TMUP
97
2007

PEDRO JORGE SOUSA NOGUEIRA

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FIBRAS PARA MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA COM APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA SOL-GEL

U.PORTO
FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PORTO
2007

QD272
NOGp D
2007

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
D000119356

PEDRO JORGE SOUSA NOGUEIRA

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FIBRAS PARA MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA COM APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA SOL-GEL

U.PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala
Coloc. TMUP-97
N.º 9492
Depart. Química

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Para obtenção do grau de Mestre em Química

UNIVERSIDADE DO PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PORTO
2007

A Presidente do Júri
M. Agostinha Matos
18.4.2007

à Marisa

aos meus irmãos

Aos meus pais

com profunda gratidão...

Preâmbulo

Um mestrado, à semelhança de outros percursos na nossa vida, é frequentemente recheado de incertezas e dúvidas. O desafio de percorrer caminhos desconhecidos torna-se gigante aos nossos olhos e só nessa altura temos a noção da importância daqueles que nos rodeiam e que nos permitem ultrapassar todas as barreiras.

É com esta certeza de que, apesar de individual, um mestrado é no fundo um cruzamento de conhecimentos e ensinamentos, e neste sentido uma experiência partilhada. É também neste contexto que desejo expressar o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que com as suas palavras, ensinamentos, estímulos ou cobranças contribuíram para o nascimento desta dissertação.

Ao Engenheiro António Fernando Silva, fonte inesgotável de conhecimento e sapiência, pela excelência dos seus ensinamentos científicos durante a minha formação académica.

Ao Professor Manuel Azenha agradeço a confiança depositada em mim para encetar esta tarefa, bem como o seu incondicional apoio, disponibilidade, estímulo e paciência. Os seus ensinamentos e sugestões foram preciosos para o desenrolar do trabalho experimental.

À Dra. Sílvia de Denofre Campos do Centro de Ciências Exactas e Tecnológicas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Brasil - pela cedência das fibras de vidro modificado.

À Daniela Silva do CEMUP, pela disponibilidade e pelo profissionalismo sempre demonstrados em todas as sessões de SEM, ao Professor Paulo Marques e ao Paulo Moreira, pela cedência da fibra óptica.

À Ana, pela ajuda prestada e revisão cuidada da dissertação, um sincero obrigado.

Aos meus pais pela possibilidade que me deram para me formar. Este mestrado também lhes pertence. Pela paciência e dedicação que tiveram ao longo de toda a minha vida. À minha mãe pelo exemplo de força e coragem capaz de ultrapassar todas as dificuldades...

Aos meus irmãos, Nuno e Bruno pela presença de espírito em todos os momentos difíceis passados. À Inês e à Filipa pelo apoio, boa disposição e companhia.

Finalmente, um infinito agradecimento para a Marisa, pela paciência, dedicação, carinho, pela força nos momentos mais difíceis e acima de tudo pela presença constante na minha vida...

Resumo

A capacidade efectiva da microextracção em fase sólida (SPME) para análise de qualquer tipo de matriz, seja sólida, líquida ou gasosa em laboratório ou mesmo *in situ*, a sua simplicidade de execução e o seu baixo custo, tornam-na actualmente uma das mais promissoras técnicas de extracção.

Nos últimos anos tem-se assistido a um crescente interesse em desenvolver técnicas e processos de preparação de novas fibras que permitam melhorar e aumentar o campo de aplicação das mesmas. Neste contexto, a tecnologia sol gel tem sido frequentemente usada como método de revestir substratos, devido às suas bem conhecidas características.

Esta dissertação é dividida em dois estudos que possuem em comum a tecnologia sol-gel. O primeiro estudo visa a combinação da tecnologia sol-gel com as propriedades das partículas de sílica funcionalizada utilizando um substrato em liga de titânio. Com o segundo estudo pretendeu-se aplicar a impressão molecular ao revestimento de fibras utilizando um substrato de sílica fundida.

Relativamente à fibra com partículas de sílica incorporadas no revestimento de PDMS, pretendeu-se avaliar a influência de diferentes grupos funcionais à superfície das partículas (C_{18}, fenilo e ciclohexildiol), comparando as respectivas capacidades de extracção às de uma fibra revestida com partículas de sílica não funcionalizada. Os resultados mostraram que não há influência do grupo funcional, para o tempo de extracção utilizado.

Foi avaliada a relação entre a quantidade e homogeneidade de dimensões das partículas incorporadas no revestimento e a eficiência de extracção das fibras. Para tal, compararam-se as capacidades de extracção de fibras revestidas com os quatro tipos de partículas (C_{18}, fenilo e ciclohexildiol e sílica não funcionalizada) e da fibra revestida apenas com PDMS.

Verificou-se que a capacidade de extracção das fibras preparadas aumenta com a quantidade de revestimento PDMS retido na superfície do substrato, que por sua vez é influenciada pela quantidade e homogeneidade de tamanhos das partículas.

Foram obtidas maiores eficiências de extracção para as fibras com partículas de sílica não funcionalizada e de C_{18}. A estrutura das partículas de sílica funcionalizadas com os grupos fenilo e ciclohexildiol aparentam possuir carácter não molhável (*non wettability*) pelo

polímero líquido PDMS, o que poderá explicar a razão para que estas partículas não sejam cobertas com o PDMS e consequentemente retidas nas fibras.

O segundo estudo visou a aplicação, pela primeira vez, da impressão molecular com polimerização sol-gel à produção de fibras para SPME. Neste estudo, foi testada uma interface SPME-HPLC na extracção "*on-line*" com o sistema HPLC, sem no entanto ter sido conseguida a optimização para os substratos utilizados. Como consequência, foi necessário efectuar extracções "*off-line*".

Relativamente ao estudo de avaliação da eficiência das fibras preparadas, os resultados obtidos mostraram uma capacidade de extracção significativamente superior dos MIPs relativamente aos NIPs para a molécula alvo, L-Dopa (composto utilizado no tratamento da Doença de Parkinson).

O estudo de selectividade realizado para estas fibras mostrou ser inconclusivo, devido à insuficiência de dados experimentais, e portanto, estudos adicionais a nível de selectividade e enantioselectividade deverão ser efectuados de forma a verificar as potencialidades destas fibras em aplicações a amostras com matrizes mais complexas.

Abstract

Solid-phase microextraction (SPME) has an effective capacity for the analysis of any type of matrix, either solid, liquid or gaseous in laboratory or *in situ*. Its simplicity of execution and its low cost makes it, currently, one of the most promising techniques of extraction.

In recent years there has been a growing interest in developing techniques and processes of new fiber preparation that extends its field of application. In this context, sol-gel technology has been frequently used as a coating method, due to its well known characteristics.

This dissertation encompases two studies both using sol-gel technology. The first study aims the combination of sol-gel technology with functionalized silica particles properties, using at the same time, a titanium alloy substract. The second study, intend to apply the molecular impression to fiber coating using a fused silica substract.

Concerning the first study using the incorporated silica particles/PDMS blend fiber, its aim was to evaluate the influence of different functional groups at silica particles surface (C_{18}, phenyl and cyclohexyldiol), comparing their extraction efficiencies to a fiber coated with non functionalized silica particles. The results showed that there is no influence of the functional group, for the used time of extraction.

The relation between the amount of incorporated particles and its size homogeneity in the coating with the extraction efficiency of the fibers was evaluated. For such, the of a PDMS only fiber was compared to the extraction capacity of fibers coated with the four types of particles (C_{18}, phenyl, cyclohexyldiol and plane silica).

It was verified that the extraction capacity of the prepared fibers increased with the amount of PDMS coating restrained in the surface of the substract. This coating was, in turn, influenced by the particles size homogeneity. Still, greater extraction efficiencies of plane silica and C_{18} particles coated fibers were obtained. Possibly, the structure of the phenyl- and cyclohexyldiol- functionalised silica particles surface render them non-wettability by PDMS liquid, which would explain why these particles are not covered with PDMS and retained in the fibers.

The second study aimed the application, for the first time, of sol-gel polymerization molecular imprinting to SPME fibre production.

Previously, in this study, on-line SPME-HPLC interface was tested for the extraction of L-Dopa. However, optimization was not successful for the used substracts. Consequently, off-line SPME-HPLC was used in the following studies.

As for the evaluation of the extraction efficiency, the results obtained for the target molecule, L-Dopa (used in the treatment of Parkinson's disease) showed an extraction efficiency for MIPs significantly superior to NIPs. The selectivity study carried out for these fibres was inconclusive, due to insufficience of experimental data. Therefore, in order to evaluate the potencial of these fibres in applications to more complex samples matrices, additional studies testing selectivity and enantioselectivity are needed.

Índice geral

PREÂMBULO ---------- III

RESUMO ---------- V

ABSTRACT ---------- VII

ÍNDICE GERAL ---------- IX

ÍNDICE DE FIGURAS ---------- XIII

ÍNDICE DE TABELAS ---------- XV

ÍNDICE DE EQUAÇÕES ---------- XVII

LISTA DE ALGUMAS ABREVIATURAS ---------- XIX

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO ---------- 1

1.1 ENQUADRAMENTO DO ESTUDO ---------- 3
1.2 OBJECTIVOS ---------- 4
1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO ---------- 4
1.4 MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) ---------- 5
1.4.1 Processo de partição/adsorção ---------- 6
1.4.1.1 Termodinâmica do processo de partição ---------- 7
1.4.1.2 Cinética do processo de partição ---------- 10
1.4.2 Factores que afectam a SPME ---------- 11
1.4.2.1 Temperatura ---------- 11
1.4.2.2 Força iónica ---------- 11
1.4.2.3 pH de extracção ---------- 12
1.4.2.4 Tempo de extracção ---------- 12
1.4.2.5 Agitação da amostra ---------- 12
1.4.2.6 Volume de amostra e volume headspace Vs quantidade extraída ---------- 13
1.4.2.7 Revestimento ---------- 13
1.4.2.8 Desadsorção no sistema cromatográfico ---------- 14
1.4.3 Aplicações de SPME: vantagens e desvantagens ---------- 15
1.4.4 Revestimentos para SPME ---------- 17
1.4.4.1 *Revestimentos comerciais* ---------- 17
a) Revestimentos poliméricos homogéneos ---------- 18
b) Revestimentos poliméricos com partículas porosas incorporadas ---------- 19
1.4.4.2 Revestimentos em substratos metálicos ---------- 22
1.4.4.3 Revestimentos com fixação de partículas a substratos (metálicos e sílica fundida) ---------- 23
1.4.4.4 Outros tipos de fibras e revestimentos ---------- 24
1.5 APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA SOL-GEL A REVESTIMENTOS PARA SPME ---------- 26
1.5.1 O processo sol-gel ---------- 26
1.5.1.1 Hidrólise ---------- 28
1.5.1.2 Condensação ---------- 29
1.5.1.3 Gelificação ---------- 30
1.5.1.4 Maturação ---------- 32
1.5.1.5 Secagem ---------- 32
1.5.1.6 Densificação ---------- 33

1.5.2 Técnicas de revestimento de filmes sol-gel ---- 34
1.5.3 Fibras preparadas através da tecnologia sol-gel ---- 35
1.6 IMPRESSÃO MOLECULAR ---- 37
1.6.1 Introdução à impressão molecular ---- 37
1.6.2 Princípios gerais da impressão molecular ---- 38
1.6.2.1 Impressão covalente ---- 40
1.6.2.2 Impressão não covalente ---- 40
1.6.2.3 Impressão híbrida covalente/não covalente ---- 41
1.6.3 Factores que afectam a impressão molecular ---- 42
1.6.3.1 Molécula alvo ---- 42
1.6.3.2 Monómeros funcionais ---- 44
1.6.3.3 Agentes de entrelaçamento ---- 45
1.6.3.4 Solventes (ou agentes porogénicos) ---- 46
1.6.3.5 Efeito da temperatura ---- 47
1.6.4 Impressão molecular acrílica ---- 48
1.6.4.1 Exemplos de estudos actuais com impressão molecular acrílica ---- 51
1.6.5 Impressão molecular com polimerização sol-gel ---- 52
1.6.5.1 Impressão covalente ---- 54
1.6.5.2 Impressão não covalente ---- 55
1.6.5.3 Impressão híbrida covalente/não covalente ---- 56
1.7 REFERÊNCIAS ---- 57

CAPÍTULO 2-DESENVOLVIMENTO DE FIBRAS COM PARTÍCULAS DE SÍLICA FUNCIONALIZADA IMOBILIZADAS NUMA MATRIZ SOL-GEL ---- 61

2.1 INTRODUÇÃO ---- 63
2.2 SECÇÃO EXPERIMENTAL ---- 64
2.2.1 Material e reagentes ---- 64
2.2.1.1 Caracterização da fibra óptica ---- 65
2.2.1.2 Caracterização do fio em liga de titânio ---- 65
2.2.2 Metodologias ---- 65
2.2.2.1 Pré-tratamento do fio em liga de titânio e da fibra óptica ---- 65
2.2.2.2 Preparação das fibras ---- 66
2.2.2.3 Avaliação da capacidade de extracção por GC ---- 68
2.2.2.4 Microscopia electrónica de varrimento (SEM) ---- 69
2.2.2.5 Estudo das cinéticas de extracção de tolueno, 2-octanona e dimetilfenol ---- 70
2.2.2.6 Extracção multi-componente versus componente único ---- 70
2.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS ---- 71
2.3.1 Capacidade de extracção das fibras ---- 72
2.3.2 Microestrutura versus eficiência de extracção ---- 74
2.3.3 Cinética e mecanismo de extracção ---- 76
2.3.4 Repetibilidade e durabilidade ---- 78
2.4 CONCLUSÃO ---- 78
2.5 REFERÊNCIAS ---- 79

CAPÍTULO 3-DESENVOLVIMENTO DE FIBRAS COM REVESTIMENTO POR IMPRESSÃO MOLECULAR (MIPS) COM POLIMERIZAÇÃO SOL-GEL ---------- **81**

3.1 INTRODUÇÃO ---------- 83
3.2 L-DOPA COMO MOLÉCULA ALVO ---------- 85
3.3 SECÇÃO EXPERIMENTAL ---------- 86
3.3.1 Material e reagentes ---------- 86
3.3.2 Metodologias ---------- 87
3.3.2.1 Pré-tratamento das fibras ---------- 87
3.3.2.2 Estudo em titânio ---------- 87
3.3.2.3 Preparação da solução L-Dopa ---------- 88
3.3.2.4 Preparação de MIP's e NIP's ---------- 88
3.3.2.5 Limpeza dos MIP's ---------- 88
3.3.2.6 Revestimento das fibras ---------- 89
3.3.2.7 Optimização do método cromatográfico – HPLC ---------- 89
3.3.2.8 Optimização da interface SPME-HPLC ---------- 90
3.3.2.9 Extracção directa SPME-HPLC "off-line" ---------- 92
3.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS ---------- 93
3.4.1 Morfologia / Características físicas dos revestimentos ---------- 94
3.4.2 Processo de remoção da molécula alvo ---------- 96
3.4.3 Resposta linear do método de análise da L-Dopa ---------- 97
3.4.4 Estudo do desempenho dos MIPs ---------- 98
3.4.5 Estudo de selectividade ---------- 101
3.5 CONCLUSÃO ---------- 102
3.6 REFERÊNCIAS ---------- 103
CONSIDERAÇÕES FINAIS ---------- 105

APÊNDICE - PRINCÍPIOS GERAIS DAS TÉCNICAS INSTRUMENTAIS ANALÍTICAS ---------- **107**

A.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO REVESTIMENTO ---------- 109
A.1.1 Microscopia electrónica de varrimento (SEM) ---------- 109
A.1.1.1 Fundamentos teóricos ---------- 109
A.1.1.2 Funcionamento ---------- 110
A.2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ---------- 112
A.2.1 Cromatografia – considerações gerais ---------- 112
A.2.1.1 Velocidade de migração dos solutos ---------- 114
A.2.1.2 Eficiência da coluna cromatográfica ---------- 117
A.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ---------- 121
A.2.2.1 Instrumentação em HPLC ---------- 122
A.2.2.2 Aspectos práticos em HPLC ---------- 124
A.2.2.3 Escolha da fase estacionária e da fase móvel ---------- 125
A.2.3 Cromatografia gasosa ---------- 125
A.2.3.1 Instrumentação em GC ---------- 126
A.2.3.2 Aspectos práticos em CG ---------- 129
A.3 REFERÊNCIAS ---------- 130

Índice de figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 - Tipos de configurações utilizadas em SPME 5
Figura 1.2 - Processo de adsorção/desadsorção em SPME (headspace) associado a GC 6
Figura 1.3 - Tipos de extracção em SPME 7
Figura 1.4 - Exemplo de hidrólise ácida durante o processo sol-gel 28
Figura 1.5 - Exemplo de hidrólise alcalina durante o processo sol-gel 29
Figura 1.6 - Exemplo de condensação em meio ácido durante o processo sol-gel 30
Figura 1.7 - Exemplo de condensação em meio alcalino durante o processo sol-gel 30
Figura 1.8 - Gelificação em condições básicas 31
Figura 1.9 - Gelificação em condições ácidas 31
Figura 1.10 - Ilustração de revestimento de superfícies por flow-coating 34
Figura 1.11 - Ilustração de revestimento de superfícies por dip-coating 34
Figura 1.12 - Ligação do polímero PDMS à rede tridimensional durante a condensação 35
Figura 1.13 - Ligação do revestimento sol-gel à superfície da fibra 35
Figura 1.14 - Número de publicações por ano no campo da tecnologia de impressão molecular. 38
Figura 1.15 - Representação esquemática do processo de impressão molecular 39
Figura 1.16 - Comportamento teórico previsto para o gráfico de N versus % de molécula alvo 43
Figura 1.17 - Exemplo de um gráfico que representa a selectividade cromatográfica versus % molar de molécula alvo 44
Figura 1.18 - Exemplo de co-polimerização radicalar livre. 48
Figura 1.19 - Monómeros funcionais normalmente utilizados em impressão molecular acrílica 49
Figura 1.20 - Agentes de entrelaçamento normalmente utilizados em impressão molecular acrílica. 50
Figura 1.21 - Ilustração das diferentes aplicações da impressão molecular sol-gel 52
Figura 1.22 - Esquema representativo das etapas características da impressão molecular sol-gel covalente 54
Figura 1.23 - Esquema representativo das etapas características da impressão molecular sol-gel não covalente. 55
Figura 1.24 - Esquema representativo das etapas características da impressão molecular sol-gel híbrida 56

Capítulo 2

Figura 2.1 - Imagem da fibra óptica 65
Figura 2.2 - Ilustração representativa das diferentes fases de montagem de uma fibra para SPME 66
Figura 2.3 – Ilustração da incorporação das partículas 67
Figura 2.4 - Ilustração do revestimento por dip-coating 67
Figura 2.5 – Fotografia da montagem para extracção 68
Figura 2.6 – Ilustração das fases do procedimento 68
Figura 2.7 - Representação da montagem 69
Figura 2.8 – Fotografia do suporte 70
Figura 2.9 – Imagem obtida através de SEM de uma fibra em liga de titânio revestida com a mistura sol-gel com partículas de sílica 71
Figura 2.10 – Imagem obtida através de SEM das partículas de sílica funcionalizada com C_{18} após peneiração entre 45 e 75μm 72
Figura 2.11 – Gráfico comparativo da eficiência de extracção para as fibras estudadas 73
Figura 2.12 - Imagens SEM das fibras de titânio após o ciclo de extracções 74
Figura 2.13 – Gráfico comparativo da eficiência de extracção entre fibras com partículas de sílica não funcionalizada e uma fibra revestida com PDMS 75
Figura 2.14 – Imagem de uma gota líquida em equilíbrio com uma superfície horizontal. 75
Figura 2.15 – Perfis cinéticos obtidos para a extracção de tolueno, xileno, 2-octanona e dimetilfenol com uma fibra PDMS/partículas de sílica funcionalizada com C_{18} 76
Figura 2.16 – Curvas de calibração obtidas para a extracção de tolueno com uma fibra de PDMS/partículas de sílica funcionalizada com C_{18} 77

