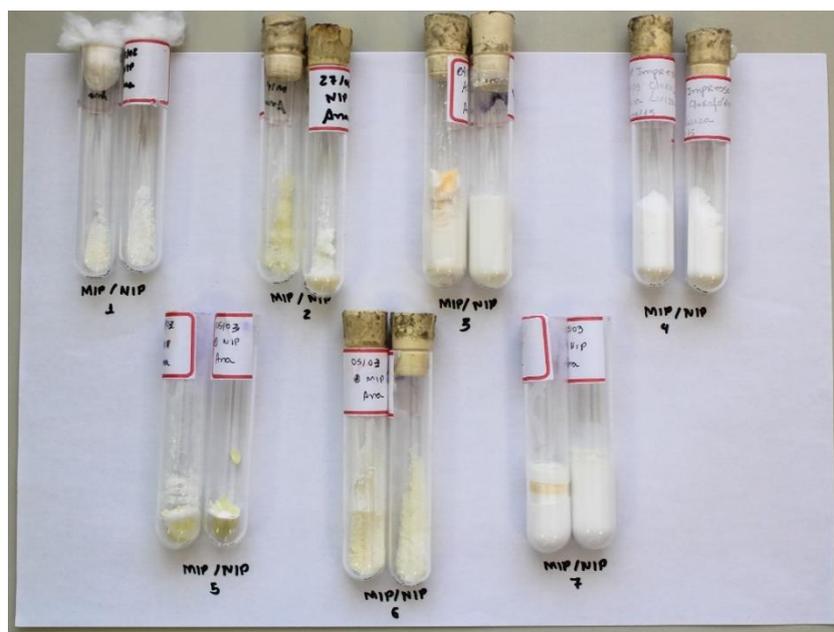


Figura 8: Fotografia mostrando as fases MISPE sintetizadas

4.1.2. Análise dos filtrados após extração de template via HPLC

Os cromatogramas dos filtrados resultantes da extração do template são apresentados nas Figuras 10, 11 e 12 (Vide anexos). O cromatograma da mistura de padrões de estrógenos (Figura 9 em anexo) analisados pelo mesmo método apontam para os tempos de retenção para separação de estrona e estriol. Tomando-o como base comparativa e de calibração, foi possível observar que a extração das moléculas molde estrona e estriol com metanol foi eficiente, o que sugere que os MIPs extraídos encontram-se livres de molécula molde.

Provar que a molécula molde foi removida da rede polimérica, contudo, não garante a formação dos sítios específicos de reconhecimento molecular. A possibilidade de deformação das estruturas poliméricas e a não formação dos sítios estereoquímicos não podem ser descartadas. Isto justifica a próxima etapa da sequência metodológica: o teste dos MIP com base em sua capacidade de reconhecimento molecular, apresentado no tópico seguinte.

4.2. Teste dos MIP: análise dos extratos pós SPE da matriz simulada via HPLC

Apresentamos a seguir os resultados das análises cromatográficas das amostras da matriz simulada a 1 ppm de estrona e estriol pré-concentradas por extração em fase sólida em cartucho recheado com os polímeros de impressão molecular sintetizados (vide Figuras 13 à 16 em anexo).

Foram analisados os extratos de MIP e NIP submetidos ao mesmo processo de SPE. Os resultados cromatográficos dos MIP 1 e NIP 1 demonstram que o eluído do MIP após o processo de *clean up* apresenta alta concentração de estrona, de modo que a retenção das moléculas de analito alvo foram efetivamente retidas pela matriz polimérica. O eluído do NIP, por sua vez, apresenta, no mesmo tempo de retenção, baixíssima concentração de estrona, praticamente desprezível perto dos picos de demais interferentes, como era esperado dado que o NIP não possui sítio de reconhecimento molecular e, portanto, não deve manter o analito alvo após o processo de *clean up*.

Tomando como 100% a área média do pico padrão de estrona a 1 ppm, obtivemos para o MIP 1 uma porcentagem de recuperação de estrona de 77%, e para o NIP de 4%. A porcentagem de recuperação é tratada aqui como o fator que mede o quanto o polímero é capaz de recuperar, retendo em sua matriz, as moléculas de analito alvo. Tal comparação é possível por via direta dado que a concentração do padrão e da matriz simulada é a mesma, a saber, 1 ppm.

Analisar comparativamente as porcentagens de recuperação do MIP e do NIP, e sendo o NIP polímero não impresso obtido nas mesmas condições, nos respalda a atribuir à impressão molecular do MIP o mérito de pré-concentrar as moléculas de analito alvo retendo-os em seus sítios seletivos. Este valor de porcentagem é altamente satisfatório e implica na eficiência do processo.

A análise dos extratos de SPE dos polímeros 4 (MIP e NIP) foi também analisada da mesma maneira. O cromatograma do MIP apresenta um pico característico de estrona. Isto significa, assim como para o MIP 1, que o analito alvo foi retido pela matriz polimérica e liberado pela interação com metanol. O cromatograma do NIP, entretanto, sugere que a concentração de estrona é desprezível quando comparado com os demais picos de interferentes. Há a presença de um primeiro pico bastante proeminente no cromatograma do

NIP que não aparece com a mesma relevância no cromatograma do MIP. A este podem ser atribuídos solvente ou interferentes, sendo a sua natureza irrelevante para a funcionalidade do polímero impresso. A porcentagem de recuperação para o MIP obtida foi de 27%, e para seu NIP, de 11%. Estes resultados não são tão satisfatórios quanto os dos polímeros 1.

Estes resultados sugerem que a síntese mais simples sugerida com o template atuando como monômero funcional da polimerização e em ausência de um solvente foi a mais eficiente na formação de sítios específicos de interação.

4.3. Caracterização dos polímeros de impressão molecular

4.3.1. Resultados morfológicos: MEV

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura estão organizadas na Figura 17 e nos fornecem informações importantes acerca dos aspectos morfológicos dos polímeros. Embora os polímeros 6 (MIP e NIP) tenham sido desclassificados por heterogeneidade do MIP, para efeito de comparação das rotas de síntese suas imagens por MEV foram incluídas nos resultados.

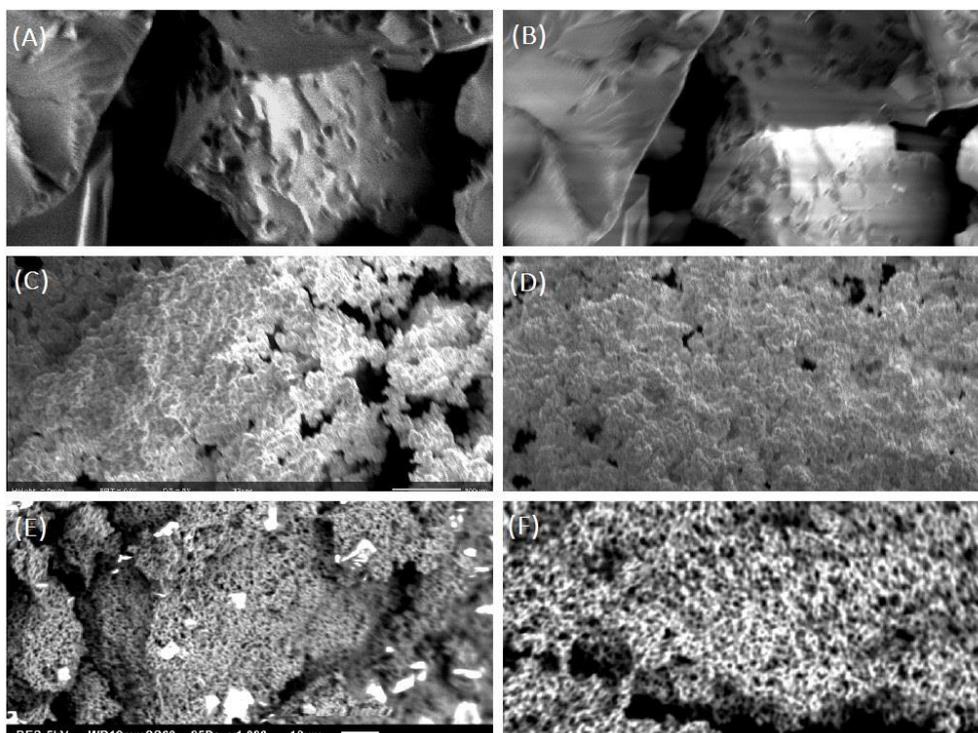


Figura 17: Fotografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. (A) MIP 1; (B) NIP 1; (C) MIP 4; (D) NIP 4; (E) MIP 6; (F) NIP 6

As imagens permitem verificar que a morfologia, bem como o tamanho relativo das partículas e porosidade de cada MIP quando comparada ao seu NIP, é bem semelhante. Isto ressalva o que se propõe: o NIP ser um “branco” do MIP sendo a única diferença entre eles a presença e ausência de molécula molde. Além disto é possível observar uma diferença discrepante entre os materiais oriundos das três diferentes rotas. A começar pelo MIP (A) e seu NIP (B) é perceptível que estes apresentam maior irregularidade quanto aos formatos das partículas e tamanho consideravelmente maior. Isto provavelmente se deve ao fato de terem sido sintetizados na ausência de solvente, como sugere Manzoor e colaboradores²³. Em seu trabalho a polimerização é eficiente em ausência de solvente e eles reiteram que a ausência de solvente no sistema evita interferências e favorece a estabilidade de complexação estável entre monômero e molécula modelo. O que se observa no presente trabalho, contudo, é que a presença de solvente foi vital para a obtenção de materiais mais porosos, o que é importante para a aplicabilidade dos mesmos dado que é esperado que atuem como materiais sorventes e os poros são responsáveis pela interação destes materiais com as amostras de análise.