Capítulo 3

Figura 3.1 - Estrutura 3D da molécula L-Dopa 85
Figura 3.2 - Instrumento para produzir fibras de vidro modificado 87
Figura 3.3 - Fotografia do instrumento de HPLC utilizado no estudo 89
Figura 3.4 - Imagens da interface SPME-HPLC da Supelco 91
Figura 3.5 - Esquema dos componentes e da montagem da fibra óptica utilizada. 92
Figura 3.6 - Imagens por análise SEM de fibras com medição do diâmetro e análise elementar da fibra de vidro modificado 95
Figura 3.7 - Estudo da gama linear para a L-Dopa e metil-L-Dopa nas condições cromatográficas utilizadas 97
Figura 3.8 - Gráfico correspondente à avaliação da capacidade de extracção relativa para diferentes concentrações de L-Dopa para MIP_A, MIP_B, NIP_A e fibra óptica 99
Figura 3.9 - Gráfico correspondente à avaliação da capacidade de extracção de diferentes fibras numa solução L-Dopa 10ppm 99
Figura 3.10 - Gráfico correspondente à avaliação da capacidade de extracção numa solução L-Dopa 10ppm .. 100
Figura 3.11 - Gráfico correspondente à avaliação selectividade de diferentes fibras relativamente a dois analitos: L-Dopa e metil-L-Dopa. 102

Apêndice

Figura A.1 - Estrutura e funcionamento do SEM 110
Figura A.2 - Tipos de electrões emitidos em análise SEM 111
Figura A.3 - Progresso de uma separação de dois solutos numa coluna cromatográfica e respectivo cromatograma 113
Figura A.4 - Cromatograma mostrando as bandas correspondentes ao tempo morto (t_m) e ao tempo de retenção de um soluto (t_r) 115
Figura A.5 - Relação entre a resolução cromatográfica e a qualidade de separação de dois picos 118
Figura A.6 - Esquema ilustrativo da definição de prato teórico 119
Figura A.7 - Gráfico representativo dos efeitos da velocidade da fase móvel nos termos da equação de van Deemter 121
Figura A.8 - Representação esquemática dos diferentes componentes de um sistema HPLC com bomba quaternária 122
Figura A.9 - Esquema de um exemplo da formação de uma fase estacionária 124
Figura A.10 - Efeito do fluxo da fase-móvel na altura do prato teórico para cromatografia líquida e gasosa ... 126
Figura A.11 - Esquema representativo dos componentes de um cromatórafo gasoso 127

Índice de tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 - Comparação entre as várias técnicas de extracção 16
Tabela 1.2 - Revestimentos comerciais disponíveis (classificação em termos de polaridade) 18
Tabela 1.3 – Características físicas das partículas de Divinilbenzeno (DVB), Carboxen 1006 e Templated Resin (TR – 100) 20
Tabela 1.4 - Vantagens e desvantagens da impressão covalente vs impressão não covalente 41
Tabela 1.5 – Lista de alguns precursores utilizados em impressão molecular sol-gel 53

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Caracterização da fibra óptica 65
Tabela 2.2 – Características do fio em liga de titânio 65

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 – Propriedades físico-químicas da L-Dopa 85
Tabela 3.2 – Caracterização da fibra de vidro modificado 87
Tabela 3.3 - Características das colunas comerciais de C_{18} e C_8 89
Tabela 3.4 – Estimativa das espessuras das fibras utilizadas na análise SEM 96

APÊNDICE

Tabela A.1 – Resumo de características da cromatografia líquida, gasosa e com fluídos supercríticos 112

Índice de equações

CAPÍTULO 1

EQUAÇÃO 1.1 7
EQUAÇÃO 1.2 8
EQUAÇÃO 1.3 8
EQUAÇÃO 1.4 8
EQUAÇÃO 1.5 8
EQUAÇÃO 1.6 8
EQUAÇÃO 1.7 9
EQUAÇÃO 1.8 9
EQUAÇÃO 1.9 9
EQUAÇÃO 1.10 10
EQUAÇÃO 1.11 10

APÊNDICE

EQUAÇÃO A.1 114
EQUAÇÃO A.2 115
EQUAÇÃO A.3 115
EQUAÇÃO A.4 116
EQUAÇÃO A.5 116
EQUAÇÃO A.6 116
EQUAÇÃO A.7 116
EQUAÇÃO A.8 117
EQUAÇÃO A.9 118
EQUAÇÃO A.10 118
EQUAÇÃO A.11 119
EQUAÇÃO A.12 119
EQUAÇÃO A.13 119
EQUAÇÃO A.14 120
EQUAÇÃO A.15 120
EQUAÇÃO A.16 120
EQUAÇÃO A.17 120
EQUAÇÃO A.18 125
EQUAÇÃO A.19 125

Lista de algumas abreviaturas

Acrónimo	*Designação*
SPME	*Solid-phase microextraction* (Microextracção em fase sólida)
SPE	*Solid-phase extraction* (Extracção em fase sólida)
LPME	*Liquid-phase microextraction* (microextracção em fase líquida)
LLE	*Liquid-liquid extraction* (extracção líquido-líquido)
PAH's	*Polycyclic Aromatic Hidrocarbons* (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos)
PCBs	*Polychlorinated Biphenyls* (Bifenilos Policlorinados)
GC	*Gas Chromatography* (Cromatografia gasosa)
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
VOC's	*Volatile Organic Compounds* (Compostos Orgânicos Voláteis)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PA	Poliacrilato
DVB	Divinilbenzeno
CW	Carbowax
MTES	Metiltrietoxisilano
TEOS	Tetraetoxisilano
TR	*Template Resin*
TMOS	Tetrametoxisilano
MTMOS	Metiltrimetoxisilano
PTMOS	Feniltrimetoxisilano
C_8-MOS	C_8-Metoxisilano
PEG	Polietileno Glicol
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilxileno, Xileno
BTX	Benzeno, Tolueno, Xileno
SFC	*Superfluid chromatography* (cromatografia por fluídos supercríticos)
CE	*Capillary Electrophoresis* (electroforese capilar)
PVA	*Poly(vinyl alcohol)* (álcool polivinílico)
PANI	Polianilina
PPY	*Polipyrrole* (polipirrole)
ADS	*Alquildiol Sílica* (sílica alquil-diol)
XDS	Sílica de permuta iónica com grupos diol
MIPs	*Molecularly Imprinted Polimers* (polímeros de impressão molecular)
NIPs	*Non Imprinted Polimers* (polímeros não impressos)
SEM	*Scanning Electronic Microscopy* (microscopia electrónica de varrimento)
C_{18}	Grupo funcional de fórmula - $C_{18}H_{37}$
FID	*Flame Ionization Detector* (detector de ionização por chama)
RAMs	*Restricted access material* (materiais de acesso restricto)
DCCAs	*Drying control chemical additives* (aditivos químicos de controlo de secagem)
EC	*Electrochemical Control* (controlo electroquímico)
IL	*Ionic Liquids* (líquidos iónicos)
DP	Doença de Parkinson
TFA	Ácido trifluoracético

Recorreu-se frequentemente neste estudo aos múltiplos e submúltiplos das unidades fundamentais do Sistema Internacional (SI) tendo-se igualmente feito uso de algumas unidades que não sendo unidades do SI são de utilização corrente (hora: h; minuto: min).

Capítulo 1

1 Introdução

Sumário

1.1. ENQUADRAMENTO DO ESTUDO
1.2. OBJECTIVOS
1.3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO
1.4. MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)
1.5. APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA SOL-GEL A REVESTIMENTOS PARA SPME
1.6. IMPRESSÃO MOLECULAR
1.7. REFERÊNCIAS

1.1 Enquadramento do estudo

A química analítica caracteriza-se por ser uma área transversal à maior parte dos campos de aplicação da química, desde a biotecnologia, a indústria química, a ciência dos materiais, a química dos alimentos e a química ambiental.

No sentido de recolher a informação quantitativa e qualitativa desejada, o químico analítico tem necessidade de recorrer a um conjunto de procedimentos e de técnicas pré-estabelecidos – o método analítico. O método analítico é desenvolvido de uma forma genérica em 4 etapas, nomeadamente amostragem, preparação da amostra (que poderá incluir pré-tratamento e tratamento propriamente dito), análise e por fim quantificação.

No que diz respeito à preparação da amostra, e em particular quando se procede ao seu tratamento, a técnica de extracção assume um papel importante, nomeadamente pela possibilidade de transferir e pré-concentrar vestígios de espécies orgânicas ou inorgânicas para matrizes simplificadas e mais adequadas aos métodos de análise, qualquer que seja o estado físico das amostras.

Apesar das várias técnicas conhecidas para este fim serem de utilização abrangente, o uso de grandes volumes de solventes orgânicos e o seu custo relativamente elevado são factores limitativos da sua aplicação.

Com o avanço no desenvolvimento das técnicas de extracção, surge um trabalho publicado em 1990 por Pawliszyn e Arthur[1], no qual é apresentado um método capaz de incorporar extracção, concentração e introdução de amostra numa única etapa, proporcionando resultados com elevadas sensibilidade e reprodutibilidade, permitindo ao mesmo tempo prescindir de solventes orgânicos tóxicos para o ambiente[2] – a microextracção em fase sólida (SPME).

Adicionalmente, a capacidade efectiva desta técnica para análise de qualquer tipo de matriz, seja sólida, líquida ou gasosa, em laboratório ou mesmo *in situ*, a sua simplicidade de execução e o seu baixo custo, tornam a SPME uma das técnicas de extracção actuais mais promissoras[3].

Como será detalhadamente referido mais adiante, apesar de existirem comercialmente diversas fibras para SPME com as mais variadas aplicações em trabalhos de rotina, estas apresentam importantes desvantagens, nomeadamente a nível de resistência térmica, mecânica e química.

Pretende-se com o desenvolvimento de novas fibras abrir outras perspectivas e aplicações da técnica de SPME, nomeadamente ao nível da selectividade, robustez mecânica e estabilidade térmica.

Neste contexto, foi realizado este estudo, no qual se pretendeu desenvolver metodologias inovadoras para a preparação de fibras para SPME com capacidades de extracção e selectividade superiores às já existentes.

1.2 Objectivos

O presente trabalho tem dois objectivos principais: o primeiro visa a preparação de fibras com partículas de sílica funcionalizada incorporadas num revestimento sol-gel em substrato de liga de titânio, que apresentasse vantagens a nível da selectividade, estabilidade mecânica, térmica e a solventes orgânicos; o segundo objectivo consiste na utilização da tecnologia sol-gel na produção de fibras revestidas com um polímero preparado por intermédio da tecnologia de impressão molecular, os designados MIPs (acrónimo do inglês *Molecularly Imprinted Polimers*).

1.3 Organização da dissertação

Esta dissertação encontra-se estruturada em 3 capítulos. O primeiro capítulo é reservado ao enquadramento do estudo, à apresentação dos objectivos, aos princípios fundamentais que regem a técnica de SPME, à demonstração de como a tecnologia sol gel é aplicada à SPME e à introdução dos conceitos principais inerentes à impressão molecular.

O segundo capítulo descreve o desenvolvimento de um trabalho com vista à preparação de fibras com partículas de sílica funcionalizada imobilizadas numa matriz sol gel, com a respectiva apresentação e discussão dos resultados obtidos.

O terceiro capítulo apresenta uma nova forma de preparação de fibras aplicadas a SPME, desta vez aplicando a impressão molecular a um revestimento à base de sol gel. São também apresentados os resultados e as conclusões derivadas deste estudo.

Por fim, apresentar-se-á um breve comentário que resume a dissertação e faz referências a estudos subsequentes que poderão ser realizados no contexto do presente trabalho.

No final de cada capítulo, é disponibilizada uma lista de referências.

A dissertação inclui ainda um apêndice no qual se aborda as técnicas instrumentais utilizadas, bem como as respectivas referências.

1.4 Microextracção em fase sólida (SPME)

A microextracção é definida como uma técnica em que o volume da fase extractora é muito pequeno relativamente ao volume da amostra e caracteriza-se por uma extracção não exaustiva, ou seja, apenas é extraída uma fracção de analito[4,5].

Em particular, em SPME, uma pequena quantidade de fase extractora imobilizada num suporte sólido é colocada em contacto com a matriz da amostra, durante um período de tempo previamente estabelecido. Para um período de tempo suficientemente longo estabelece-se o equilíbrio entre a matriz da amostra e a fase extractora[6]. Nesta condição, a quantidade de analito extraída aumenta com o aumento da afinidade que o analito tem para a fase extractora, relativamente à matriz da amostra e é independente do tempo de exposição a que a fibra será sujeita, *a posteriori*[4,5].

Inicialmente desenvolvida para aplicação em análise de compostos relativamente voláteis, a SPME apresenta actualmente grande aceitação para compostos semi-voláteis como PAHs, PCBs, e para o fenol e seus derivados[6]. Presentemente, a técnica de SPME é implementada em várias configurações (figura 1.1), no entanto, apenas a configuração em fibra revestida será abordada neste estudo.

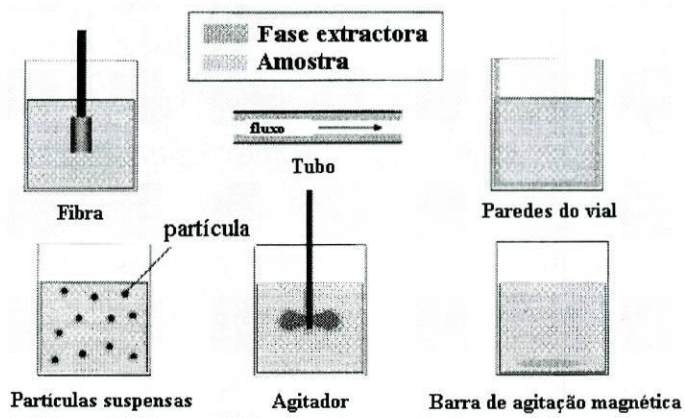


***Figura 1.1** – Tipos de configurações utilizadas em SPME*[4]

A implementação da técnica SPME através da configuração em fibra revestida utiliza geralmente uma fibra de sílica fundida revestida com uma fase estacionária polimérica[8] e envolve o transporte dos analitos desde a matriz da amostra até ao revestimento, o qual se inicia assim que a fibra revestida se encontra em contacto com a amostra[6]. Após a adsorção dos analitos terminar, a fase extractora é submetida a elevadas temperaturas no interior do GC (cromatógrafo gasoso), onde ocorre a desadsorção dos analitos – figura 1.2. No caso desta

técnica estar acoplada a HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), os analitos serão desadsorvidos por eluição (usando solventes orgânicos)[9]. Existem mais tipos de acoplamento a outras interfaces que serão referidos posteriormente.

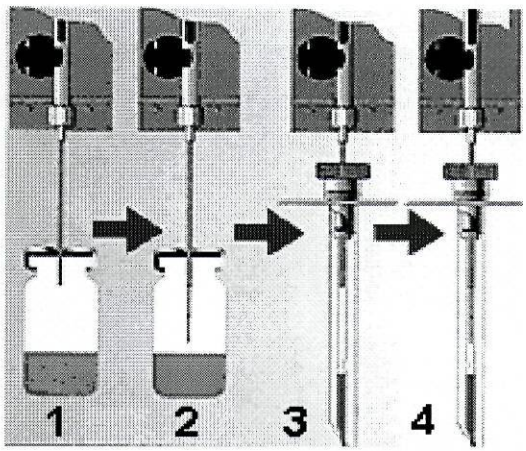


***Figura 1.2** - Processo de adsorção/desadsorção em SPME (headspace) associado a GC – 1) inserção da agulha no frasco de amostra vedado; 2) exposição da fibra no headspace (adsorção); inserção da agulha no injector do GC; 4) exposição da fibra no injector do GC (desadsorção)[6].*

1.4.1 Processo de partição/adsorção

As fibras actualmente disponíveis podem ser divididas em dois tipos distintos no que respeita às características físicas dos seus revestimentos: líquidos ou sólidos. Como exemplos, poderão ser referidos os revestimentos líquidos de PDMS (polidimetilsiloxano) e de PA (poliacrilato) e os revestimentos sólidos de PDMS/DVB (divinilbenzeno), Carbowax/DVB, Carbowax/TR (*temple resin*) e de carboxen, em que a fase extractora principal é um sólido poroso. As características destes revestimentos irão ser descritas com mais detalhe na secção 1.4.4.

A principal diferença destes dois tipos de revestimento baseia-se no tipo de mecanismo subjacente ao processo de extracção. Se por um lado um revestimento líquido extrai analitos via absorção (e portanto refere-se a um processo de partição), por outro, um revestimento sólido extrai via adsorção (processo de superfície).

O mecanismo de absorção envolve a dissolução do analito no revestimento e a difusão para uma zona mais interior durante o processo de extracção, enquanto que a adsorção é caracterizada por o analito permanecer à superfície do revestimento[10].

No contexto deste estudo, apenas será abordado o mecanismo de partição, pelo que de seguida se apresentam algumas considerações relativas à termodinâmica e cinética deste tipo de processo.

Tal como supracitado, no processo de partição (ou seja, pressupondo um revestimento líquido) o analito distribui-se entre todas as fases do sistema e a concentração deste, em cada uma das fases, está dependente da sua afinidade para cada uma delas e dos seus volumes. Quando se introduz uma nova fase numa amostra homogénea, os analitos deslocam-se no sentido da nova fase introduzida até se atingir uma concentração de equilíbrio. A quantidade inicial do analito, n_0, presente na amostra será igual à soma das quantidades individuais do analito presente em todas as fases do sistema (lei da conservação de massa):

$$n_0 = n_e + n_a + n_1 + n_2 + \ldots$$

Equação 1.1

Nesta equação, n_e corresponde à massa de analito presente na fase extractora, n_a corresponde à quantidade presente na amostra, enquanto que n_1, n_2,... refere-se às quantidades noutras fases eventualmente presentes[4].

1.4.1.1 Termodinâmica do processo de partição

A extracção directa e a extracção por *headspace* são os dois tipos de extracção geralmente utilizados em SPME para amostras líquidas (figura 1.3). As considerações termodinâmicas seguintes referem-se a este tipo de amostras.

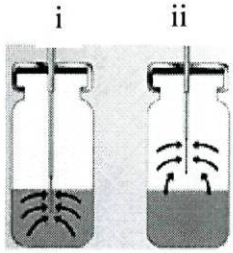


***Figura 1.3** - Tipos de extracção em SPME*
(i – extracção directa; ii – extracção em headspace)

Na extracção directa e para amostras líquidas, a fibra revestida é imersa na amostra e os analitos são transportados directamente desde a matriz da amostra até à fase extractora (revestimento). Neste processo, e de modo a aumentar a velocidade de extracção, é necessário recorrer à agitação da amostra. Termodinamicamente, neste tipo de extracção, apenas se

considera um sistema composto pela amostra e pela fase extractora (assume-se a capacidade *headspace* desprezável) e portanto a equação anterior resume-se a:

$$n_0 = n_a + n_e$$

Equação 1.2

em termos de concentrações:

$$C_0 V_a = C_e^{\infty} V_e + C_a^{\infty} V_a$$

Equação 1.3

onde C_a^{∞} e C_e^{∞} designam respectivamente as concentrações de equilíbrio na amostra e na fase extractora, V_a e V_e os volumes da amostra e da fase extractora e C_0 a concentração inicial na amostra. Uma vez que a constante de distribuição é definida por

$K_{ae} = \frac{C_e^{\infty}}{C_a^{\infty}}$, a equação 1.3 pode ser rearranjada da seguinte forma:

$$C_0 V_a = K_{ae} C_a^{\infty} V_e + C_a^{\infty} V_a$$

Equação 1.4

e multiplicando ambos os termos da equação por $K_{ae}V_e$, obtém-se

$$K_{ae} V_e C_0 V_a = K_{ae} V_e K_{ae} C_a^{\infty} V_e + K_{ae} V_e C_a^{\infty} V_a$$

$$K_{ae} V_e C_0 V_a = n_e^{\infty} (K_{ae} V_e + V_a)$$

Equação 1.5

Portanto, no equilíbrio, a quantidade extraída é:

$$n_e^{\infty} = \frac{K_{ae} V_e C_0 V_a}{K_{ae} V_e + V_a}$$

Equação 1.6

Da equação 1.6, se $V_a \gg K_{ae}V_e$, então o termo V_a é cancelado e a quantidade extraída no equilíbrio é dada por[4]:

$$n_e^{\infty} = K_{ae} V_e C_0$$

Equação 1.7

No entanto, as amostras possuem tipicamente sistemas mais complexos do que o sistema com apenas duas fases. Existem normalmente, durante o processo de extracção sistemas multi-fase com potencial para agirem como uma fase separadora descontínua entre a matriz da amostra e o revestimento, como é o caso da fase *headspace*.

Se esta fase apresenta baixa afinidade para o analito, o processo de extracção não é perturbado de uma forma significativa. Pelo contrário, um composto com afinidade relativamente à fase *headspace*, pode apresentar uma concentração significativa nesta fase[4].