Outro aspecto que deve ser considerado é a presença de monômero funcional. O MIP (C) e seu NIP (D) foram reticulados partindo do complexo formado entre monômero funcional e molécula molde. Os outros, (A) e (B), (E) e (F) foram tentativas de se polimerizar um material impresso onde o monômero funcional da polimerização é a própria molécula molde. Partículas análogas à rede polimérica são notadas na Figura 17(E). Estas podem ser entendidas como fragmentos do material polimérico cujo processo de maceração foi dificultado devido a interações da molécula molde com algum componente da polimerização, dado que estas são observadas no MIP mas não no NIP.

4.4. Potencial pré-concentrador dos polímeros

O teste dos materiais poliméricos em matriz simulada com estrógenos nos permite julgar sua eficiência como pré-concentrador em coluna de SPE. A isto estão associados aspectos acerca dos tipos de impressão dos polímeros. Ambos os polímeros testados, 1 e 4, foram sintetizados por impressão do tipo não covalente. Este tipo de impressão é reconhecida por ser regida pelos mesmos tipos de interação que os sistemas de reconhecimento biológico, a saber, ligações de H, interações eletrostáticas e interações π ²³. Neste tipo de impressão, os monômeros são comumente empregados em excesso, o que diminui a seletividade do material dada a possibilidade de formação de locais de ligação não específicos²⁴. O polímero 1,

contudo, foi sintetizado propondo que o template atuasse como monômero, o que reduz a possibilidade de comprometimento de seletividade. O polímero 4, por sua vez, foi sintetizado com monômero funcional.

A polimerização de ambos os polímeros testados, 1 e 4, é governada por ligações de hidrogênio que acontecem entre os grupos hidroxila da estrona e éster do EDMA, e o ácido carboxílico do ácido metacrílico. Os grupos funcionais envolvidos nas ligações de hidrogênio estão apresentados na Figura 18.

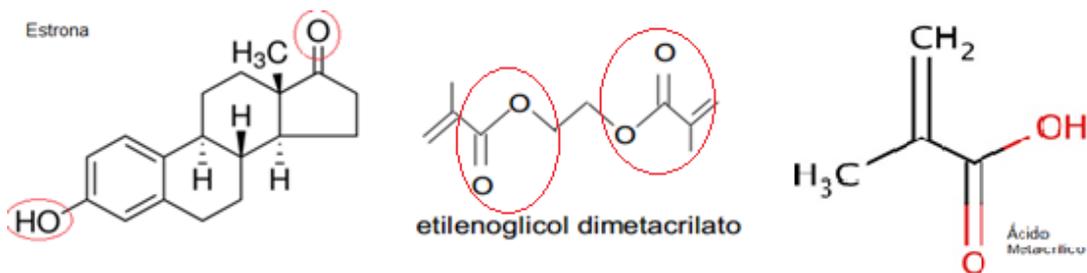


Figura 18: Grupos funcionais envolvidos nas ligações de hidrogênio que regem as impressões não covalentes

5. Conclusão

As imagens obtidas por microscopia de varredura eletrônica e as análises a olho nu permitem inferir que os materiais sintetizados com monômero funcional e em presença de clorofórmio apresentaram maior regularidade de tamanho de grãos e de poros. Os resultados cromatográficos dos testes dos polímeros, por sua vez, demonstram que o polímero 1 é o que apresenta maior potencial para o que se propõe. Aspectos discutidos sobre as condições e interações que regem a polimerização sustentam tal resultado: a síntese em presença de solvente e monômero funcional pode ter a seletividade do polímero resultante comprometida dadas as interferências nas interações entre monômero e molécula modelo. Isto pode ter comprometido a seletividade do polímero 1.

Comparar os resultados nos mostra também que a irregularidade das partículas não fada a aplicação de pré-concentrador seletivo dos polímeros ao fracasso e que a porosidade do polímero 1, embora menor que a do polímero 4, foi suficiente para permitir a interação do analito alvo com os sítios impressos.

Sendo assim, a rota a partir da qual se obteve os polímeros 1 cujo potencial de

recuperação foi 77% se apresentou mais interessante para interagir seletivamente com as moléculas de estrona e pré-concentrá-las. Uma vez muito semelhantes as moléculas de estrona, estriol e outros estrógenos, acredita-se que a mesma rota pode ser empregada também com sucesso para tais moléculas alvo. Neste sentido, o trabalho continua em andamento para a síntese com demais estrógenos além de outras técnicas para caracterização dos materiais.

6. Referências

1. LA FARRÉ, M., PÉREZ, S., KANTIANI, L., BARCELÓ, D. (2008), *Fate and toxicity of emerging pollutants and transformation products in the aquatic environment, Trends in Anal. Chem.*, 27: 991- 1007.
2. PEDROSO, R.C.R. *Desenvolvimento de Métodos de Análise por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.*
3. CORREIA, J. IAREN, *Referência Européia na Análise de Poluentes Emergentes. U. Porto Alumni. 2008.*
4. GHISELLI, G. *Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. 181 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.*
5. REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R. ; VIEIRA, E. M.. *Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology, v. 2, p. 283-288, 2007.*
6. EPA (United States Environmental Protection Agency). *Nutrient control design manual: state of technology review report. The Cadmus Group, Inc., 2009, 104 p.*
7. BILA, D. M.; DEZOTTI, M., (2007) *Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. Química Nova, 30: 651-666.*

8. REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R. ; VIEIRA, E. M.. *Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology*, v. 2, p. 283-288, 2007.
9. GUIMARÃES. T. S., (2008). Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17 β -Estradiol, estriol, estrona e 17 α -Etinilestradiol em água de abastecimento: estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental. Dissertação de Mestrado. EESC/USP, São Carlos, 2008.
10. NOVÁKOVÁ, L.; VLOCKOVÁ, H. *Anal. Chim. Acta*, 658, 8 (2009);
11. *Scientia Chromatographica* Vol.2, N°1, 13-25, 2010; Instituto Internacional de Cromatografia.
12. LANÇAS, F.M. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. Rima, São Carlos (2014).
13. HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. *CHROMATOGR*, J. 1153, 54 (2007);
14. *Scientia Chromatographica* Vol.2, N°1, 13-25, 2010; Instituto Internacional de Cromatografia, ISSN 1984-4433
15. ANDERSSON, L.; SELLERGREN, B.; MOSBACH, K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Lett.*, v.25, n.45, p.5211-5214, 1984.
16. MAGALHÃES, C.S., GARCIA, J.S.; LOPES, A.S.; FIGUEIREDO, E.C.; ARRUDA, M.A.Z. Strategies for sample preparation focusing on biomolecules determination/characterization In: ARRUDA, M.A.Z. (Eds.). *Trends in sample preparation*. New York: Nova Science Publishers, 2007. cap.9, p.245-288.
17. ALLENDER, C.J.; RICHARDSON, C.; WOODHOUSE, B.; HEARD, C.M.; BRAIN, K.R. Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers. *Int. J. Pharm.*, v.195, n.1-2, p. 39-43, 2000.
18. SILVA,R.G.C. (2009), *Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processo sol-gel*. Tese de doutorado, Unicamp, p. 16.
19. PHILIP, J.Y.N.; BUCHWEISHAIJA, J.; MKAYULA, L. L.; YE, L. Preparation of molecularly imprinted polymers using anacardic acid monomers derived from cashew

- nut shell liquid. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, n.22, p.8870-8876, 2007.
20. PUOCI, F.; IEMMA, F.; CIRILLO, G.; PICCI, N.; MATRICARDI, P.; ALHAIQUE, A. Molecularly Imprinted Polymers for 5-Fluorouracil Release in Biological Fluids. *Molecules*, v.12, n.4, p.805-814, 2007
21. KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; GHASEMI, E.; FASIHI, J.; SHAMSIPUR, M. Imprinted polymer particles for selenium uptake: Synthesis, characterization and analytical applications. *Anal. Chim. Acta*, v.581, n.2, p.208-213, 2007.
22. Andersson H. S., Nicholls, I. A. (2003) *Molecularly Imprinted Polymers. Man-made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry* (ed. Sellafron, B.), Chapter 1 "A historical perspective of the development of molecular imprinting.", Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 1-19.
23. MANZOOR, S. et al., Síntese de polímero de impressão molecular de lapachol por técnica de polimerização em bulk, 2011.
24. CUMMINS, W.; DUGGAN, P.; MCLOUGHLIN, P. A comparative study of the potential of acrylic and sol-gel polymers for molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta*, v. 542, p. 52-60, 2005.
25. M. Komiyama., T. T., M.H. Asanuma, *Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications*, Wiley-VCH: (2003)