Quando se considera o *headspace* como uma fase de separação com afinidade para o analito, a equação de balanço de massa no equilíbrio é a seguinte:

$$C_0 V_a = C_e^{\infty} V_e + C_a^{\infty} V_a + C_h^{\infty} V_h$$

Equação 1.8

Neste caso, os termos C_h^{∞} e V_h referem-se respectivamente à concentração de equilíbrio e ao volume de *headspace*. Fazendo uso do mesmo desenvolvimento matemático da discussão anterior, obtém-se:

$$n_e^{\infty} = \frac{K_{eh} K_{ha} V_e C_0 V_a}{K_{eh} K_{ha} V_e + K_{ha} V_h + V_a}$$

Equação 1.9

onde K_{eh} corresponde ao coeficiente de partição fase extractora/*headspace*, K_{ha} é a constante de Henry para o analito e $K_{eh}.K_{ha} = K_{ae}$. Analisando a última relação, é possível verificar que quando o volume da amostra é muito superior a $K_{eh}K_{ha}V_e + K_{ha}V_h$, a extracção é independente quer do volume da amostra, quer do volume *headspace*[4].

Por fim, a maior vantagem associada à extracção em *headspace* consiste na possibilidade desta permitir proteger a fibra revestida da agressão por parte de interferentes com elevado peso molecular, ou mesmo por parte de outros interferentes não voláteis presentes na matriz da amostra. Dado que os analitos são primeiramente transportados através da fase gasosa, o

contacto entre os componentes não voláteis e o revestimento é evitado e determinadas propriedades da matriz, como por exemplo o pH, podem ser alteradas[7].

1.4.1.2 Cinética do processo de partição

De acordo com Ulrich[11], o tempo de equilíbrio (t_e) para a extracção directa é dado pela relação:

$$t_e = 3.\frac{\delta K_{ae}(r_0 - r_i)}{D_a}$$

Equação 1.10

em que δ corresponde à espessura de uma camada fronteira hipotética sem agitação, r_0 e r_i correspondem respectivamente, ao raio externo e interno do revestimento e D_a corresponde ao coeficiente de difusão do analito na amostra. Desta relação, verifica-se que o tempo de extracção é aumentado com um elevado K_{ae}, com uma maior espessura do revestimento (r_0 - r_i) e com um menor coeficiente de difusão do analito na amostra.

Por outro lado, uma agitação mais eficaz irá diminuir o tempo de extracção (diminuição do factor δ na equação 1.10) por redução da "zona de depleção" presente junto à fibra (como resultado de uma barreira de fluído causada pelos baixos coeficientes de difusão de analitos) em amostras líquidas.

Para amostras gasosas, no entanto, a agitação deixa de ser um procedimento necessário, uma vez que a convecção natural do ar é suficiente para facilitar um equilíbrio relativamente rápido[7]. A agitação da amostra irá ser discutida com mais detalhe na secção 1.4.2.5.

No que se refere à extracção em *headspace*, a relação dada pela equação 1.10 é apenas válida se o sistema estiver sob uma agitação perfeita, porém, se tal não acontecer é necessário ter em conta algumas variáveis adicionais obtendo-se o seguinte modelo:

$$t_e = 1{,}8.\left(\frac{L_h}{K_{ah}.\left(D_h + 2\times10^{-5}NR^2\right)} + \frac{L_a}{1{,}6.\left(D_a + 0{,}03NR^2\right)}\right).K_{ae}L_e$$

Equação 1.11

em que L_e, L_h e L_a designam respectivamente as espessuras do revestimento, do *headspace* e da fase aquosa, N designa a velocidade de revolução da barra magnética, R o raio da barra magnética e finalmente, D_h corresponde ao coeficiente de difusão do analito no *headspace*[11].

Por último, é importante realçar que num método quantitativo, a condição de equilíbrio não é um pré-requisito, ou seja, é possível definir um tempo de extracção inferior ao tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio (mantendo o tempo de extracção constante para um conjunto de experiências relacionadas) obtendo-se igualmente uma relação linear entre a concentração do analito e a quantidade extraída.

Foram referidos alguns dos aspectos teóricos que afectam a técnica de SPME, no entanto, há a considerar os factores experimentais. Estes, serão abordados de seguida.

1.4.2 Factores que afectam a SPME

1.4.2.1 Temperatura

A temperatura de extracção é um dos factores mais importantes a optimizar em SPME. Com efeito, na extracção directa, o aumento de temperatura provoca um aumento dos coeficientes de difusão e consequentemente, a velocidade de extracção será maior[11].

Na extracção em *headspace*, a variação da temperatura tem dois efeitos opostos: se por um lado um aumento de temperatura provoca um aumento nos coeficientes de difusão (possibilitando que os analitos possam deslocar-se mais rapidamente desde a matriz até o *headspace*[7]), diminuindo o tempo necessário para atingir o equilíbrio[4], por outro, os coeficientes de distribuição revestimento/amostra diminuem, resultando na diminuição da quantidade de analito extraída no equilíbrio[7].

Do referido, dada a dificuldade em ajustar ambos os efeitos, resulta que a temperatura óptima de extracção deve apenas ser determinada realizando várias experiências a diferentes temperaturas.

1.4.2.2 Força iónica

Geralmente, uma extracção é favorecida pela adição de um sal devido ao fenómeno de *salting out*, no qual se verifica a formação de esferas de hidratação por parte das moléculas de água em redor das moléculas do sal iónico (solvatação). Estas esferas de hidratação, ao reduzirem a concentração do solvente disponível para solvatar as moléculas de analito, originam o aumento do K_{ae} e consequentemente o aumento da eficiência da extracção[4]. Por

outro lado, após atingido um limite de concentração, as moléculas polares podem participar em interacções electrostáticas com iões do sal em solução, originando o aumento em afinidade da matriz para com os analitos e portanto uma diminuição do K_{ae} (diminuição da capacidade de extracção)[4].

1.4.2.3 pH de extracção

O pH da amostra é um factor de grande importância em microextracção, sendo particularmente crítico no caso da extracção directa, na medida em que há a possibilidade de danificar a fibra.

Para analitos possuidores de grupos funcionais dependentes do pH, a extracção é mais favorecida quando os analitos se encontram na sua forma não dissociada, pelo que se deverá fazer uso de soluções tampão de modo a proporcionar um pH tão constante quanto possível[4].

1.4.2.4 Tempo de extracção

Tal como foi referido na secção 1.4.1.2, quando se procede à extracção no equilíbrio, o tempo de extracção ideal será aquele a partir do qual não é verificado um aumento das áreas dos picos. No entanto, é possível quantificar o analito presente numa amostra através de uma calibração adequada e de uma utilização rigorosa do mesmo tempo de extracção para cada uma das determinações.

Quando o tempo de extracção não coincide com o tempo de equilíbrio, o tempo de extracção deverá ser suficiente para que a partição dos analitos para a fase extractora ocorra em extensão quantificável[11].

1.4.2.5 Agitação da amostra

As condições de agitação a que a amostra está sujeita determinam o tempo de equilíbrio em amostras aquosas, ou seja, a difusão dos analitos até à fibra é facilitada e é tanto mais efectiva quanto maiores forem os coeficientes de difusão dos analitos[3].

Por outro lado, quando se procede a uma extracção, o grau de agitação influencia as dimensões da camada fronteira que rodeia a fase extractora. À medida que a fase extractora remove o analito da amostra, a quantidade de analito irá esgotar-se na vizinhança imediata da

fase extractora e o tamanho da camada de ligação torna-se limitante em termos de tempo de extracção. Constata-se assim, que a redução do tamanho da camada de ligação, e consequentemente, a velocidade de extracção são favorecidas com a utilização de uma agitação eficiente[4].

Apesar da existência de inúmeras técnicas de agitação em SPME como por exemplo, vórtex (vaso em movimento circular rápido), movimento de fibra ou sonificação, é a agitação magnética a que apresenta maior aceitação actualmente, devido à sua disponibilidade em laboratórios analíticos e também à facilidade com que pode ser utilizada em diferentes formas de amostragem[3].

1.4.2.6 Volume de amostra e volume headspace Vs quantidade extraída

De acordo com as considerações termodinâmicas acima referidas, a quantidade de analito extraída no equilíbrio é directamente proporcional ao volume de amostra, até um limite estabelecido por $10K_{ea}V_e$ (K_{ea} é a constante de distribuição fase extractora/amostra).

No entanto, na extracção *headspace* a situação torna-se mais complexa devido ao sistema ser constituído por três fases, e por isso, o volume de *headspace* ter de ser invariavelmente pequeno para analitos altamente voláteis. Por outro lado, a cinética de extracção *headspace* não proporciona uma explicação para a influência do volume de amostra e do volume *headspace* no tempo de extracção. É sabido, porém, que a capacidade do *headspace* deverá exceder a capacidade da fibra em cerca de 20 vezes para uma extracção rápida ($K_{ha}V_h > 20K_{ea}V_e$)[11].

1.4.2.7 Revestimento

No presente estudo, o revestimento e, mais concretamente, a selectividade do revestimento de fibras para utilização em SPME assume-se como o parâmetro de maior relevância. A selectividade apresenta dois significados dependendo da capacidade de um determinado sistema para discriminar um alvo (analito) relativamente a outros analitos, ou relativamente a interferentes.

Quando a capacidade para discriminar é elevada, então a selectividade descreve a probabilidade de um sinal representar o analito alvo e não um interferente. Por outro lado, como no caso da extracção em que o grau de selectividade é baixo, o que se espera é que a

separação de analitos e interferentes nunca seja completa. Neste último caso, a selectividade deve ser descrita pela razão entre a concentração relativa de analito e de interferentes nas duas fases[12].

1.4.2.8 Desorção no sistema cromatográfico

a) Cromatografia Gasosa (GC)

A SPME pode facilmente ser acoplada a um sistema GC, uma vez que o injector do cromatógrafo gasoso pode ser utilizado para a desadsorção térmica dos analitos. No injector, quando a temperatura é aumentada, a afinidade dos analitos relativamente à fibra é diminuída e estes são desadsorvidos. Uma desadsorção térmica eficiente do analito no sistema GC é dependente da volatilidade do analito, da espessura do revestimento, da profundidade de injecção, da temperatura do injector, do tempo de exposição e do diâmetro do orifício de inserção no injector (*liner*)[13].

Assim, as condições cromatográficas devem estabelecer uma temperatura tão elevada quanto possível (sem prejuízo para o revestimento da fibra) e consequentemente um tempo de desadsorção mais curto (para que os efeitos de memória sejam eliminados) e um diâmetro mínimo do orifício de inserção no injector.

Geralmente, é escolhida a temperatura máxima de estabilidade do revestimento da fibra, no entanto, para que se evite o alargamento de pico, a temperatura inicial deverá ser consideravelmente mais baixa do que a temperatura de desadsorção, para que ocorra a aglomeração ou concentração (*refocusing*) do analito[11].

Fenómenos de memória podem ocorrer quando as temperaturas no injector não são suficientes para desadsorver, por exemplo, compostos com elevado peso molecular, originando a presença destes nas análises subsequentes[14].

b) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Na desadsorção, utilizando a SPME acoplada a HPLC, existem duas técnicas diferentes para remover o analito da fibra: a desadsorção estática e a desadsorção dinâmica. Relativamente à desadsorção dinâmica, os analitos são removidos pela passagem de um fluxo de fase móvel sobre a fibra que se encontra exposta numa câmara de desadsorção. Esta técnica é frequentemente utilizada quando os analitos são fracamente retidos na fase estacionária. No que respeita à desadsorção estática, a fibra é exposta a um volume de fase

móvel (ou outro solvente mais forte) na câmara de desadsorção, durante um determinado período de tempo antes da injecção no sistema cromatográfico. Esta técnica é mais utilizada quando o analito se encontra fortemente retido na fibra.

Em cada uma destas técnicas é necessária uma desadsorção rápida e completa com utilização de quantidades mínimas de solvente[13].

O potencial de uma técnica para aplicações analíticas é condicionado pelo balanço entre as suas vantagens e desvantagens características. A próxima secção enumera algumas das vantagens e desvantagens associadas à técnica de SPME, assim como a outras técnicas de extracção actualmente utilizadas.

1.4.3 Aplicações de SPME: vantagens e desvantagens

A técnica de SPME, para além das vantagens anteriormente referidas, nomeadamente a possibilidade de evitar solventes orgânicos, a sua simplicidade e baixo custo operacional e o facto da fibra poder ser reutilizada várias vezes, é considerada bastante efectiva no manuseamento de amostras aquosas antes de se proceder, por exemplo, à análise por GC. De facto, esta combinação (SPME-GC) tem demonstrado ser uma técnica com elevada sensibilidade e rapidez para a análise de diferentes grupos de analitos, nomeadamente pesticidas, compostos nitroaromáticos, fenóis e compostos orgânicos voláteis (VOC's), quer através da extracção directa quer por *headspace*[15].

Para além das vantagens enumeradas, são igualmente factores que vaticinam o grande potencial desta técnica, a possibilidade de combinar todos os passos de preparação de amostra num único passo e a facilidade de automatização[16].

Deverá referir-se ainda que o uso de uma pequena quantidade de fase líquida, ao invés do uso de grandes volumes, origina um melhor desempenho relativamente a outras técnicas. De facto, a reduzida geometria da fibra permite uma rápida transferência de massa durante os processos de adsorção e desadsorção. Finalmente, devido à natureza selectiva dos revestimentos, em SPME torna-se desnecessária a etapa de limpeza[3].

Na tabela 1.1 disponibiliza-se um resumo das vantagens e desvantagens de algumas das mais utilizadas técnicas de extracção, assim como uma descrição das características de alguns dos parâmetros associados a cada técnica.

Apesar de apresentar um grande potencial enquanto técnica de extracção, a SPME possui também algumas limitações (não enumeradas na tabela 1.1), nomeadamente efeitos de memória que surgem mais facilmente devido às várias utilizações das fibras, ou pela necessidade destas serem acondicionadas. Uma vez que é uma técnica não exaustiva, não são compensadas as alterações da composição da matriz, como acontece por exemplo na extracção líquido-líquido (LLE).

A combinação de analitos de baixa volatilidade com uma matriz mais complexa, pode limitar a utilização desta técnica, uma vez que a ocorrência de vários interferentes impede a análise de analitos a baixas concentrações[11].

O facto das fibras serem frágeis e, consequentemente, fáceis de quebrar é outro factor limitativo da técnica. A maioria dos revestimentos comerciais não possuem boa estabilidade mecânica, podendo ocorrer inchamento e ruptura dos filmes quando em contacto com alguns solventes orgânicos ou com temperaturas elevadas[17].

Tabela 1.1 - Comparação entre as várias técnicas de extracção[18]

	Purga e armadilha	**Extracção líquido-líquido**	**Extracção em fase sólida**	**SPME**
Descrição	Purga da amostra com um gás. Analitos adsorvidos num adsorvente estável com posterior desadsorção por aquecimento e transferidos directamente para o GC. Sistemas de análises on-line	Partição da amostra entre dois solventes imiscíveis. Processo contínuo ou descontínuo	Analitos retidos em adsorvente sólido. Material indesejado é removido do adsorvente seguindo-se a desadsorção dos analitos fazendo uso de solventes orgânicos	Retenção dos analitos num revestimento depositado sobre um substrato sólido. Desadsorção ocorre no instrumento analítico (térmica em GC e por eluição em HPLC)
Tempo de extracção	10-20min.	Contínuo: 20min. Descontínuo: mais de 24h	10-20min.	10 a 60min
Volume de amostra	5 até 2L	2L	1mL até 1L	1mL até 50mL
Uso de solventes	Não necessita	Contínuo: mais de 500mL Descontínuo: 3x60mL	Orgânicos, entre 1 a 10mL	Não necessita
Facilidade de operação	Sistemas automatizados disponíveis	Fácil	Necessário desenvolver método. Sistemas automatizados disponíveis para operações rotineiras	Uso relativamente fácil. Sistemas automatizados disponíveis.
Custo	Custo de equipamento elevado	Baixo	Relativamente baixo	Relativamente baixo
Aceitabilidade	Utilizado para compostos voláteis	Usado para isolar compostos orgânicos	Bastante alargada	Tecnologia a ganhar popularidade
Principais desvantagens	Aplicação a apenas compostos voláteis. Necessidade de seleccionar o adsorvente e de optimizar o sistema	Necessidade de concentrar a amostra após a extracção	Escolher o solvente e optimizar a selectividade do sorvente	Escolher a fase extractora e optimizar o procedimento
Disponibilidade do equipamento	Dispendioso	Facilmente disponível	Facilmente disponível	Apenas por alguns fornecedores (*Supelco* e *Varian*)

Apesar de introduzida inicialmente para análise de compostos voláteis no campo ambiental, esta técnica tem sido expandida para a análise de uma grande variedade de matrizes, sejam elas sólidas, líquidas ou gasosas e para uma grande amplitude de analitos voláteis e não voláteis. Ar, águas de superfície e de profundidade e solos são alguns exemplos de matrizes em que é possível aplicar esta promissora técnica[3].

Ulrich[11] fornece também outros exemplos dos campos de aplicação da SPME, como drogas, metabolitos, poluição ambiental, substâncias endógenas e exógenas (em urina ou fluidos corporais sem ou com baixa concentração de biopolímeros), toxicologia ambiental e forense.

Por fim, a possibilidade de acoplar esta técnica de extracção a uma grande variedade de interfaces é outra das razões que proporciona à SPME grande aceitabilidade nos dias de hoje. Assim, para além de GC e HPLC já referidas, destacam-se igualmente as interfaces como a electroforese capilar (CE)[17], a cromatografia com fluidos supercríticos (SFC)[16], detecção óptica baseada em espectrometria de interferência reflectométrica[7] e espectroscopia de absorção U.V.[19].

Devido ao facto de a SPME se basear fundamentalmente na partição dos analitos entre a amostra e a fase extractora, o tipo de revestimento da fibra (adicionalmente às condições de extracção e às propriedades dos analitos), torna-se um dos factores mais importantes em optimização. Consequentemente, tem vindo a surgir actualmente uma grande variedade de revestimentos, com o objectivo principal de obter uma maior selectividade na determinação de diferentes classes de compostos. Como tal, serão apresentados de seguida alguns dos revestimentos desenvolvidos nos últimos anos no que se refere a esta técnica de extracção.

1.4.4 Revestimentos para SPME

1.4.4.1 Revestimentos comerciais

Ao longo do desenvolvimento da técnica de SPME, vários tipos de fibras têm vindo a ser comercializados, nomeadamente com revestimentos de polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (DVB), Carboxen/PDMS ou Carbowax/*templated resin* (CW/TR). Entre os enunciados, destacam-se os revestimentos de PDMS e de PA, uma vez que são estes os mais estudados e melhor caracterizados.

A escolha do revestimento, para uma aplicação específica, deverá ser baseada na polaridade e no tamanho do analito, porém, a escassa variedade de fases estacionárias disponíveis no mercado torna-se um factor limitativo para a escolha dos mesmos. A tabela 1.2 descreve os tipos de revestimento comercialmente disponíveis[9].

Tabela 1.2 - Revestimentos comerciais disponíveis (classificação em termos de polaridade)[9]

Fibra	Espessura do revestimento (μm)	Polaridade do revestimento	Estabilidade do revestimento	Temperatura máxima (°C)	Mecanismo de retenção
PDMS	100	Não-polar	Polímero não ligado ao substrato	280	Absorção
	30			280	Absorção
	7		Polímero ligado ao substrato	340	Absorção
Carboxen/PDMS	75	Semi-polar	Polímero com entrelaçamento parcial	340	Adsorção
PDMS/DVB	65		Polímero com entrelaçamento parcial	270	Adsorção
PA	85	Polar	Polímero com entrelaçamento	320	Absorção
Carbowax/DVB	55		Polímero com entrelaçamento parcial	260	Adsorção
Carbowax/TR100	50		Polímero com entrelaçamento parcial	240	Adsorção

De seguida, serão descritas algumas características das fibras comerciais acima referidas.

a) Revestimentos poliméricos homogéneos

a1) Polidimetilsiloxano – PDMS

Como se verifica na tabela 1.2, o revestimento de PDMS encontra-se disponível em três espessuras, 7μm, 30μm e 100μm, e em duas formas, ligado e não ligado (entenda-se covalentemente) ao suporte. A fibra de PDMS não ligado, é tratada termicamente, ou através de espectroscopia de U.V. e está disponível em duas espessuras, 100μm e 30μm (selectiva para composto semi-voláteis). Por sua vez, a fibra ligada covalentemente apresenta um

elevado grau de entrelaçamento ao longo da sua cadeia. Estes dois tipos de revestimentos apresentam diferenças quanto à resistência a solventes orgânicos e quanto à estabilidade térmica (enquanto que a fibra de PDMS ligado apresenta elevada estabilidade térmica, acima dos 320°C, a outra, sofre decomposição a temperaturas de cerca de 270°C)[9].

a2) Poliacrilato – PA

O revestimento de PA apenas se encontra disponível com espessura de 85μm e é caracterizado por ser um revestimento fortemente polar parcialmente entrelaçado, tornando-o aplicável na extracção de analitos polares em soluções aquosas[9].

b) Revestimentos poliméricos com partículas porosas incorporadas

Este tipo de revestimentos caracteriza-se pela inclusão de várias partículas porosas (DVB por exemplo) numa fase polimérica parcialmente entrelaçada (por exemplo, carbowax ou PDMS). As fibras com estes revestimentos apresentam a desvantagem de possuírem uma menor estabilidade mecânica relativamente às fibras com revestimentos poliméricos homogéneos; apresentam contudo, uma selectividade mais elevada.