Anexos

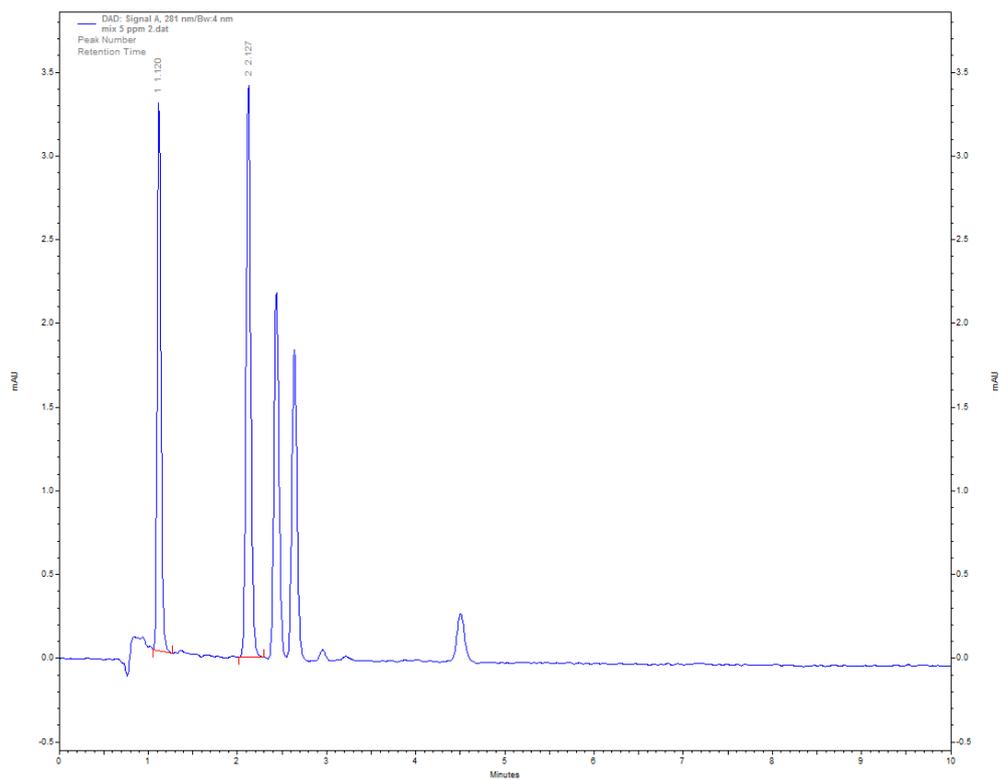


Figura 9: Cromatograma do padrão apresentando os tempos de retenção de estrona e estriol, da esquerda para a direita.

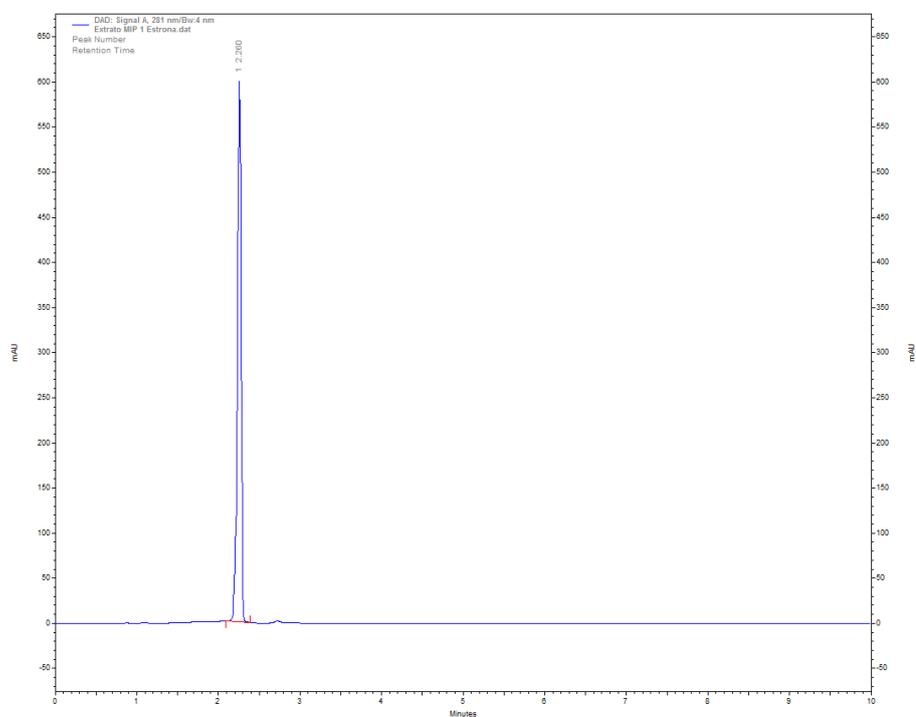


Figura 10: Cromatograma do extrato do MIP 1, estrona.