Comercialmente, existem disponíveis as seguintes fibras cuja espessura de filme varia entre 50μm e 65μm:

- ✓ Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB)
- ✓ Polidimetilsiloxano/Carboxen™ (PDMS/Carboxen)
- ✓ Carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB)
- ✓ Carbowax/*templated resin* (CW/TPR)

Destas fibras revestidas com diferentes partículas porosas em diferentes matrizes poliméricas, emergem algumas propriedades associadas que lhes conferem um aumento da capacidade total, devido à elevada porosidade da fibra, assim como lhes permite reter em maior quantidade os analitos, devido ao aumento da porosidade da partícula polimérica[9].

Uma outra propriedade, igualmente relevante, consiste num maior tamanho do poro da partícula, o qual permite aumentar a selectividade da fibra. Na tabela 1.3 descrevem-se algumas propriedades do material poroso característico destas partículas e de seguida passa-se a enunciar mais detalhadamente os tipos de revestimento associados.

Tabela 1.3 – Características físicas das partículas de Divinilbenzeno (DVB), Carboxen 1006 e Templated Resin (TR – 100)[9]

Partícula	*Área de superfície* ($m^2.g^{-1}$)	*Porosidade* ($mL.g^{-1}$)			
		Macro (>500Å)	*Meso (20-500Å)*	*Micro (2-20 Å)*	*Total*
DVB	750	0,58	0,85	0,11	1,54
Carboxen 1006	715	0,23	0,26	0,29	0,78
TR – 100	341	-----	0,80	-----	0,80

b1) Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB)

A fibra de PDMS/DVB é constituída por partículas poliméricas de divinilbenzeno poroso misturadas com polidimetilsiloxano, um polímero líquido. Caracterizado por apresentar uma área superficial de aproximadamente $750m^2.g^{-1}$ e possuir um elevado grau de porosidade ($1,5mL.g^{-1}$), o DVB é principalmente mesoporoso (ideal para reter analitos com cadeias carbonadas entre C_6 e C_{15}), possuindo igualmente alguns macro e microporos. Nos seus poros, os analitos são fisicamente retidos, ocorrendo uma forte adesão dos analitos que encaixam adequadamente nos seus poros e tornando estas fibras aplicáveis em análises de nível vestigial.

A combinação entre as partículas de DVB e a fase líquida de PDMS apresenta maior afinidade para analitos polares, retendo analitos de menor dimensão mais eficazmente do que a fibra com apenas revestimento de PDMS[9].

b2) Carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB)

O Carbowax tem sido utilizado em GC como fase moderadamente polar e quando combinado com partículas porosas de DVB, a sua polaridade é aumentada.

Algumas propriedades do Carbowax apresentam-se como factores limitativos do uso deste revestimento, como por exemplo a sua tendência para dilatar, a sua solubilidade em água e a sua sensibilidade ao oxigénio a temperaturas elevadas. Este último factor origina a oxidação e posteriormente um escurecimento do revestimento. Consequentemente, estas fibras estão limitadas a um intervalo de temperaturas entre 180 e 240°C[9].

b3) Polidimetilsiloxano/Carboxen (PDMS/Carboxen 1006)

Introduzida no mercado em 1997, esta fibra é caracterizada pela inclusão de partículas porosas de Carboxen num polímero líquido, de uma forma em tudo similar à fibra de PDMS/DVB. Tal como nas fibras anteriores, é a dimensão dos poros que determina quais os

analitos que são retidos pela partícula porosa incorporada na fibra, com a condição do diâmetro do poro ter o dobro do tamanho da molécula analito a extrair.

O Carboxen insere-se numa linha de materiais porosos de carbono sintéticos que diferem no design dos poros. Com um volume total de poro de $0,78mL.g^{-1}$ torna-se ideal para pequenas moléculas, ao mesmo tempo que, quando incorporado em PDMS, apresenta grande afinidade na extracção de moléculas com cadeias carbonadas entre C_2 e C_{12}. Moléculas maiores do que C_{12} são fortemente retidas na superfície da partícula, dificultando a desadsorção[9].

Uma vez que as partículas de Carboxen 1006 apresentam poros que atravessam completamente a partícula, os analitos pequenos podem ser mais rapidamente desadsorvidos à medida que atravessam o poro, enquanto que moléculas retidas em mesoporos deverão ser desadsorvidas invertendo a direcção do movimento. Este fenómeno requer uma temperatura de desadsorção compreendidas entre 300 e 320°C[9].

b4) Carbowax/"Templated Resin" (CW/TPR)

Esta fibra foi introduzida para extrair analitos polares, sendo preparada com um método globalmente idêntico ao das outras fibras, ou seja, incorporando partículas porosas num polímero líquido. A *templated resin* usada neste revestimento, primeiramente concebida para ser um suporte em HPLC, é caracterizada por ser uma esfera porosa com elevado grau de pureza.

Na preparação desta fibra, uma solução contendo uma mistura de monómeros hidrofílicos e divinilbenzeno é impelida para os poros das partículas de sílica, sendo a solução posteriormente polimerizada e enrijecida. Imediatamente a seguir, a sílica é dissolvida a pH elevado, deixando para trás um molde de sílica na resina.

A inovação que esta fibra representa assenta no tratamento preliminar da sílica e na composição da solução de monómeros, resultando numa selectividade única relativamente às outras resinas. A optimização do grau de entrelaçamento dos monómeros confere à partícula maior eficiência sem prejuízo para sua resistência mecânica. Este tratamento permite ainda uma distribuição compacta do tamanho dos poros (tornando a fibra altamente reprodutível), elimina os microporos com dimensões inferiores a 20Å e assegura uma elevada área de superfície[9].

Como é possível verificar pela informação acima disponibilizada, até à data existe apenas um revestimento comercial com PDMS (7μm) que apresenta ligação covalente ao substrato. Todos os outros revestimentos surgem da inclusão de partículas porosas num revestimento líquido polimérico sem no entanto exibirem a mesma durabilidade e estabilidade térmica.

Para além das fibras comerciais acima descritas, referem-se de seguida algumas fibras e revestimentos que traduzem os mais recentes avanços tecnológicos em SPME. Primeiramente, enunciar-se-á diferentes formas de preparação de fibras utilizando novas técnicas, nomeadamente através do revestimento em substratos metálicos, da fixação de partículas porosas a substratos metálicos e sílica fundida. Posteriormente, irá descrever-se a forma como a tecnologia sol-gel pode ser aplicada a SPME na preparação de revestimentos quimicamente ligados ao substrato. Realizar-se-á finalmente referência a outros tipos de fibras e revestimentos, que serão devidamente explicados.

1.4.4.2 Revestimentos em substratos metálicos

A totalidade das fibras acima referidas possuem um substrato de sílica fundida, no entanto, são também preparadas fibras fazendo uso de substratos metálicos e as quais revelam a vantagem de proporcionarem uma maior robustez relativamente à fibra de sílica fundida.

Um caso muito peculiar de revestimentos em substratos metálicos é o do filme de óxido de alumínio (Al_2O_3) que se forma à superfície da fibra de alumínio anodizado. Esta camada de Al_2O_3 é a responsável pela adsorção dos analitos à superfície da fibra metálica devido à sua porosidade e à sua espessura. De facto, esta fibra apresenta uma aplicabilidade geral, podendo adsorver uma grande variedade de compostos orgânicos polares e não polares[20].

Da mesma forma, foi possível obter uma fibra de elevada eficiência revestida com dióxido de chumbo nano-estruturado, depositando-o electroquimicamente num fio de platina. Esta fibra demonstrou boa capacidade de extracção para BTEX[21].

O ouro encontra também aplicabilidade em substratos para SPME como demonstra o trabalho desenvolvido por Djozan e Bahar[22], no qual este substrato é revestido com uma camada de polianilina (PANI) através de um método electroquímico. Este revestimento de PANI, quando preparado em tampão acetato contendo perclorato de sódio ($NaClO_4$), apresenta uma estrutura altamente porosa que pode ser controlada mediante o tempo de aplicação de uma corrente eléctrica. Verificam-se para esta fibra bons resultados na extracção de compostos aromáticos polares.

Revestimentos de filmes condutores de polipirrole (PPY) num substrato de platina foram desenvolvidos tendo como base as propriedades redox reversíveis deste polímero e dos seus derivados. Neste caso particular, faz-se uso do controlo electroquímico das propriedades do filme (EC-SPME) para aumentar a selectividade e eficiência da SPME para espécies carregadas. Deste modo, é possível extrair um grupo de compostos simultaneamente ou um simples analito a partir de uma matriz, com base nas propriedades electroquímicas de analitos carregados[23].

1.4.4.3 Revestimentos com fixação de partículas a substratos (metálicos e sílica fundida)

Este tipo de revestimento baseia-se na imobilização de partículas de sílica porosa (funcionalizada ou não) num substrato metálico ou de sílica fundida, com o propósito de obter diferentes selectividades e aumentar substancialmente a área superficial da fibra relativamente às tradicionais fibras de sílica fundida com revestimento polimérico.

O método de imobilização das partículas sólidas consiste no revestimento do substrato com uma cola epóxi de alta temperatura e posterior imersão nas partículas sólidas. No trabalho desenvolvido por Lee *et al*[24] foram utilizadas partículas de sílica porosas funcionalizadas com fenilo, C_8 e C_{18} monomérico e polimérico, os quais apresentam diferentes selectividades para os vários tipos de analitos. Adicionalmente, a capacidade da fibra foi consideravelmente aumentada devido à elevada área superficial das partículas porosas.

A ligação das partículas ao substrato é de natureza física, consequentemente, estas fibras apresentam uma limitação relativamente à temperatura de operação, uma vez que apesar de ser possível utilizar indefinidamente a fibra a temperaturas inferiores a 250ºC, para temperaturas superiores a 300ºC, observa-se a libertação de monómeros originários da cola epóxi.

Surge posteriormente por Leidy e Xia[25] uma adaptação da fibra anterior. Neste trabalho, ao invés de usar uma única fibra, foi montado um sistema multi-fibra, colando as partículas porosas a cada uma de 12 fibras de lã de vidro, de tal modo que a eficiência da extracção aumentou 10 vezes relativamente à da fibra convencional revestida com PDMS. Esta fibra é aplicada unicamente na extracção de pesticidas.

Foi preparado ainda um outro tipo de fibra usando aço inoxidável como substrato e um revestimento de materiais mesoporosos, nomeadamente C_{16}-MCM-41 e C_8-MCM-41, os quais possuem uma elevada área superficial (muito favorável à transferência de massa entre o

revestimento e a amostra) e, contrariamente ao que sucede nos revestimentos líquidos, os seus poros modificados, sendo rígidos, contribuem para a selecção por intermédio do tamanho molecular[26].

Mais recentemente, foi desenvolvida uma fibra mergulhando um fio de aço inoxidável numa mistura contendo um material de sílica diol permutadora de iões (XDS), cola epóxi e clorofórmio a 180ºC, a qual se revelou capaz de extrair selectivamente pequenos péptidos de matrizes tão complexas como o sangue[27].

Utilizados como fibras para SPME em amostras biológicas, os RAMs (do inglês *restricted access material*) representam uma classe especial de materiais de sílica alquil-diol (ADS) que fraccionam a amostra na matriz biológica e na fracção de analito. Para além de proporcionarem processos de exclusão por tamanhos, permitem extrair e enriquecer, por partição, compostos com baixo peso molecular no interior da fase.

Estas partículas apresentam uma superfície exterior especial que, estando em contacto com os componentes da matriz biológica, evita a adsorção de macromoléculas. Assim, as partículas bifuncionais modificadas caracterizam este tipo de fibras e têm aplicação na análise de alimentos e de drogas em fluidos biológicos[17].

1.4.4.4 Outros tipos de fibras e revestimentos

Para além de todos os revestimentos anteriormente referidos, algumas pesquisas levaram ao desenvolvimento de outros revestimentos, como por exemplo um revestimento constituído por um polímero de polipirrole com grande aplicabilidade devido à sua inerente multi-funcionalidade na extracção de várias classes de analitos; também têm sido utilizadas fibras de sílica fundida revestidas com ácido poliacrílico para a extracção de proteínas[17].

Olesik *et al*[28] desenvolveram um filme de carbono vítreo fluorinado, através da introdução de átomos de flúor muito electronegativos na estrutura da fase estacionária à base de carbono. Este tipo de fase estacionária, para além de permitir a separação e recuperação de proteínas com o mínimo grau de desnaturação, apresenta-se como altamente selectivo para compostos contendo pares de electrões isolados, tais como cetonas, compostos nitrados e compostos cloro-fluorinados. A sua principal desvantagem advém da dificuldade de preparação e da sua baixa estabilidade térmica.

Ainda referindo a aplicação de revestimentos contendo grupos halogenados, foi preparado um revestimento de resina de Nafion perfluorinada utilizada para a extracção de analitos polares em matrizes apolares[17].

As fibras de carbono activado, apesar de não possuírem um revestimento diferenciado, têm também encontrado alguma aceitação quando utilizadas em SPME, apresentando grande aplicabilidade em estudos de foro ambiental. Estas fibras, geralmente activadas por dois métodos diferentes, apresentam grande afinidade para compostos polares (activação através de vapor de água) e para compostos apolares (activação química). A grande vantagem deste tipo de fibras reside na sua elevada capacidade de adsorção resultante das suas propriedades únicas, tais como a estrutura porosa, a distribuição da dimensão dos poros, a área de superfície dos microporos e a estrutura química da superfície entre outras[29].

Mais recentemente, surgiram fibras preparadas com revestimentos onde são incorporados líquidos iónicos, aplicadas à determinação de BTEX. No entanto, pelo facto de serem descartáveis, dada a sua instabilidade mecânica, a utilização deste tipo de fibras é ainda limitada[30].

As fibras revestidas com MIPs têm vindo a ser alvo de estudo, fundamentalmente para aplicação a amostras biológicas. Este tipo de revestimento tem sido usado em cromatografia líquida, cromatografia de afinidade e electroforese capilar (como fase estacionária quiral) e em biosensores e membranas como material selectivo, entre outras aplicações. O método de preparação desta fibra consiste na imersão do substrato num pequeno volume de solução contendo um pré-polímero e uma molécula molde (analito), seguida da polimerização com uma solução de metacrilato, sob radiação a baixas temperaturas. Posteriormente a molécula molde é removida por acção de solventes orgânicos adequados[30].

Dada a possibilidade de sintetizar MIPs de acordo com o analito alvo, é possível preparar uma grande variedade de fibras selectivas, o que tornará possível estender a aplicação da técnica de SPME[31]. Este tipo de revestimento apresenta-se assim como um dos mais importantes temas de estudo no futuro, no que diz respeito ao desenvolvimento de novas fibras capazes de dar resposta à variabilidade de amostras existentes.

Para além dos diferentes tipos de fibras e revestimentos mencionados até ao momento, existem uma série de trabalhos publicados com a aplicação da tecnologia sol-gel à preparação de fibras para SPME sobre os quais este trabalho se debruçará. No próximo capítulo, descrever-se-á o processo sol-gel.

1.5 Aplicação da tecnologia sol-gel a revestimentos para SPME

A tecnologia sol-gel tem sido utilizada na produção de revestimentos ligados a diversos tipos de superfícies, com uma vasta aplicação em SPME. Esta tecnologia tem-se revelado uma inovadora forma de desenvolvimento/produção de revestimentos selectivos como fases estacionárias, assim como de imobilização química desses revestimentos na forma de filmes de elevada estabilidade operacional, seja a solventes orgânicos, seja a altas temperaturas.

A química subjacente à tecnologia sol-gel (doravante denominada apenas sol-gel) tem a vantagem, entre muitas outras, de permitir a incorporação eficiente de compostos orgânicos em estruturas poliméricas inorgânicas, utilizando condições térmicas suaves. A possibilidade de atingir uniformidade a nível molecular na síntese de compósitos orgânico-inorgânicos e o seu baixo custo são outras vantagens de grande relevância desta técnica[16].

Através desta tecnologia, é possível obter, à temperatura ambiente, materiais de óxidos inorgânicos homogéneos com propriedades desejadas, tais como dureza, resistência química e térmica, polaridade e porosidade[27].

No que diz respeito à SPME, as principais vantagens do sol-gel traduzem-se, por um lado, pela forte adesão do revestimento ao substrato, devido à ligação de natureza química que se estabelece[16] e por outro, por poder proporcionar uma estrutura porosa e uma elevada área superfícial[17].

1.5.1 O processo sol-gel

Para melhor entender os processos que ocorrem em sol-gel, será preferível iniciar a descrição por uma definição etimológica. Por *sol* define-se uma suspensão coloidal de partículas num líquido que pode ser utilizada para gerar polímeros ou partículas[32,33]. Por sua vez, um *colóide* define-se como uma suspensão de partículas onde as forças de gravidade são desprezáveis e cujas interacções entre partículas (com dimensões compreendidas entre 10 e 10^4Å) são regidas por forças de curto alcance, em virtude da pequena dimensão da fase dispersa[33].

Um gel é usualmente definido como um estado de matéria no qual uma molécula atinge dimensões macroscópicas de tal forma que se estende por toda a mistura[33], constituindo assim uma rede porosa num líquido. Designam-se por hidrogéis aqueles que são formados a partir de solução aquosa e por alcoogéis quando são formados a partir de solução alcoólica[32].

O processo sol-gel inicia-se com a hidrólise do precursor, (por exemplo alcóxidos metálicos) cuja estrutura consiste num elemento metálico (ou metalóide) rodeado por vários ligandos que não possuam outros elementos metálicos (ou metalóides).

No caso particular dos alcóxidos metálicos (utilizados no corrente estudo), os ligandos que os constituem são ligandos alcóxido, formados pela ligação entre um grupo alquilo (R) e um grupo hidroxilo (ao qual é removido um protão) de um álcool, que por sua vez estabelecem uma ligação através do oxigénio (M-OR) ao elemento metálico, M, (ou metalóide)[33].

A reactividade química dos alcóxidos metálicos relativamente às reacções nucleofílicas depende fundamentalmente da força do nucleófilo, do carácter electrofílico do átomo metálico e da sua capacidade para aumentar o seu número de coordenação, podendo o grau de insaturação da coordenação do metal simplesmente ser expresso pela diferença entre o número de coordenação e o seu estado de oxidação.

Deste modo, e tendo em consideração que o átomo metálico envolvido no processo sol-gel utilizado neste estudo é o silício (número de coordenação igual a 4), verifica-se que os alcóxidos de silício não são muito reactivos (baixo carácter electrofílico e grau de insaturação nulo) e portanto as reacções de hidrólise e de condensação deverão ser catalisadas[34].

As etapas que envolvem um processo sol-gel dividem-se em dois conjuntos de reacções: a hidrólise do precursor e a policondensação do produto hidrolisado (para além de posteriores ramificações do sistema)[16], sendo ambos catalizados por ácidos ou bases[16,33,34]. Porém, antes mesmo de descrever estes processos, é conveniente mencionar que, em sistemas reais, onde as reacções de hidrólise e de condensação não ocorrem separadamente, mas sim competitivamente, a cinética da reacção global torna-se muito complexa[34].

Como referido anteriormente, durante um processo sol-gel as reacções ocorrem competitivamente, no entanto, sob condições ácidas a hidrólise ocorre a uma maior velocidade do que a condensação, enquanto que em condições alcalinas, ambas as reacções ocorrem a velocidades semelhantes[35].

De seguida, por uma questão de simplificação, as reacções de hidrólise e de condensação serão descritas separadamente.

1.5.1.1 Hidrólise

a) Hidrólise ácida

A hidrólise catalizada por ácidos encontra-se esquematizada na figura 1.4 onde se verifica, numa primeira etapa, a rápida protonação do grupo alcóxido do precursor, originando uma espécie catiónica com deficiência de electrões no átomo central de silício, e portanto mais electrofílica. A segunda etapa da hidrólise ácida, consiste no ataque nucleófilo da molécula de água ao átomo central. Forma-se assim uma espécie num estado de transição penta-coordenado[36] que, por posterior perda de um protão e saída do grupo CH_3OH (bom grupo de saída) origina o produto hidrolisado[35].

A título de exemplo, descreve-se igualmente (figura 1.4) o mecanismo da reacção para um dos precursores mais utilizados em sol-gel, o metiltrimetoxisilano (MTMOS). Este precursor é um dos mais estudados e utilizados, fundamentalmente devido à sua capacidade de ultrapassar problemas encontrados durante a secagem no processo sol-gel, tais como fenómenos de *cracking* ou de contracção originados pela pressão capilar devido à evaporação do solvente que se encontra nos poros do gel[16,34].

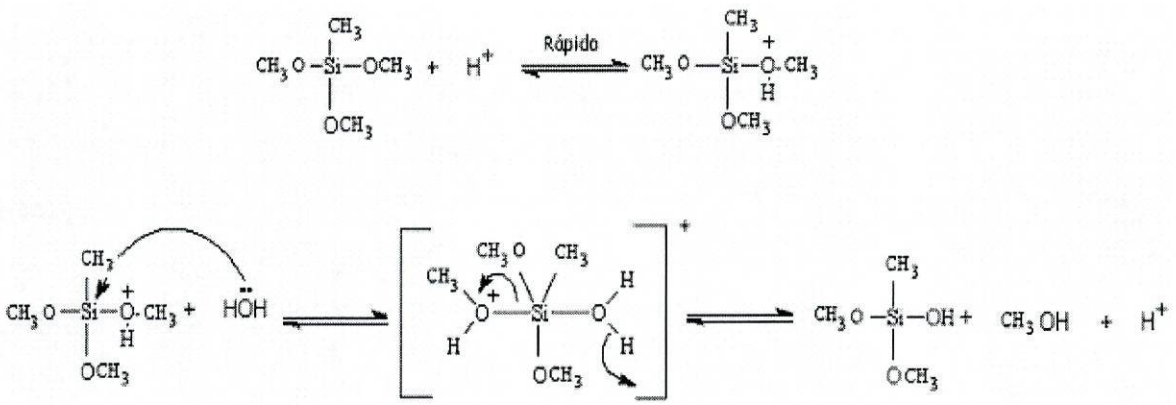


***Figura 1.4** - Exemplo de hidrólise ácida durante o processo sol-gel[16,35]*

Esta reacção repete-se até que o percursor seja completamente hidrolisado[34].

b) Hidrólise alcalina

A figura 1.5 representa a hidrólise catalisada por bases e descreve o mecanismo da reacção de um modo detalhado novamente para o MTMOS.

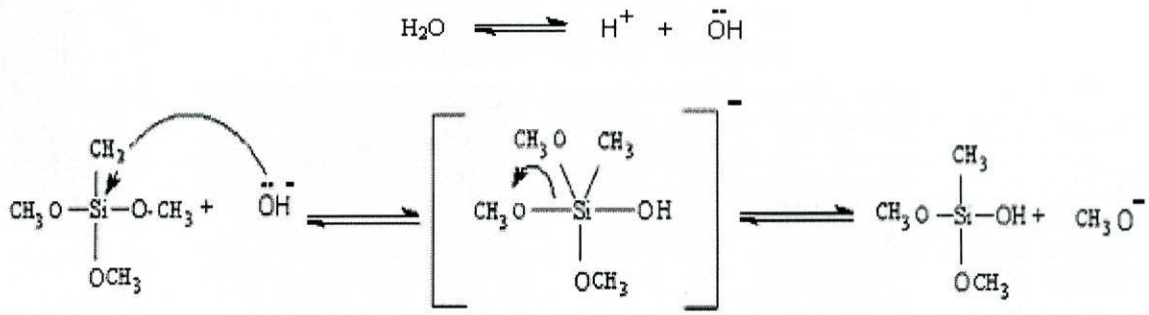


***Figura 1.5** - Exemplo de hidrólise alcalina durante o processo sol-gel*[16,35]

Contrariamente ao que sucede na catálise ácida, a reacção em meio alcalino ocorre muito mais lentamente (com concentrações equivalentes de catalisador). Neste tipo de reacção, ou seja, em condições básicas, a dissociação de moléculas de água é favorecida, produzindo aniões hidróxido num passo muito rápido. Ocorre posteriormente o ataque nucleofílico dos aniões hidróxido ao átomo de silício com deficiência electrónica, originando um estado de transição penta-coordenado o qual, por saída de um grupo alcóxido, produz um monómero hidrolisado.

A hidrólise inicial ocorre com mais dificuldade do que as subsequentes pois o oxigénio básico do grupo alcóxido repele o grupo nucleófilo –OH, no entanto, após a ocorrência da primeira hidrólise, as restantes reacções irão decorrer sucessivamente mais rápido do que a precedente[33].

1.5.1.2 Condensação

Após hidrolisados, os produtos das reacções anteriores incorrem em reacções de policondensação dando origem a uma estrutura polimérica tridimensional. As reacções de condensação são igualmente catalisadas por ácidos ou por bases[35].

a) Condensação ácida

Na condensação ácida, ocorre o ataque do átomo de silício, o qual se encontra ligado a grupos silanol protonados por nucleófilos –Si-OH neutros. Nestas condições, verifica-se a

formação de uma cadeia de polímeros fracamente interligados[35], como demonstrado na figura 1.6:

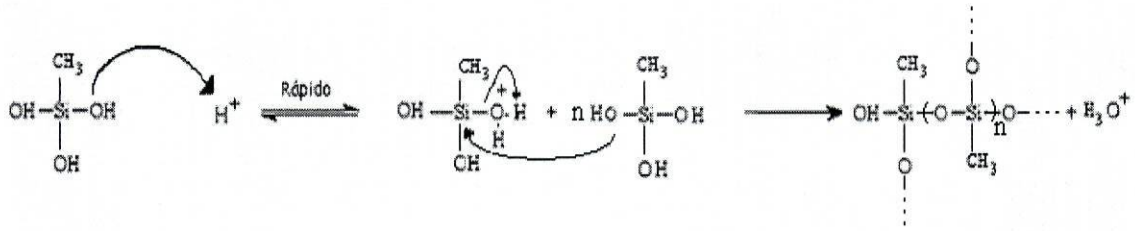


Figura 1.6 - Exemplo de condensação em meio ácido durante o processo sol-gel[16,35]

b) Condensação alcalina

Um meio alcalino promove o ataque de uma espécie silanol desprotonada (-Si-O$^-$) a uma espécie neutra de siloxano. O resultado da catálise básica traduz-se por uma agregação que proporciona cadeias silicatadas altamente compactas e ramificadas[35], como se descreve na figura 1.7:

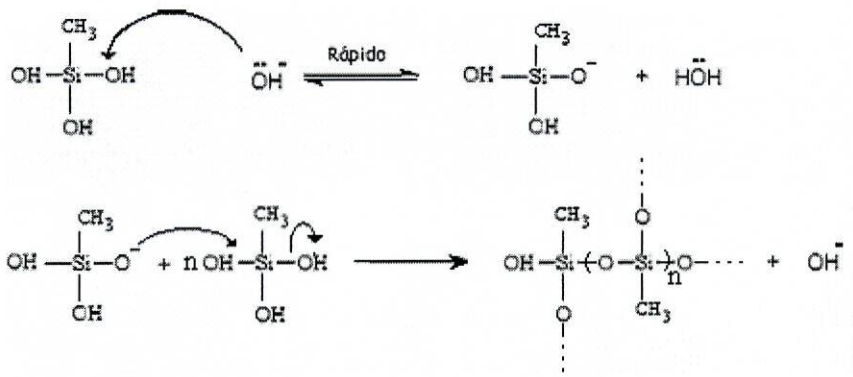


Figura 1.7 - Exemplo de condensação em meio alcalino durante o processo sol-gel[16, 35]

Este facto deve-se ao maior número de ligações –Si-O$^-$ originadas em meio alcalino, onde ocorre normalmente a desprotonação de mais do que um grupo silanol. Neste caso, o polímero resultante possuirá um grau de ramificação mais elevado do que na condensação em meio ácido[35].

1.5.1.3 Gelificação

A gelificação ocorre quando se estabelecem ligações entre partículas sol de sílica originadas pela hidrólise e condensação, havendo formação de agregados que posteriormente se entrelaçam numa extensão tal que dão origem a uma rede polimérica infinita[34].

Na fase inicial, o gel é caracterizado por possuir uma elevada viscosidade mas uma elasticidade bastante reduzida. No ponto de gelificação, não ocorre qualquer reacção química,

seja de natureza endotérmica ou exotérmica, apenas se verifica o aumento súbito da viscosidade. Após este ponto, a elasticidade da solução aumenta progressivamente como resultado do aumento de fenómenos de entrelaçamento e inclusão química de partículas sol isoladas nos agregados que continuam a ocorrer após a gelificação[34].

A reacção de polimerização, a pH neutro, ocorre através do ataque nucleófilo do grupo Si-O^-, cuja nucleofilicidade pode ser alterada por adição de solventes. Na presença de solventes polares próticos, como por exemplo os alcóois, estabalecem-se ligações de hidrogénio -Si-OH----$^-$O-Si-, o que diminui a reactividade e consequentemente origina estruturas mais ramificadas com diminuição dos tempos de gelificação.

O efeito oposto é verificado na presença de solventes apróticos, os quais não originam a desactivação do grupo Si-O^-. Estes solventes aumentam a extensão da reacção de polimerização e como resultado, a gelificação ocorre mais lentamente[34].

A reacção de condensação quando catalizada por bases é mais rápida, promovendo uma rápida interligação dos polímeros e portanto a formação de uma rede porosa (figura 1.8). Por outro lado, na presença de uma catalizador ácido, a reacção de condensação é mais demorada, originando estruturas densas com pequenos poros (figura 1.9)[33].

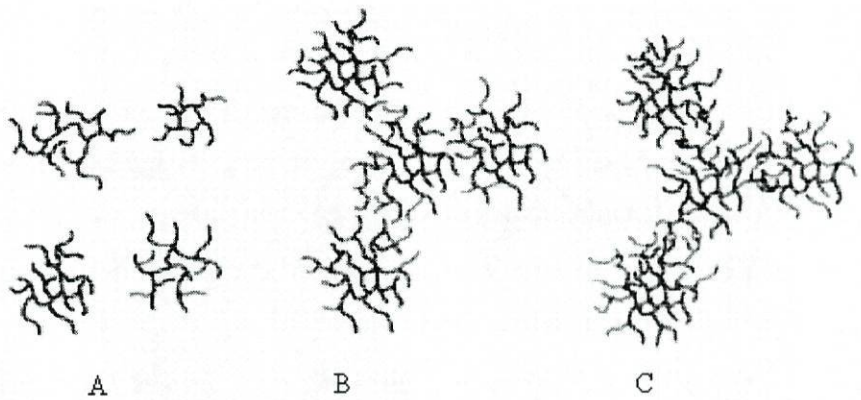


***Figura 1.8** - Gelificação em condições básicas: A- afastado do ponto de gelificação (aglomerados ramificados); B- próximo do ponto de gelificação (crescimento e ramificação adicional); C- ponto de gelificação (aglomerados ligados)[35]*

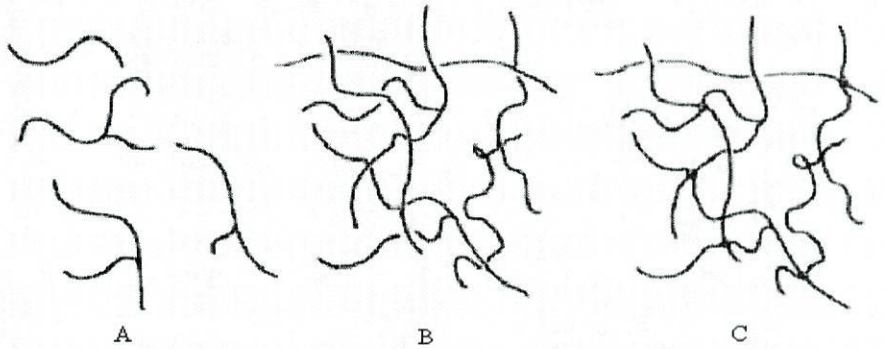


***Figura 1.9** - Gelificação em condições ácidas: A- afastado do ponto de gelificação; B- próximo do ponto de gelificação (envolvimento primário de macromoléculas lineares); C- ponto de gelificação (entrelaçamento adicional nas junções)[35]*

1.5.1.4 Maturação

A maturação é uma extensão da etapa de gelificação, na qual a rede de gel é reforçada por intermédio de posteriores polimerizações[36], e é caracterizada por modificações estruturais que dependem do tempo, temperatura, solvente e pH[35], podendo ocorrer durante longos períodos de tempo[34].

Neste processo, as reacções de condensação continuam a decorrer no sentido de diminuir o número de grupos hidroxilo, podendo mesmo verificar-se um encolhimento ou contracção da amostra devido ao estabelecimento de novas ligações, que substituem as interacções fracas existentes entre grupos hidroxilo (à superfície) e grupos alcóxilo. A referida contracção dá origem a um fenómeno, denominado por sinérese, em que ocorre a expulsão do solvente dos poros do gel[33].

1.5.1.5 Secagem

Inicialmente, um gel contrair-se-á numa quantidade igual ao volume de qualquer líquido evaporado, no entanto, este fenómeno apenas ocorrerá se o gel ainda estiver flexível e capaz de se ajustar ao volume reduzido. No caso da contracção se verificar antes de ocorrer a evaporação do líquido (se processos de sinérese e de entrelaçamento estiverem a decorrer), o gel vai endurecendo até que o excesso de líquido proveniente da sinérese tenha evaporado[34]. Neste caso, a distribuição de tamanho dos poros é fortemente influenciada pelos processos de entrelaçamento, enquanto que no caso em que o gel se encontra ainda flexível ocorrerá o colapso dos poros à medida que a contracção prossegue[34].

À medida que se verifica a secagem e contracção do gel, a sua rigidez aumenta como resultado da estrutura compacta e de posteriores entrelaçamentos. O gel torna-se de tal modo rígido no ponto crítico, que é capaz de resistir à subsequente contracção à medida que o líquido se evapora[34]. Nesta altura, o restante líquido inicia um processo de dispersão pelos poros que se formaram na estrutura[33]. Em muitos géis, devido ao carácter hidrofílico das paredes dos poros e às forças capilares, ao mesmo tempo que o solvente penetra nos poros capilares, um fino filme de líquido permanece nas paredes dos poros[34] permitindo uma secagem mais eficaz[33]. A formação deste filme origina a evaporação do líquido que se encontra no interior dos poros, antes deste alcançar a superfície[34].

A tensão superficial e o reduzido tamanho dos poros dão origem a elevadas pressões ao longo das interfaces curvadas do menisco do solvente nos poros. Consequentemente, poderão

surgir fissuras devido a tensões capilares, se o gel não apresentar uma composição adequada e se o processo não decorrer nas melhores condições.

Enquanto decorre a contracção do gel, os grupos funcionais da estrutura são compelidos a permanecer próximos, originando assim grandes tensões propícias à criação de fissuras. Deste modo, os factores estereoquímicos poderão igualmente ser responsáveis pelo aparecimento de fissuras. Para além da utilização de aditivos capazes de controlar o processo de secagem, como por exemplo os DCCAs (*drying control chemical additives*), é possível também proceder ao abrandamento da reacção ou à secagem em condições supercríticas, sendo no entanto qualquer uma destas opções pouco viáveis devido ao facto de apresentarem elevado custo e serem demoradas. A hipótese mais adequada, na maioria dos casos, será a optimização da composição inicial do processo sol-gel[33].

1.5.1.6 Densificação

O processo de densificação pode ser melhor compreendido se tomarmos em linha de conta a relação entre o encolhimento linear e a perda de massa em função da temperatura. Assim, a temperaturas mais baixas (<200ºC), ocorre perda de massa à medida que o líquido à superfície dos poros é desadsorvido. A esta temperatura, a contracção deixa de ser significativa e poderá observar-se uma expansão da rede[34]. Num intervalo de temperaturas intermédias, é verificada simultaneamente a perda de massa e a contracção, podendo ocorrer nesta fase diversos fenómenos, nomeadamente a perda de compostos orgânicos, uma posterior condensação ou um relaxamento estrutural.

A temperaturas superiores, observa-se um aumento abrupto na velocidade de contracção acompanhado de uma diminuição mínima ou nenhuma perda de massa. O processo de densificação é muito favorecido termodinamicamente devido à redução muito elevada da área de superfície do material[34].

A utilização da tecnologia sol-gel ao revestimento de fibras para SPME é normalmente efectuada através de variadas técnicas, as quais dependem do tipo e forma do substrato a ser revestido. Assim, serão descritas de seguida algumas técnicas frequentemente aplicadas no revestimento de filmes sol-gel.

1.5.2 Técnicas de revestimento de filmes sol-gel

A nível experimental, para a preparação de filmes sol-gel, destacam-se o *dip-coating*, *flow-coating* e *spin-coating*. Apesar das fibras preparadas neste estudo terem sido revestidas por dip-coating, as restantes deverão ser igualmente consideradas, uma vez que serviram de técnicas de suporte a parte do trabalho experimental.

A técnica de *flow-coating*, esquematizada na figura 1.10, consiste na deposição de um filme sol-gel num substrato com uma determinada inclinação permitindo que, à medida que a solução escorre pela superfície, ocorram os processos de gelação, evaporação de solvente e secagem, acompanhados por reacções de condensação[37].

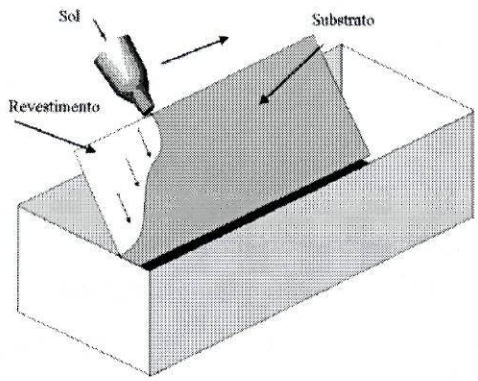


***Figura 1.10** – Ilustração de revestimento de superfícies por flow-coating[37]*

No revestimento por *dip-coating*, o substrato é imerso verticalmente na solução sol-gel durante um determinado período de tempo (figura 1.11). Após este período, o substrato é removido da solução de forma a ocorrerem os processos de evaporação, secagem e condensação. Neste caso, a velocidade de imersão e emersão poderá ser um factor importante, condicionando as propriedades do filme. Por vezes, recorre-se à deposição mecânica de forma a garantir uma velocidade constante[37].

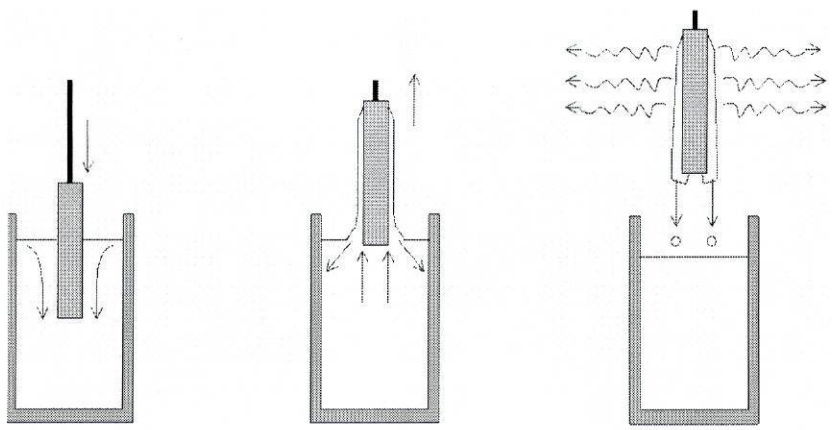


***Figura 1.11** - Ilustração de revestimento de superfícies por dip-coating[37]*

1.5.3 Fibras preparadas através da tecnologia sol-gel

Tal como referido, a tecnologia sol-gel para além do desenvolvimento que a tem caracterizado, encontra grande aplicabilidade nos dias de hoje, incluindo na preparação de fibras para SPME. No estudo inicial de Malik *et al*, em 1997[16], foi descrita uma forma de ligar quimicamente o revestimento sol-gel ao substrato.