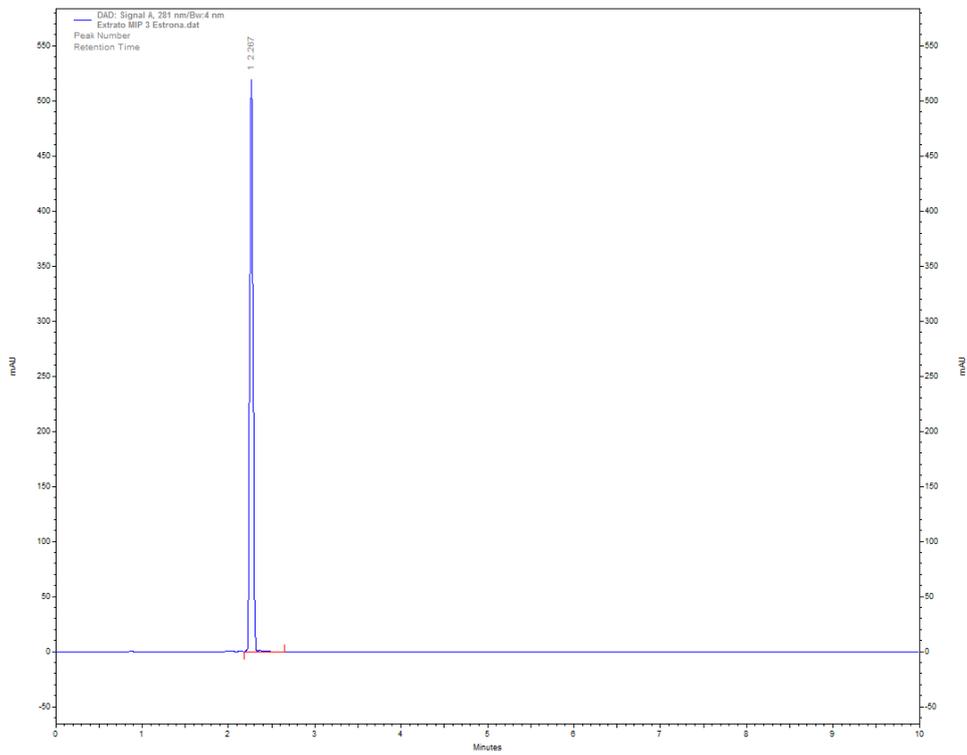


Figura 11: Cromatograma do extrato do MIP 4, estrona (após primeiro ciclo de sonicção).

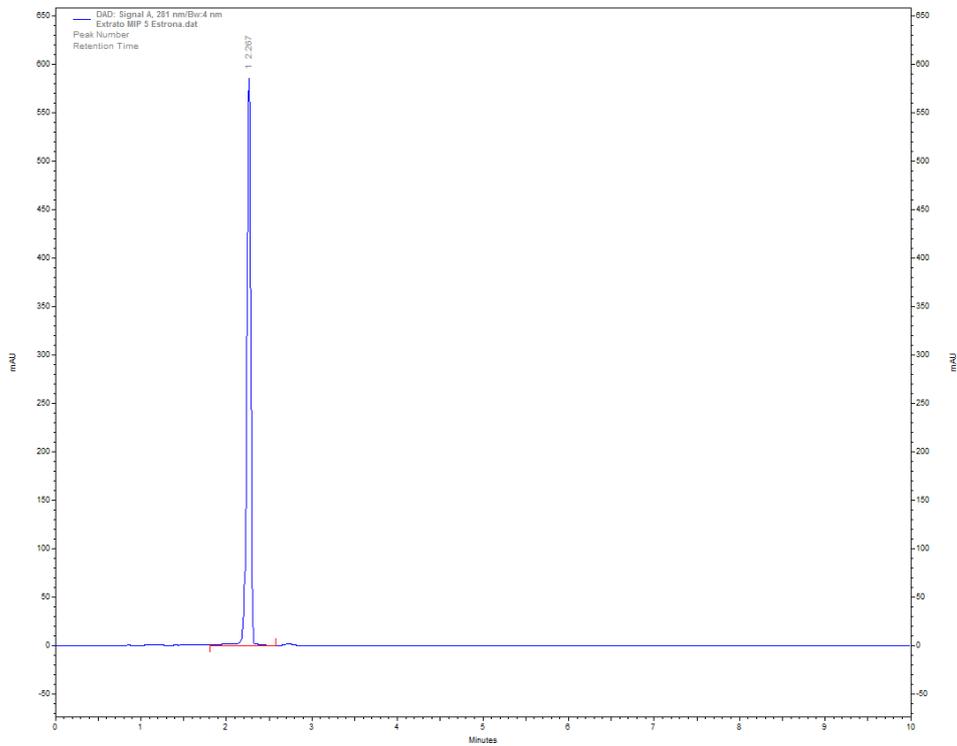


Figura 12: Cromatograma do extrato do MIP 4, estrona (após ciclos 2 e 3 de sonicção).