Na preparação da solução sol-gel, ao utilizar um polímero hidroxi-terminado (polidimetilsiloxano), ocorre a ligação química entre este e a rede polimérica tridimensional, como mostra a figura 1.12:

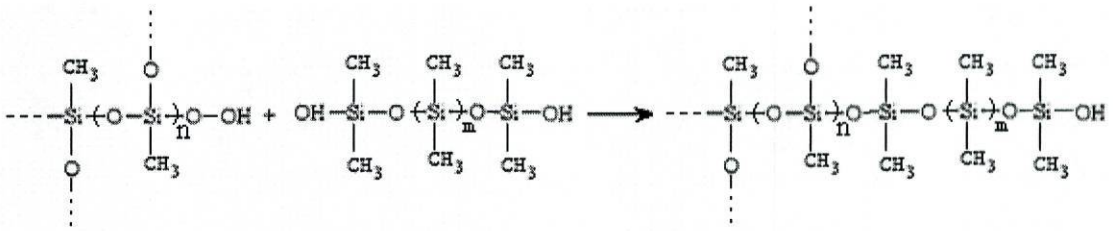


***Figura 1.12** - Ligação do polímero PDMS à rede tridimensional durante a condensação*[16,35]

Quando, experimentalmente, se procede ao revestimento da fibra mergulhando-a na solução sol-gel, os grupos silanol à superfície da fibra de sílica fundida podem igualmente participar nas reacções de condensação e proporcionar a ligação química entre a superfície da fibra e a rede polimérica nas suas imediações[16], como se pode verificar através da figura 1.13.

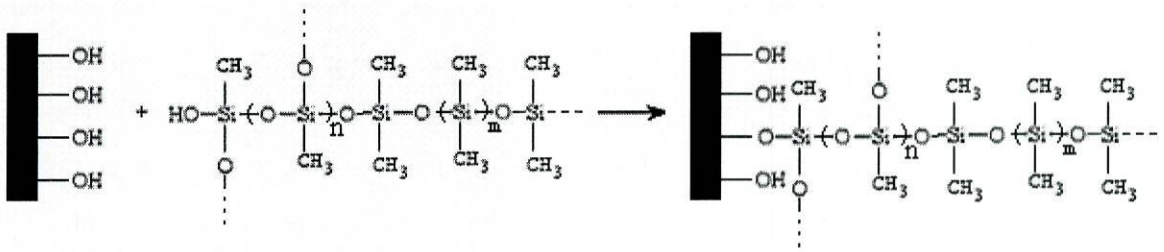


***Figura 1.13** - Ligação do revestimento sol-gel à superfície da fibra*[16]

Devido ao facto de existir ligação de natureza química entre o revestimento sol-gel e o substrato, estas fibras são caracterizadas por exibirem uma elevada estabilidade térmica, podendo ser usadas até 320ºC ou mais. Adicionalmente, este revestimento ao possuir uma estrutura porosa e uma reduzida espessura permite o aumento das velocidades de transferência de massa e de extracção em SPME[16].

Desde este estudo, muitos outros trabalhos têm sido publicados usando como técnica de revestimento o sol-gel. Enunciam-se de seguida alguns desses estudos.

Caruso *et al*[5], desenvolveram um revestimento para a determinação de organometais por HPLC, (possuindo portanto, boa estabilidade a solventes orgânicos), baseado na co-

polimerização dos precursores MTMOS e C_8-MOS, este último conferindo um elevado grau de hidrofobicidade ao revestimento.

A tecnologia sol-gel foi igualmente aplicada na preparação de fibras revestidas com polietileno glicol (PEG), as quais apresentam bons resultados na análise de pesticidas, BTEX's ou fenóis, entre outros. Uma vez que cada molécula PEG possui dois grupos hidroxilo terminais, um deles permanece livre (pelo menos em algumas moléculas), conferindo à fibra um certo grau de polaridade, enquanto o outro surge ligado ao grupo silanol terminal da rede sol-gel formada durante o processo de condensação[38].

Zeng *et al*, usando a tecnologia sol-gel prepararam fibras revestidas com éteres de coroa. Deste modo, a capacidade de extracção relativamente a algumas aminas aromáticas (muito importantes devido às suas propriedades cancerígenas) e a compostos fenílicos aumenta devido à boa selectividade que advém da sua estrutura rica em cavidades e do forte efeito electronegativo dos heteroátomos no anel do éter[39].

Posteriormente, Yun[40] publica um trabalho que consiste numa variante da última fibra referida e no qual prepara um revestimento com éteres de coroa aberta. Estas fibras trazem melhorias relativamente às anteriores pois, para além de apresentarem a mesma selectividade, são produzidas com precursores facilmente sintetizados e não tóxicos; apresentam também bons resultados na extracção de composto polares, como fenóis e compostos apolares como BTX's.

Utilizando um substrato de vidro cerâmico revestido com PDMS foi possível obter uma fibra com um revestimento de maior espessura do que a fibra de PDMS comercial, apresentando bons resultados na extracção de BTEX[41].

Mais recentemente, Augusto e Lopes[42] produziram uma fibra com um compósito de PDMS e álcool polivinílico (PVA), a qual apresenta a vantagem de ser termicamente mais estável comparativamente a outras fibras similares baseadas em siloxanos.

Um estudo igualmente recente foi realizado por Azenha *et al*[43], os quais obtiveram um filme sol-gel ultra-fino com uma capacidade de extracção comparável às fibras comerciais de PDMS, para alguns analitos e de CW-DVB, para analitos com maior carácter alifático.

Referências ao uso da tecnologia sol-gel (por intermédio de uma fibra revestida com polifenilmetilsiloxano para determinação de pesticidas organoclorados)[44], na preparação de fibras revestidas com calix[4]areno para extracção de compostos semelhantes aos extraídos pelas fibras com éteres de coroa aberta[45], com fulereno de polisilicone (C_{60}) para a extracção de PAH's[46] ou com hidroxifulereno (fulereno hidroxi-terminado) para extracção de compostos orgânicos pouco voláteis e substâncias polares[47], são também encontradas na literatura mais recente.

1.6 Impressão molecular

1.6.1 Introdução à impressão molecular

O reconhecimento molecular (capacidade de uma determinada molécula se ligar a outra complementar em forma[48]) é um conceito desde sempre subjacente à estrutura e à função do mundo biológico. No caso particular das enzimas, por exemplo, o reconhecimento é um requisito para que as moléculas tenham acesso ao sítio activo, o que ilustra o carácter extremamente selectivo das enzimas[49].

Devido ao papel que desempenha na descodificação das funções biológicas, têm sido realizados extensivos esforços de investigação na tentativa de conhecer as características das interacções moleculares específicas deste tipo de mecanismo. Dada a necessidade de transferir este conhecimento para as aplicações práticas, surge a técnica de impressão molecular, a qual tem sido amplamente desenvolvida até aos dias de hoje[50].

O conceito de impressão molecular tem a sua origem no início dos anos trinta com os trabalhos desenvolvidos por Breinl e Haurowitz[51] na área de imunologia. Entre os anos quarenta e cinquenta, Dickeys[52], na tentativa de criar afinidade para moléculas corantes em sílica gel, produziu o que hoje é considerado o primeiro material impresso[53].

Esta tecnologia surge como uma alternativa aos receptores artificiais convencionais (por exemplo, compostos macrocíclicos como ciclodextrinas ou éteres de coroa), tentando responder a algumas das desvantagens que estes apresentavam, nomeadamente a sua difícil disponibilidade (requeriam sínteses com mais de cinco etapas com baixo rendimento, tornando o processo muito dispendioso), o seu design muito difícil para moléculas grandes e a dificuldade de sintetizar estes receptores num meio reaccional apropriado.

O mecanismo de impressão foi primeiramente proposto por Morrisson e colaboradores[54] sugerindo um mecanismo de associação e no qual as moléculas alvo encurraladas na matriz determinavam a selectividade inerente ao processo[55].

No início dos anos cinquenta, a utilização de sílica impressa como fase estacionária em cromatografia em coluna para separar alguns enantiómeros demonstrou selectividade quiral em impressão molecular[56]. Foram igualmente aplicadas, nos finais da década de 50, sílicas impressas para a determinação da configuração absoluta de moléculas orgânicas estruturalmente relacionadas com a molécula-alvo[57,58,59].

Após quase duas décadas de investigação nesta área, a impressão molecular em sílica sofreu um período de declínio, o qual coincidiu com a introdução da impressão molecular

utilizando polímeros orgânicos por intermédio do grupo de Wulff em 1972[60]. No entanto, em 1979, Sagiv e colaboradores[61] apresentaram uma nova forma de aplicar a impressão molecular em sílica, adsorvendo a molécula alvo à superfície de partículas de sílica e usando simultaneamente octadeciltrimetoxisilanos quimicamente ligados à sua superfície. Este método origina zonas de sílica não derivatizada complementares à molécula alvo e foi aplicado em superfícies de ouro[62] e de óxidos de estanho[63].

Até 2003 foram publicados vários artigos, como é possível observar na figura seguinte, que abrangem as mais variadas áreas da química, bioquímica ou medicina, tendo sido o conceito de impressão estendido a um grande número de moléculas alvo[55].



***Figura 1.14** - Número de publicações por ano no campo da tecnologia de impressão molecular no período de 1931 a 2003[55].*

Mais recentemente, utilizando polímeros sintéticos como material de impressão, foram produzidos os denominados elementos de reconhecimento artificiais, os quais apresentam vantagens relativamente às biomoléculas, como por exemplo, uma grande estabilidade a solventes orgânicos e altas temperaturas e o seu baixo custo, entre outras, devido à sua natureza polimérica com elevado grau de entrelaçamento[55].

1.6.2 Princípios gerais da impressão molecular

Actualmente, a metodologia de impressão molecular pode ser definida em termos globais como a "construção de locais de reconhecimento selectivo de analitos em polímeros sintéticos, onde uma molécula alvo (átomo, ião, molécula ou mesmo um conjunto macromolecular, como é o caso dos microorganismos) é aplicada com vista a facilitar a formação do local de reconhecimento durante a polimerização ou policondensação covalente (ou não covalente) com a posterior remoção de parte ou da totalidade da molécula-alvo, necessária para ocorrer o reconhecimento nos espaços deixados vagos por estas moléculas[55]".

Neste contexto, o processo de impressão molecular engloba normalmente três etapas, a primeira das quais consiste na preparação de um conjugado, entre monómeros funcionais e uma molécula alvo (o qual pode ser formado através de interacção covalente ou não covalente). A segunda etapa consiste na polimerização deste conjugado (ou aducto) monómero-molécula alvo originando um elevado grau de entrelaçamento e uma complementaridade entre os resíduos funcionais (resultantes dos monómeros funcionais) e a molécula alvo. Finalmente a terceira etapa consiste na remoção da molécula alvo da estrutura polimérica, sendo formadas cavidades com a forma, dimensão e complementariedade relativamente aos grupos funcionais dos monómeros[64].

As diferentes etapas da impressão molecular podem ser esquematizadas na figura seguinte.

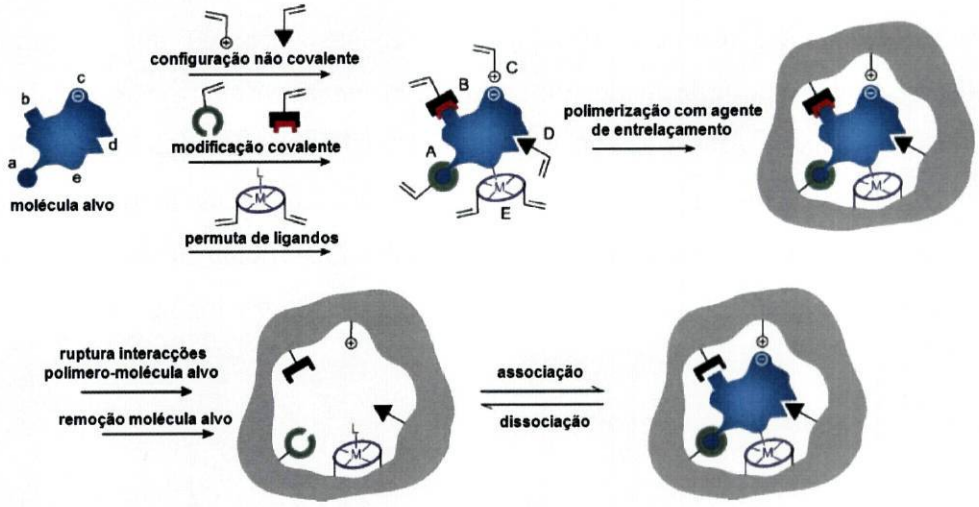


Figura 1.15 -*Representação esquemática do processo de impressão molecular*[55]*– A-ligações covalentes reversíveis; B-grupos de ligação polimerizados ligados covalentemente, os quais são activados por interacção não covalente pela ruptura com a molécula alvo; C-interacções electrostáticas; D-interacções hidrofóbicas ou de van der Walls; E-coordenação com um centro metálico; cada uma das interacções são complementares com os grupos funcionais ou elementos estruturais da molécula alvo (a-e) respectivamente. A polimerização com um agente de entrelaçamento, resulta na formação de uma matriz insolúvel na qual a molécula alvo reside. A molécula alvo é posteriormente removida do polímero por ruptura das interacções polímero-molécula alvo. A molécula alvo ou qualquer outro análogo pode posteriormente ligar-se ao polímero nos locais deixados pela molécula alvo*

As interacções entre os monómeros funcionais e a molécula alvo podem ser de diferente natureza, nomeadamente por pontes de hidrogénio, electrostáticas, apolares ou outro tipo de interacções não covalentes. Os monómeros funcionais ficam dispostos de uma forma relativamente ordenada, de forma a que os seus grupos funcionais fiquem complementares à molécula alvo.

A aleatoriedade que seria de esperar quando a molécula é retirada é minimizada, pois os monómeros funcionais encontram-se imobilizados no interior de uma estrutura polimérica para que a forma da molécula alvo esteja memorizada nestes polímeros[65].

Na figura 1.15 é possível observar que a formação do conjugado (ou aducto) depende do tipo de ligações que ocorre entre a molécula alvo e os monómeros funcionais, podendo ser de natureza covalente ou não covalente. Há ainda a considerar um caso particular, que consiste numa impressão híbrida em que ocorrem interacções covalentes/não covalentes.

1.6.2.1 Impressão covalente

A impressão covalente começou por ser utilizada em 1977 pelos elementos do grupo de Wulff[51], os quais sintetizaram um conjugado covalente, co-polimerizando-o com o metacrilato de metilo (monómero funcional) e com o etileno dimetacrilato (agente de entrelaçamento).

Como o próprio nome indica, neste tipo de impressão ocorre a ligação covalente entre o monómero funcional e a molécula alvo antes da polimerização. O conjugado covalente (deverá ser suficientemente estável, mas facilmente quebrado após polimerização em condições suaves) é posteriormente polimerizado mantendo-se as ligações covalentes.

Após a polimerização, a ligação covalente é quebrada e a molécula alvo é extraída do polímero. Durante o reconhecimento do polímero face à molécula alvo, é formada a mesma ligação covalente. Obviamente, para ser obtida a máxima eficiência neste tipo de impressão, quer a formação, quer a dissociação deverão ocorrer no menor tempo possível[65].

1.6.2.2 Impressão não covalente

Foi com Mosbach e colaboradores[64,66] que a impressão não covalente teve o seu início. Este grupo mostrou que as ligações entre os monómeros funcionais e as moléculas alvo não tinham de ser necessariamente covalentes, mas que era possível estabelecer estas ligações com interacções não covalentes, como interacções electrostáticas ou pontes de hidrogénio.

No processo de impressão não covalente, deixa de existir o conceito de ligação entre moléculas mas sim aproximação, podendo os aductos ser obtidos *in situ* por simples adição dos componentes e congelados nos polímeros. Após a polimerização, a molécula alvo é facilmente removida do polímero com solventes apropriados. Ao contrário da anterior, neste tipo de impressão, a interacção entre a molécula alvo e o polímero é de natureza não covalente.

De referir ainda que, apesar de qualquer tipo de interacção ser apropriada para este tipo de sistema, as ligações de hidrogénio ganham alguma relevância uma vez que dependem fortemente quer da distância, quer da posição relativa entre os monómeros e as moléculas

alvo[65]. Na tabela 1.4 apresenta-se algumas das vantagens e desvantagens destes dois tipos de impressão molecular.

Tabela 1.4 - Vantagens e desvantagens da impressão covalente vs impressão não covalente[65]

Tipo de impressão	Vantagens	Desvantagens
Covalente	- Conjugados estáveis e estequiométricos (processo mais "limpo"). - Podem ser utilizadas grandes variedades de condições de polimerização (temperaturas mais elevadas, valores extremos de pH, solventes polares ou apolares.	- Síntese do conjugado mais difícil e menos económica. - Número de ligações covalentes reversíveis limitado. - Eficiência da impressão em alguns casos é baixa devido à exigência de condições mais extremas. - Reconhecimento e quebra de ligações são lentos (ligação covalente).
Não covalente	- Não é necessária síntese dos conjugados (aductos). - Molécula alvo facilmente removida do polímero em condições suaves. - Ligação e quebra de ligação da molécula alvo mais rápida.	- Processo menos "limpo" (o aducto é lábil e não estritamente estequiométrico). - Condições de polimerização devem ser cuidadosamente escolhidas, de forma a minimizar a formação de aductos não covalentes na mistura. - Existindo monómeros funcionais em excesso (por forma a deslocar o equilíbrio no sentido da formação de aductos) há maior propensão à formação de locais de ligação não específicos, diminuindo a selectividade.

1.6.2.3 Impressão híbrida covalente/não covalente

Neste inovador método, foram combinados os dois tipos de impressão, covalente (processo mais limpo) e não covalente (reconhecimento rápido). Os polímeros são preparados no modo covalente, mas a molécula alvo é reconhecida através de interacções não covalentes. Esta metodologia tem sido muito utilizada actualmente uma vez que se torna possível incorporar as moléculas alvo nos locais desejados de forma fácil e económica[65].

Até ao momento, foram referidas as etapas envolvidas no processo, assim como alguns dos tipos de impressão molecular actualmente aceites, no entanto, certos factores experimentais são determinantes e contribuem de forma significativa para o sucesso da impressão. De seguida, descrever-se-á as características e funções específicas de cada um dos parâmetros experimentais inerentes a esta metodologia.

1.6.3 Factores que afectam a impressão molecular

1.6.3.1 Molécula alvo

A molécula alvo assume importância central no processo de impressão molecular, visto que é o factor determinante para a obtenção da selectividade inerente ao processo. Para além de influenciar a escolha dos monómeros, dá origem ao arranjo final dos grupos funcionais dos monómeros na cavidade, após a preparação do polímero.

Em termos de compatibilidade, a molécula alvo deverá obedecer a alguns requisitos, como por exemplo ser quimicamente inerte nas condições de polimerização, não possuir grupos polimerizáveis, não apresentar qualquer funcionalidade que iniba ou retarde a polimerização radicalar e ser estável a temperaturas relativamente elevadas[67].

- ***Optimização da concentração da molécula alvo***

A escolha dos monómeros funcionais é, naturalmente, um dos processos mais importantes na preparação de MIPs, uma vez que são estes que proporcionam as interacções complementares entre o substrato e a molécula alvo.

Depois de escolhida a razão M/X (razão entre monómeros funcionais e agentes de entrelaçamento), é possível optimizar a concentração da molécula alvo relativamente à quantidade de monómeros funcionais (T/M). Para a impressão covalente, não é necessário proceder à optimização, uma vez que a molécula alvo dita o número de monómeros funcionais à qual podem ser ligados covalentemente.

Pelo contrário, na impressão não covalente, a razão T/M deverá ser determinada empiricamente pela avaliação de diferentes polímeros com quantidades crescentes de molécula alvo[68]. Esta razão deverá ser tal que origine o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do aducto[65].

Do ponto de vista do mecanismo de formação, a origem de cada sítio de ligação no polímero está atribuída a uma molécula alvo individual que se encontra rodeada pelos monómeros funcionais no pré-polímero, ou seja, cada um dos complexos no pré-polímero dá geralmente origem a um sítio de ligação.

O equilíbrio pode ser deslocado no sentido da formação do complexo no pré-polímero aumentando quer a quantidade de monómero funcional, quer a quantidade de molécula alvo, ou mesmo ambas simultaneamente. No entanto, o aumento da concentração da molécula alvo resulta na diminuição da concentração do agente de entrelaçamento, ou seja, a razão X/M

torna-se menor. Como referido anteriormente, existe um limite mínimo para a razão X/M em que o polímero atinge a quantidade crítica de agente de entrelaçamento, para manter a fidelidade do sítio de ligação de um MIP.

Por outro lado, o complexo no pré-polímero pode ser estabilizado aumentando igualmente a concentração da molécula alvo. De facto, em teoria, esta concentração pode atingir valores muito elevados sem que ocorra qualquer alteração na composição dos monómeros funcionais no polímero.

No entanto, após uma determinada percentagem crítica de molécula alvo, qualquer excesso desta molécula não terá influência na formação dos sítios de ligação, ou seja, quando os monómeros funcionais se encontram completamente complexados, qualquer adição de molécula alvo não terá nenhum monómero com o qual complexar, e por esta razão não é esperado que ocorra um aumento do número dos sítios de ligação[68].

O comportamento esperado, dadas as anteriores considerações, resulta no perfil representado na figura 1.16 para moléculas alvo com um grupo funcionalizado, no entanto, estudos realizados com moléculas alvo com dois grupos funcionalizados, revelam um comportamento que se assemelha mais ao gráfico da figura 1.17, no qual se observa que o aumento da razão T/M maximiza a formação de complexos com dois pontos de ligação (pelo principio de Le Chatelier). No entanto, à medida que se aumenta mais esta razão, os sítios altamente selectivos que surgem dos dois pontos de ligação acabam por ser substituídos pelos sítios menos selectivos com um ponto de ligação.

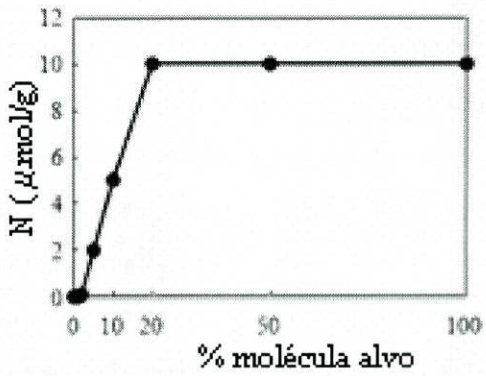


Figura 1.16 – *Comportamento teórico previsto para o gráfico de N versus % de molécula alvo quando apenas existe uma interacção entre o monómero funcional e a molécula alvo*[68] *– N representa o número total de sítios de ligação*

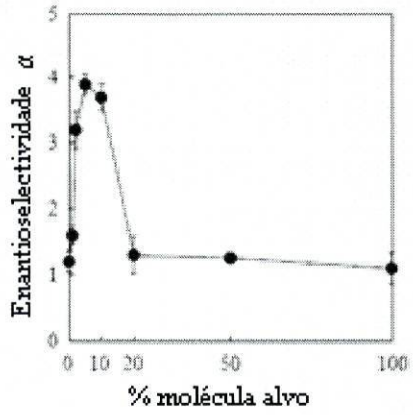


Figura 1.17 – *Exemplo de um gráfico que representa a selectividade cromatográfica versus % molar de molécula alvo (relativamente à concentração de monómero)*[68]

Uma vez mais, deverá ser realçado que as razões T/M devem ser empiricamente optimizadas com uma razão X/M fixa. Como referência, encontram-se na literatura valores de T/M na gama de 0,5 a 0,25 dependendo do tipo de molécula alvo, muito embora o processo de optimização se torne mais complexo com um maior número de monómeros.

Do referido, poderá ser inferido que as interacções múltiplas dos monómeros funcionais no polímero final, independentemente da estequiometria do pré-polímero, são determinantes na formação dos sítios de ligação com elevada afinidade verificados para a impressão não covalente[68].

1.6.3.2 Monómeros funcionais

Dado o papel que os monómeros desempenham no processo de impressão molecular (são responsáveis pelas interacções nos locais de impressão) torna-se importante fazer corresponder complementarmente a funcionalidade destes com a funcionalidade da molécula alvo, por exemplo, aceitador de protões com dador de protões, de forma a maximizar a formação do complexo (ver adiante) e assim a eficácia da impressão.

É igualmente importante ter em conta dois factores, nomeadamente a necessidade de controlar, durante a polimerização, a razão de reactividade entre os monómeros funcionais de modo a assegurar a co-polimerização e que a complexação de uma molécula alvo com o monómero pode afectar a reactividade dos monómeros como resultado de perturbações electrónicas ou estéricas dos mesmos[67].

- ***Optimização da razão entre monómeros funcionais e agentes de entrelaçamento (M/X)***

Tal como seria de esperar, os requisitos para uma impressão covalente e para uma impressão não covalente são necessariamente diferentes, principalmente no que diz respeito às razões entre os monómeros funcionais e os agentes de entrelaçamento.

a) Impressão covalente

A optimização deste parâmetro tem sido realizada testando a selectividade do polímero impresso, fazendo variar a razão entre os monómeros funcionais e os agentes de entrelaçamento. Num estudo realizado por Wulff *et al*[69], ficou patente que a selectividade enantiomérica aumenta com a maximização da quantidade dos agentes de entrelaçamento, a qual poderá atingir os 95% em alguns casos, relativamente à quantidade total dos monómeros[68].

b) Impressão não covalente

A optimização da razão M/X para a impressão não covalente torna-se um pouco mais complexa devido à optimização competitiva M/T no entanto, estudos realizados por Sellergren *et al*, os quais fixaram a quantidade de molécula alvo, revelaram que a percentagem de agente de entrelaçamento pode ser determinada (empiricamente) numa gama de 50 a 80% dependendo do monómero funcional utilizado[68].

1.6.3.3 Agentes de entrelaçamento

Num processo de impressão molecular, os agentes de entrelaçamento possuem três funções distintas. Em primeiro lugar, controlam a morfologia da matriz polimérica; em segundo lugar, funcionam como estabilizadores dos locais onde ocorre a impressão (tornam o polímero insolúvel em determinados solventes aumentando a sua gama de aplicação) e finalmente, conferem estabilidade mecânica à matriz.

Não se conhecendo ainda ao certo os efeitos da quantidade destes agentes, do ponto de vista da eficiência da polimerização, é geralmente preferível utilizar elevadas razões de agentes de entrelaçamento (normalmente na ordem dos 80%) de forma a ser possível obter garantidamente materiais porosos (macroporosos) e de elevada estabilidade mecânica[67].

Se por um lado razões molares muito pequenas originam a formação de locais de ligação demasiado próximos (que não conseguem actuar independentemente), por outro lado razões molares muito elevadas acabam por comprometer a eficiência do polímero, especialmente quando estes agentes apresentam interacções não covalentes com os monómeros funcionais e com a molécula alvo[65].

Da mesma forma que se deverá ter em consideração as razões de reactividade entre os monómeros funcionais (para assegurar a sua incorporação suave), também no que se refere aos agentes de entrelaçamento deverá existir uma complementaridade com os monómeros funcionais presentes na matriz polimérica (caso contrário, um deles poderia polimerizar predominantemente em relação ao outro e a co-polimerização não ocorreria em extensão suficiente)[67].

1.6.3.4 Solventes (ou agentes porogénicos)

O solvente possui um papel fundamental na formação de estruturas porosas dos MIPs uma vez que as propriedades morfológicas a nível de porosidade e de área de superfície são determinadas pelo tipo de solvente (agente porogénico) usado na polimerização.

A porosidade é originada pela separação de fases entre os agentes porogénicos e o polímero em crescimento durante a polimerização e assume grande importância, uma vez que durante o período de extracção promove maiores velocidades de ligação do polímero relativamente à molécula alvo[65].

Agentes porogénicos de baixa solubilidade são separados mais cedo tendendo a formar poros de grandes dimensões e materiais com baixa área superficial. Pelo contrário, solventes com elevada solubilidade separam-se mais tarde proporcionando materiais com poros de tamanho mais pequeno mas com elevada área superficial[68].

Os polímeros preparados na ausência de solventes são normalmente rígidos e densos e raramente se ligam a moléculas, pelo que na impressão molecular, os solventes afiguram-se de grande importância (apresentam capacidade de dispersar o calor de reacção, o qual poderia originar a ocorrência de reacções laterais), sendo incorporados durante a polimerização e removidos após tratamento[65].

No entanto, as propriedades e funções destes agentes variam consoante o tipo de impressão em que estão envolvidos, nomeadamente na complexação dos monómeros funcionais com a molécula alvo durante e após a polimerização. Antes (e durante) a polimerização, a extensão da complexação do pré-polímero não covalente depende da polaridade do solvente, ou seja, solventes menos polares promovem a formação dos aductos

não covalentes entre os monómeros e as moléculas alvo (princípio de Le Chatelier), facilitando interacções não covalentes polares, tais como pontes de hidrogénio ou interacções de sais iónicos. Por outro lado, solventes com características mais polares tendem a dissociar as interacções não covalentes no complexo do pré-polímero, em particular solventes próticos, que proporcionam um elevado grau de disrupção das ligações de hidrogénio[67], porém, favorecem outro tipo de interacções, como por exemplo as interações $\pi - \pi$[68].

No que se refere à impressão covalente, os solventes utilizam-se apenas para dissolver todos os componentes[65].

1.6.3.5 Efeito da temperatura

A polimerização de MIPs a baixas temperaturas origina normalmente polímeros com elevada selectividade, quando comparados com polímeros preparados a temperaturas mais altas. Novamente, a explicação para este facto tem por base o princípio de Le Chatelier, o qual prediz que, para reacções exotérmicas, temperaturas baixas promovem a complexação do pré-polímero e assim o aumento do número e possivelmente da qualidade dos sítios de ligação[68].

Por outras palavras, temperaturas mais baixas minimizam as vibrações moleculares da estrutura polimérica, aumentando a probabilidade de ocorrer complexação entre os monómeros e a molécula alvo durante a polimerização.

A evolução da impressão molecular durante os últimos anos tem demonstrado o seu grande potencial, particularmente após a introdução de polímeros orgânicos sintéticos em diversas aplicações como técnica de reconhecimento. Mais concretamente, a impressão molecular baseada em sistemas de polimerização acrílicos tem sido alvo de diferentes estudos em diversas aplicações, para além de ser a técnica mais extensivamente utilizada actualmente.

Por este motivo, será importante destacar a polimerização acrílica como técnica de impressão molecular para posteriormente se iniciar a abordagem à impressão molecular com polimerização sol-gel. Os conceitos gerais de impressão molecular aplicam-se quer quando se utilizam precursores acrílicos, quer quando se aplica a tecnologia sol-gel, no entanto, estas duas abordagens são distintas e portanto serão discutidas separadamente.

1.6.4 Impressão molecular acrílica

Neste tipo de impressão molecular, a co-polimerização pode ser realizada através de radicais livres (dois ou mais) e pela adição de agentes de entrelaçamento[67]. Na figura 1.18 são apresentadas equações química que traduzem exemplos de processos de polimerização associados a este tipo de impressão.

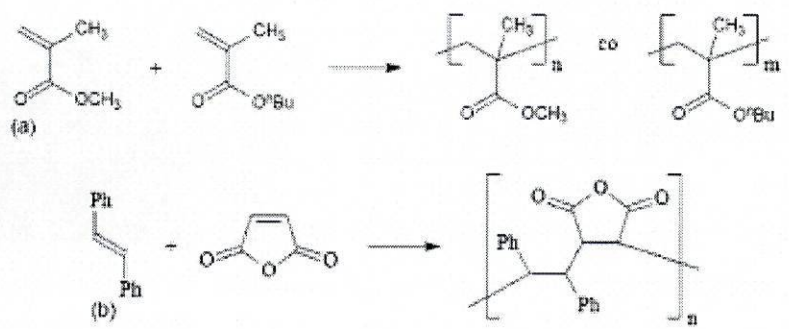


***Figura 1.18** – Exemplo de co-polimerização radicalar livre. (a) metil-metacrilato com n-butil-metacrilato (co-polímero aleatório) e (b) estilbeno com anidrido maleico (co-polímero de repetição específica)*[67]

O mecanismo de co-polimerização radicalar livre é actualmente o método de conversão de de monómeros a polímeros mais importante à escala industrial na preparação de plásticos. A grande facilidade de polimerizar monómeros vinílicos em condições suaves, a possibilidade de preparar polímeros em diferentes formas (partículas, solução, filmes, etc.) e a tolerância do sistema aos diversos grupos funcionais e a impurezas, torna este tipo de polimerização bastante atractivo para a impressão molecular.

A possibilidade de polimerizar dois ou mais monómeros acrílicos na mesma mistura permite obter produtos com propriedades químicas bastante diferentes dentro do mesmo sistema de polimerização. Porém, é necessário ter em consideração as reactividades relativas dos monómeros constituintes, pois estes não são consumidos à mesma velocidade e portanto torna-se difícil prever a distribuição das unidades dos monómeros no co-polímero. Apesar de já existirem na literatura as denominadas razões de reactividade para um dado par de monómeros, torna-se necessário proceder à escolha criteriosa dos monómeros durante a fase de design da síntese[67].

A polimerização realizada pela simples adição de agentes de entrelaçamento é um caso particular de co-polimerização na qual são adicionados monómeros com vários grupos funcionais (agentes de entrelaçamento) dando normalmente origem a três tipos de estruturas poliméricas com elevado grau de entrelaçamento: gel, macroporosas e poeira microgel[67].

Neste tipo de polimerização, deverá haver especial atenção em alguns dos parâmetros experimentais que governam as propriedades físicas do produto, tais como a razão entre agentes de entrelaçamento e monómeros funcionais ou o volume e natureza do solvente (ver secção 1.6.3).

Finalmente, nas figuras 1.19 e 1.20 apresentam-se, respectivamente, alguns dos monómeros funcionais e agentes de entrelaçamento normalmente utilizados na co-polimerização radicalar livre. Relativamente aos solventes utilizados, estes dependem do tipo de forças existentes durante o processo de polimerização, podendo abranger a gama de solventes polares a apolares geralmente utilizados em síntese orgânica, tal como supra referido.

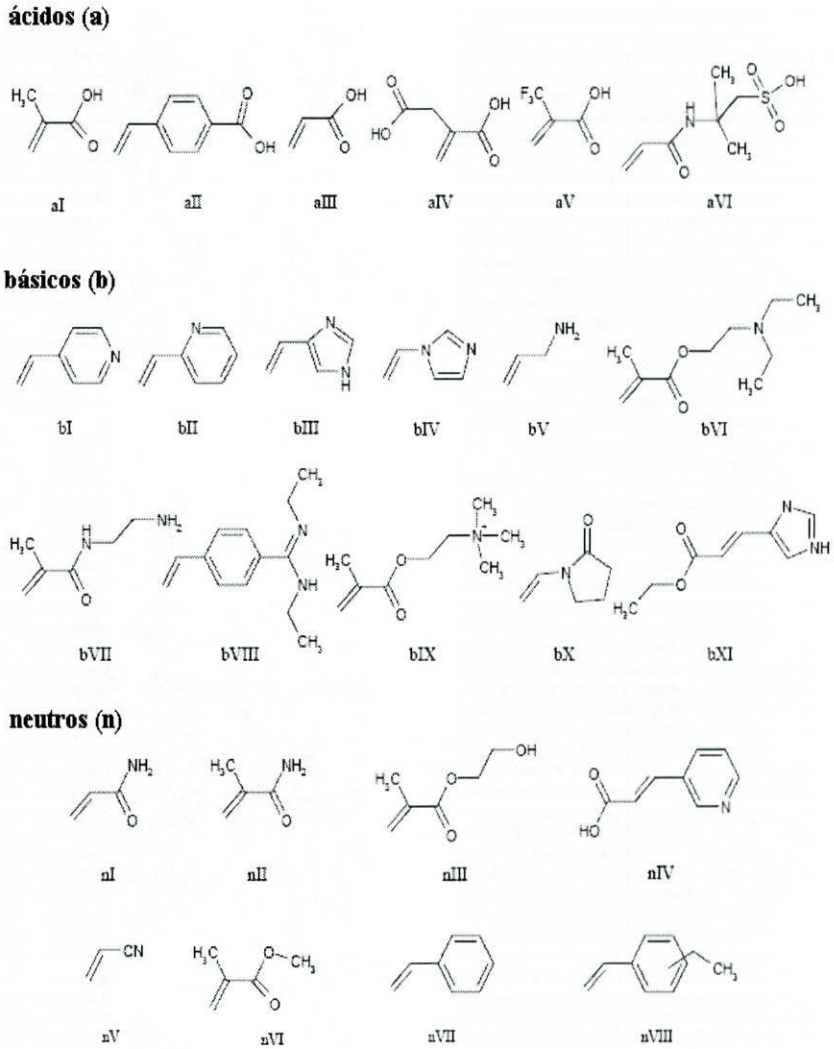


Figura 1.19 – *Monómeros funcionais normalmente utilizados em impressão molecular acrílica – ácidos, aI)ácido metacrílico (MAA); aII)ácido p-vinilbenzóico; aIII) ácido acrílico (AA); aIV)ácido itacónico; aV)ácido 2-(trifluorometil)-acrílico (TFMAA); aVI)ácido sulfónico acrilamido-(2-metil)-propano (AMPSA); básicos, bI)4-vinilpiridina (4-VP); bII) 2-vinilpiridina (2-VP); bIII)4-(5)-vinilimidazole; bIV) 1-vinilimidazole; bV)alilamina; bVI)N,N'-dietil aminoetilacrilamida (DEAEM); bVII)N-(2-aminoetil)-metacrilamida; bVIII)N,N'-dietil-4-estirilamidina; bIX)N,N,N-trimetil aminoetilmetacrilato; bX)M-vinilpirrolidona (NVP); bXI)éster urocanico de etilo; neutros, nI)acrilamida; nII)metacrilamida; nIII)2-hidroxietil metacrilato (2-HEMA); nIV)ácido trans-3-(3-piridil)-acrílico; nV)acrilonitrilo (AN); nVI)metacrilato de metilo (MMA); nVII)estireno; nVIII)etilestireno*[67].

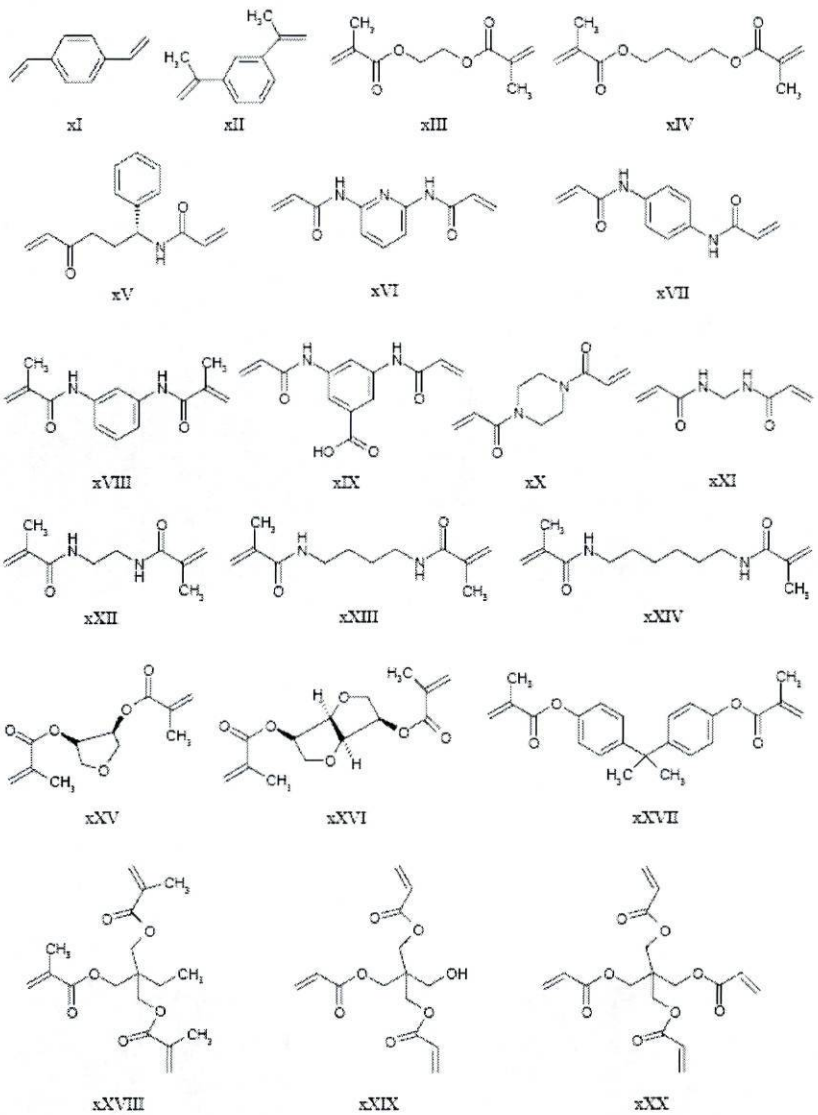


Figura 1.20 *- Agentes de entrelaçamento normalmente utilizados em impressão molecular acrílica – xI)p-divinilbenzeno (DVB); xII)1,3-diisopropenilbenzeno(DIP); xIII)etilenoglicoldimetacrilato(EGDMA); xIV)tetrametilenodimetacrilato(TDMA); xV)N,O-bisacriloil-L-fenilalaninol; xVI)2,6-bisacriloilamidopiridina; xVII)1,4-fenilenodiacrilamida; xVIII)N,N-1,3-fenilenobis(2-metil-2-propenamida(PDBMP); xIX)ácido 3,5-bisacrilamidobenzóico; xX)1,4-diacriloilpiperazina(DAP); xXI)N,N-metilenobisacrilamida(MDAA); xXII)N;N-etilenobismetacrilamida; xXIII)N,N-tetrametilenobismetacrilamida; xXIV)N,N-hexametilenobismetacrilamida; xXV)anidroeritritoldimetacrilato; xXVI)1,4,3,6-dianidro-D-sorbitol-2,5-dimetacrilato; xXVII)isopropilenobis(1,4-fenileno)dimetacrilato; xXVIII)trimetilpropanotrimetacrilato(TRIM); xXIX)pentaeritritoltriacrilato(PETRA); xXX) pentaeritritoltetracrilato(PETEA)*[67].