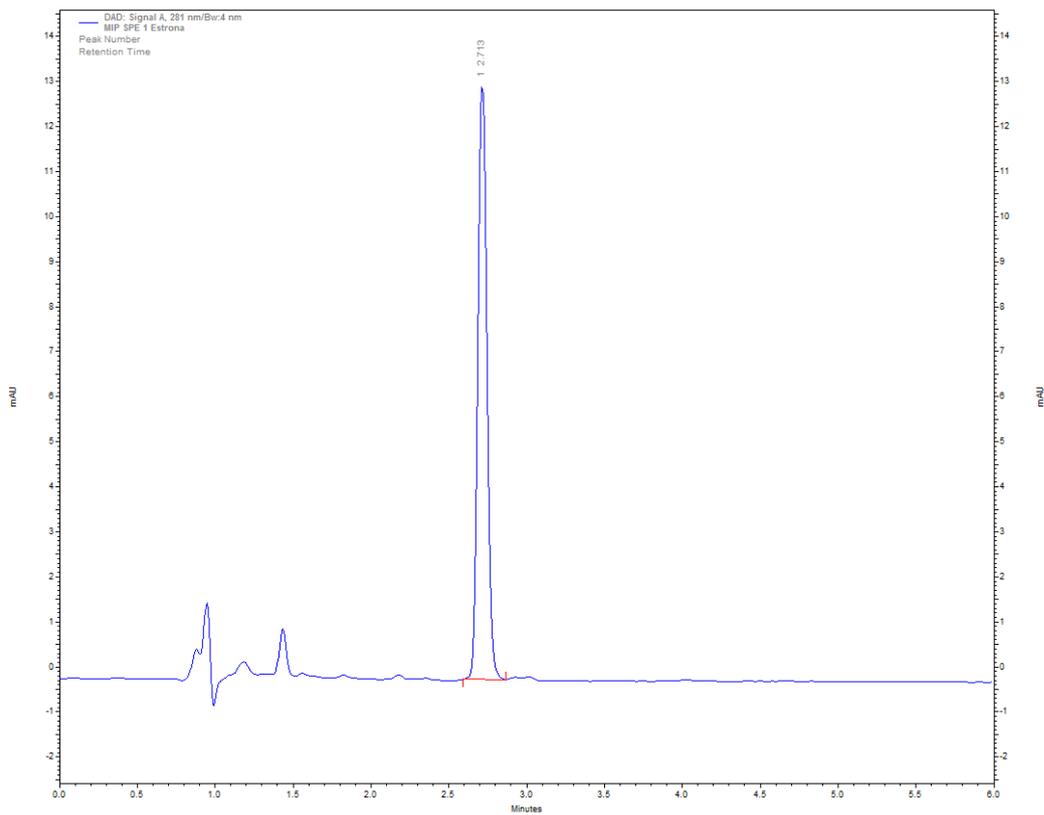


Figura 13: Cromatograma do extrato da SPE, MIP 1, estrona.

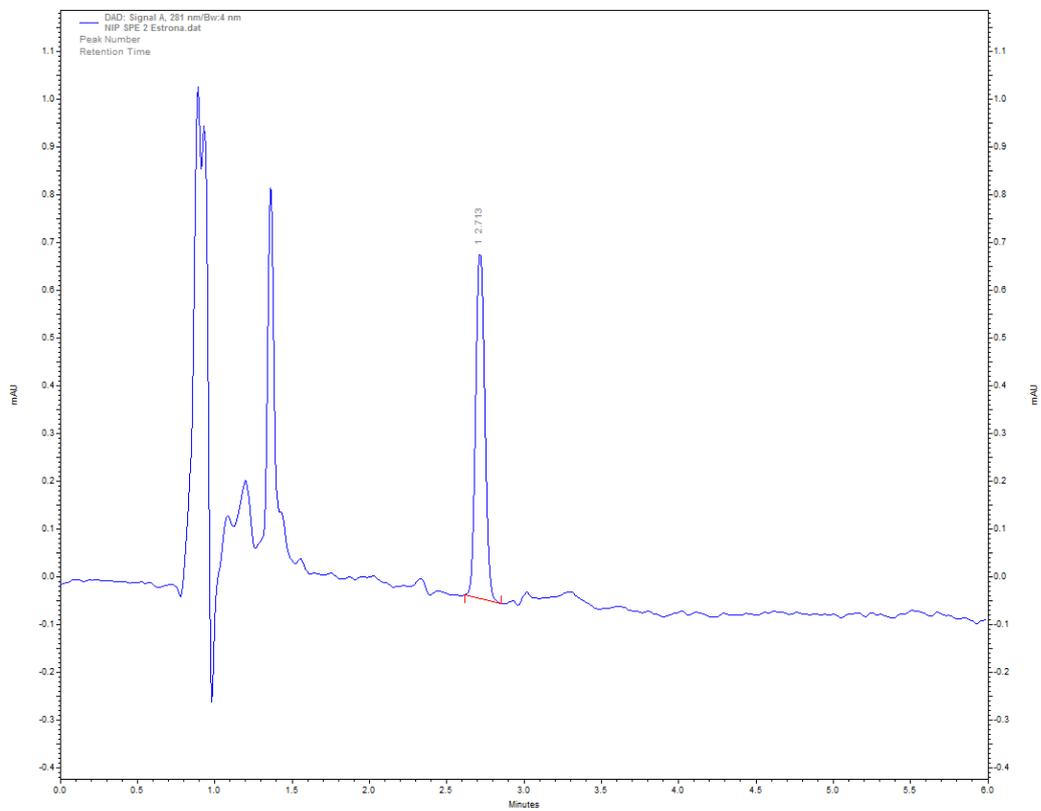


Figura 14: Cromatograma do extrato da SPE, NIP 1, estrona.

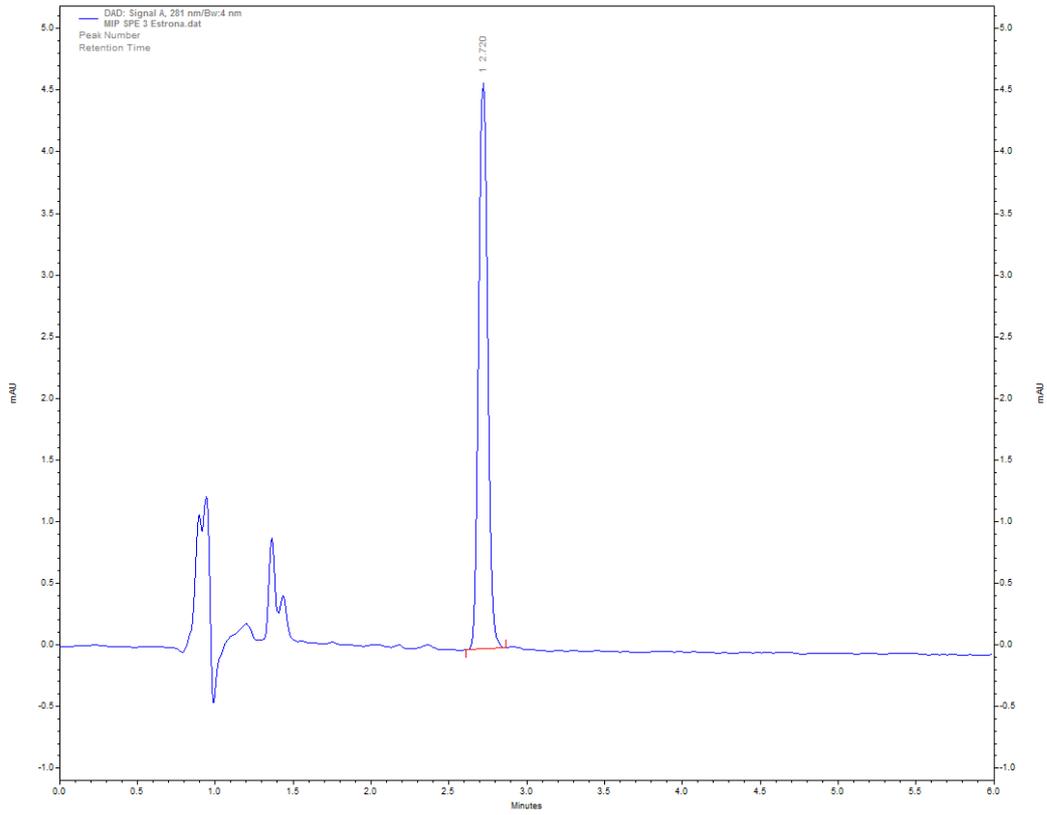


Figura 15: Cromatograma do extrato da SPE, MIP 4, estrona.

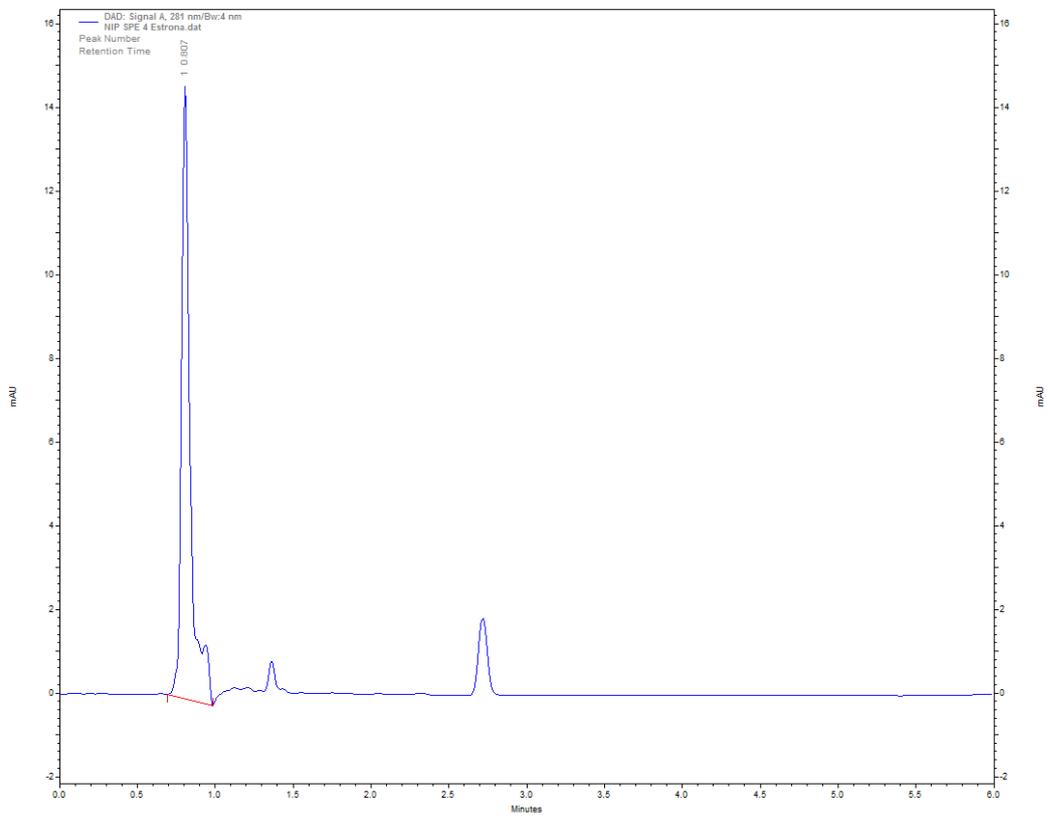


Figura 16: Cromatograma do extrato da SPE, NIP 4, estrona.