1.6.4.1 Exemplos de estudos actuais com impressão molecular acrílica

Esta secção destaca alguns dos mais importantes estudos realizados nos últimos anos, uma vez que, como referido, a impressão molecular acrílica tem sido das técnicas mais extensivamente estudadas.

Muitos são os trabalhos realizados ao longo dos anos utilizando a impressão molecular acrílica, quer através da configuração covalente (com aplicação em ácidos carboxílicos, compostos carbonilo ou dióis), quer através da não covalente (fazendo uso da grande variedade de monómeros funcionais). Grande parte destes trabalhos foram revistos por Whitcombe, M. *et al*[55].

Actualmente, a impressão molecular tem sido aplicada como fase estacionária em algumas técnicas de extracção, nomeadamente SPE, através da preparação de cartuchos para a extracção selectiva de clenbuterol[70] e 4-nitrofenol[71], triazínicos[72], clorotriazínicos[73], bupivacaína[74], 4-aminopiridina[75], análogos estruturais de propanolol[76], sulfonatos de naftaleno[77], sensores electroquímicos, como por exemplo em superfície de ouro para reconhecimento de colesterol[78], poli-(o-fenilenodiamina)[79], quinonas[80] e ciclodextrinas[81], em algumas técnicas cromatográficas, como para enchimento de colunas para HPLC na determinação de propazina[82], salicilaldeído–$Cu(OAc)_2$[83], fenilureia[84], ou na produção de filmes com espessura controlada[85].

Relativamente à SPME, o primeiro trabalho surgiu com Koster *et al*[86], os quais revestiram um substrato em sílica com uma polímero arcrílico usando clenbuterol com molécula alvo. Desde esta data, foram publicados alguns trabalhos usando a impressão molecular como sorvente em tubo revestido. Para aplicação em fibra destacam-se principalmente os estudos em que revestem o mesmo substrato com RAMs[87].

Ultimamente, porém, tem-se verificado um aumento do número de publicações aplicando a tecnologia sol-gel à impressão molecular, evidenciando uma segunda vaga de desenvolvimento com retorno à sílica impressa. Neste contexto, a secção seguinte descreve algumas das aplicações desta tecnologia à impressão molecular.

1.6.5 Impressão molecular com polimerização sol-gel

A grande maioria dos estudos de impressão molecular utiliza matrizes baseadas em acrilatos orgânicos, obrigando à utilização de solventes orgânicos nos quais todas as espécies sejam solúveis. As moléculas alvo solúveis apenas em meios aquosos não são normalmente aplicáveis a este tipo de impressão, tornando-o limitado para amostras ambientais e biológicas.

Apesar da impressão molecular em matrizes orgânicas abranger, até à data, uma grande gama de aplicações (separação cromatográfica, sensores químicos e biosensores, entre outros), tem surgido recentemente a aplicação da impressão molecular a matrizes inorgânicas (apesar de menos frequentemente), as quais apresentam algumas vantagens, como a rigidez estrutural e elevada área superficial[88]. Os materiais sol-gel surgem como um dos diversos tipos de matrizes característicos desta impressão molecular e são usados principalmente na preparação de matrizes inorgânicas 3D[89] e em matrizes híbridas orgânicas/inorgânicas.

O princípio geral da tecnologia sol-gel foi já descrito na secção 1.5.1, no entanto deverá ser relembrado que as reacções químicas que ocorrem durante o processo sol-gel influenciam significativamente as propriedades e composição do material final. Da mesma forma, as propriedades físicas (tamanho de poro médio, distribuição do tamanho de poro, forma do poro ou área de superfície) do gel seco dependem dos parâmetros e métodos usados durante a preparação do material.

Na figura seguinte apresenta-se um esquema representativo dos diferentes formatos da impressão molecular com polimerização sol-gel.

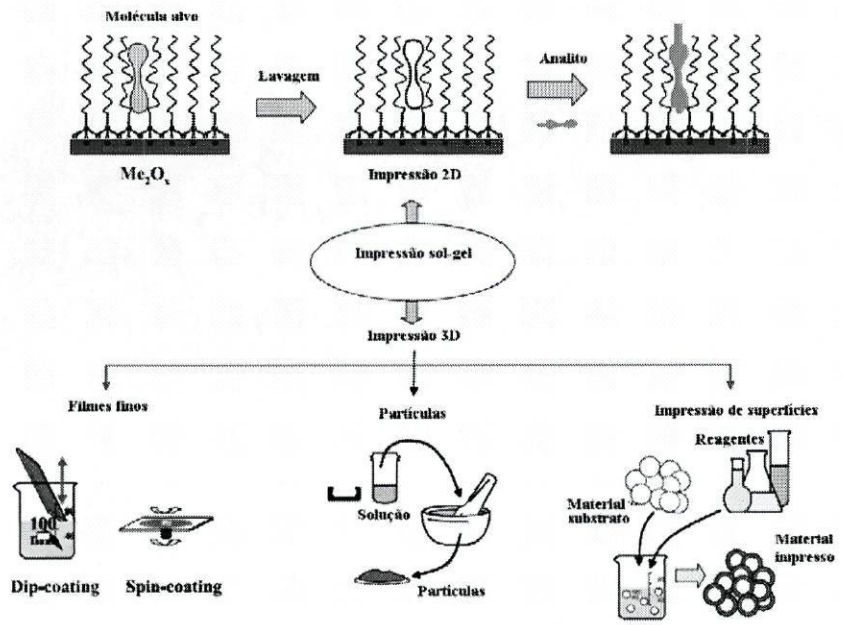


Figura 1.21 – Ilustração das diferentes aplicações da impressão molecular sol-gel[90]

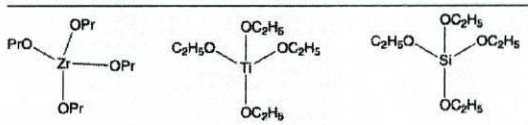
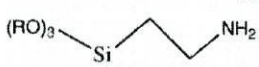
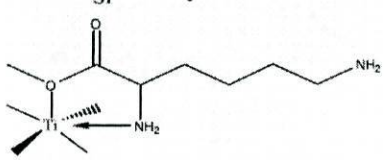
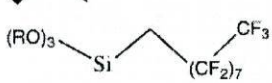
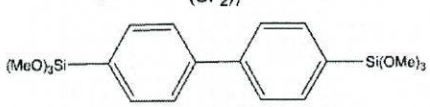
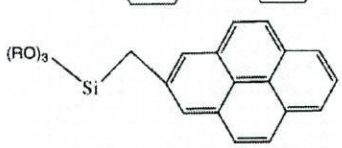
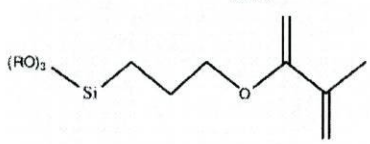
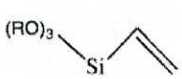
Até à data, os materiais sol-gel baseados em óxidos amorfos não demonstraram a mesma eficiência dos polímeros impressos baseados em acrílico, no entanto, possuem várias vantagens associadas, nomeadamente a elevada estabilidade térmica e a possibilidade de controlar a espessura, porosidade e área de superfície.

Na impressão molecular via sol-gel, é possível obter um filme impresso altamente ordenado através da reactividade selectiva de um determinado grupo do alcóxido metálico para com a superfície do substrato e simultaneamente através de interacções favoráveis com a molécula alvo[90].

A capacidade de reconhecimento relativamente à molécula alvo é definida pelo tipo de sítios activos ou pelo tipo de grupos funcionais da molécula alvo que foram utilizados durante a polimerização. Tal como na impressão acrílica, os parâmetros de polimerização na impressão molecular via sol-gel envolvem igualmente um elevado grau de complexidade, devendo-se por isso proceder a uma escolha criteriosa dos mesmos[91].

De seguida apresenta-se uma lista de alguns dos precursores frequentemente usados neste tipo de impressão molecular.

***Tabela 1.5** – Lista de alguns precursores utilizados em impressão molecular sol-gel*[90]

Precursores	Observações
	óxidos metálicos
	precursor hidrofílico
	precursor hidrofílico à base de titânio
	precursor hidrofóbico
	precursor com ligação orgânica pré-formada
	precursor fluorescente
	precursor polimerizável (radicalar)
	precursor de entrelaçamento

Na impressão molecular sol-gel, existem duas configurações que são mais extensivamente aplicadas, nomeadamente a abordagem auto-montada ou não covalente e a abordagem pré-organizada ou covalente, as quais permitem produzir matrizes poliméricas tri-dimensionais nas mais diversas formas (filmes finos e materiais porosos, entre outras).

1.6.5.1 Impressão covalente

Neste tipo de impressão molecular, são originadas ligações covalentes reversíveis, envolvendo normalmente uma etapa de síntese química de forma a ligar os precursores à molécula alvo ou a uma molécula estruturalmente semelhante para criar um "ocupante sacrificial".

O conjugado formado é posteriormente polimerizado através da acção de um excesso de precursor óxido metálico. Uma vez gerado o sol-gel, é retirada quimicamente a molécula alvo ou o "ocupante sacrificial" deixando um espaço com capacidade para se ligar a moléculas com o tamanho e forma apropriadas (figura 1.22)[90].

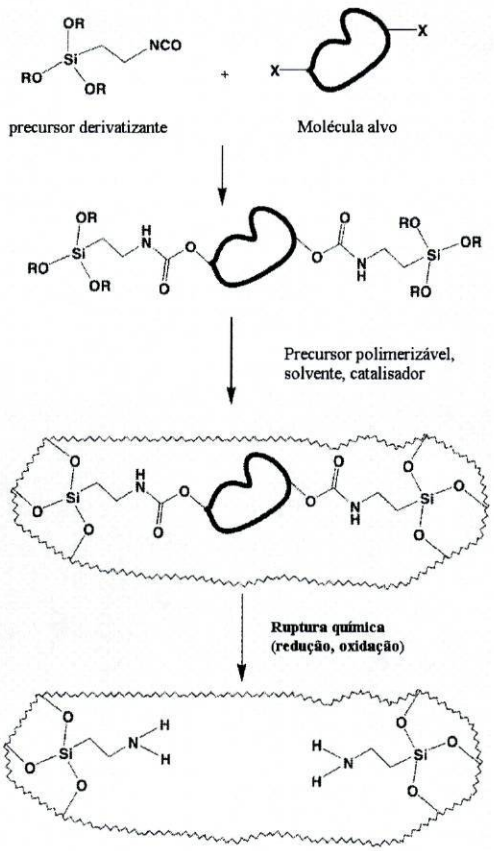


***Figura 1.22** - Esquema representativo das etapas características da impressão molecular sol-gel covalente*[90]

A eliminação de grupos residuais activos existentes nos polímeros sol-gel pode ser conseguida pela adição de reagentes terminadores para minimizar as interacções não

selectivas. Adicionalmente, de forma a manter os sítios de reconhecimento inalterados após a extracção do analito, são por vezes utilizados agentes químicos (juntamente com solventes orgânicos e/ou elevação da temperatura), como o H_2O_2 para destruir a molécula alvo[90].

1.6.5.2 Impressão não covalente

A impressão não covalente é caracterizada pela formação de complexo como resultado de interacções não covalentes ou de coordenação a um ião metálico. Após a hidrólise e condensação ácidas, a molécula alvo pode ser adicionada directamente à solução sol-gel.

Fazendo uso de solventes moderadamente polares e precursores sol-gel não polares, são originados sítios de impressão por interacções van der Walls, interacções π ou electrostáticas entre a molécula alvo e a rede sol-gel.

Nesta configuração, há necessidade de escolher criteriosamente os precursores de forma a originar a porosidade adequada para facilitar a difusão da molécula alvo (para dentro ou para fora) na estrutura sol-gel. A hidrólise de grupos alcóxido na presença da molécula alvo, seguida da condensação com um alcóxido metálico resulta na formação de materiais híbridos altamente entrelaçados.

Após a formação do polímero, deverá ser utilizado um solvente adequado para remover a molécula alvo, de forma a originar cavidades de reconhecimento específico capazes de interagir selectivamente com os analitos (figura 1.23)[90].

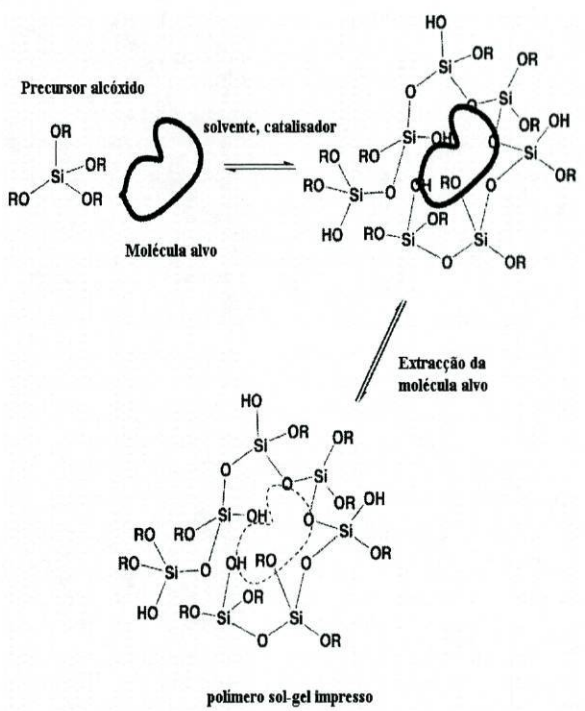


***Figura 1.23** – Esquema representativo das etapas características da impressão molecular sol-gel não covalente*[90]

1.6.5.3 Impressão híbrida covalente/não covalente

Um terceiro tipo de impressão molecular frequentemente utilizada consiste numa hibridação não covalente orgânica-inorgânica, caracterizada por uma mistura de monómeros alcóxidos metálicos com monómeros acrílicos (figura 1.24).

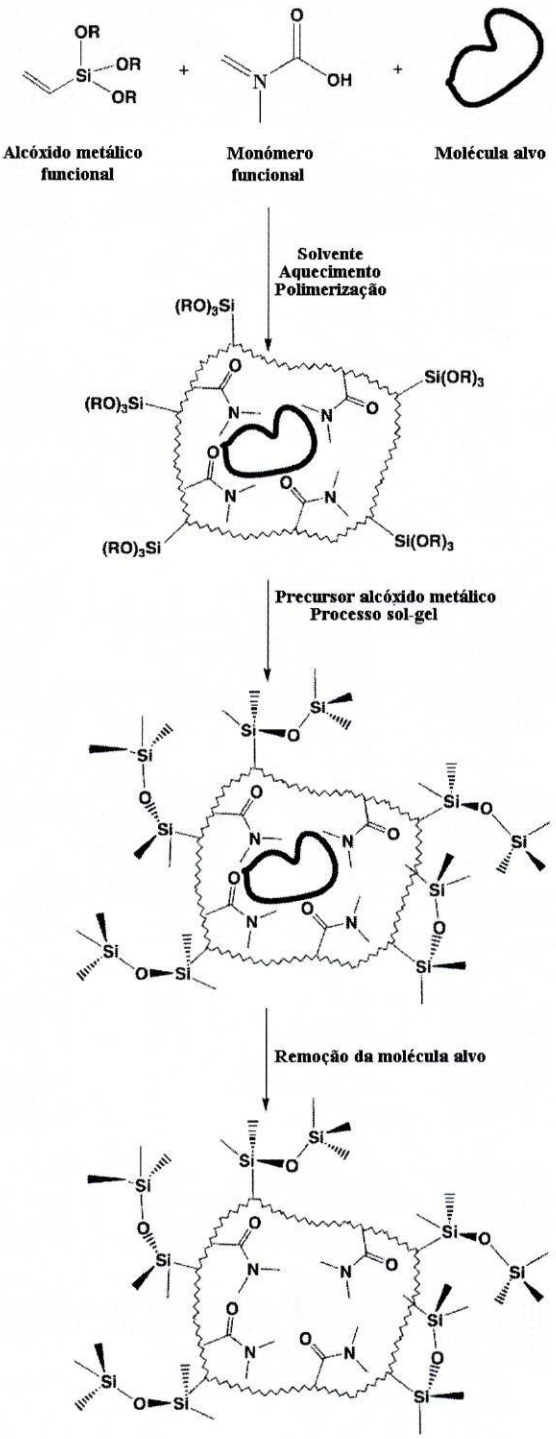


***Figura 1.24** - Esquema representativo das etapas características da impressão molecular sol-gel híbrida*[90]

1.7 Referências

1 Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; *J. Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2145

2 www.chem.sc.edu/analytical/chem621/lab/spme.html

3 Alpendurada, M. F.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, 3-14

4 Lord, H.; Pawliszyn, J.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 902, 17-63

5 Caruso, J.; Gbatu, T.; Sutton, K.; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 402, 67-79

6 Pawliszyn, J.; Zhang, Z.; *J. Anal. Chem.*, **1995**, 67, 34-43

7 Lord, H.; Pawliszyn, J.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, 153-193

8 Górecki, T.; Pawliszyn, J.; *Analyst*, **1997**, 122, 1079-1086

9 Mani, V. em: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, RSC, Cambridge, UK, **1999**, pp. 57-72

10 Górecki, T. em: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, RSC, Cambridge, UK, **1999**, pp. 92-108

11 Ulrich, S.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 902, 167-194

12 Li, S.; Weber, S. em: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction, RSC, Cambridge*, **1999**, UK, , pp. 49-55

13 Kataoka, H.; Lord, H.; Pawliszyn, J.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 800, 35-62

14 Borrull, F.; Marcé, R.; Peñalver, A.; Pocurull, E.; *Tr. Anal. Chem.*, **1999**, 18, 557-568

15 Liška, I.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, 3-16

16 Chong, L.; Hayes, J.; Malik, A.; Wang, D.; Wilhite, B. *et al*; *J. Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3889-3898

17 Mullett, W.; Pawlizyn, J.; *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, 251-260

18 Dean, J.; *Extraction Methods for Environmental Analysis*, **1998**, John Wiley & Sons; Chichesters, England

19 Hawthorne, B.; Tilotta, C.; Wittkamp, L.; *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1197-1203

20 Assadi, Y.; Djozan, D.; Haddadi, S.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4054-4058

21 Mehdinia, A.; Mousavi, M.; Shamsipur, M.; *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1134, 24-31

22 Bahar, S.; Djozan, D.; *Chromatographia*, **2004**, 59, 95-99

23 Mullett, W.; Pawliszyn, J.; Wu, J.; *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 4855-4859

24 Hageman, K.; Hawthorne, S.; Lee, M.; Liu, Y.; Yang, Y.; *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 5001-5005

25 Leidy, R.; Xia, X.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 2041-2047

26 Deng, H.; Du, X.; Gao, J.; Hou, J.; Ma, Q.; *Talanta*, **2004**, 62, 477-482

27 Cámara, C.; Dietz, C.; Sanz, J.; *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103, 183-192

28 Ding, L.; Giardina, M.; Olesik, V.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1060 (1-2), 215-224

29 Chen, H.; Dan, W.; Fang, N.; Feng, X.; Jiping, J.; Wang, Y.; *J. Env. Science and Health, Part A – Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **2002**, 37, 489-498

30 Jönsson, J.; Li, N.; Liu, J.F.; Liu, J.-M.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1066, 2

31 Crescenzi, C.; Ensing, K.; Hoedt, W.; Jong, G.; Koster, E.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 3140-3145

32 Siouffi, A.-M.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 801-818

33 Brinker, C.; Scherer, G.; *Sol–Gel Science – The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, **1990**, Academic Press, Nova Iorque

34 Sommerdijk, N.; Wright, J.; *Sol-Gel Materials – Chemistry and applications*, **2001**, Taylor & Francis

35 www.icmcb.u-bordeux.fr/duguet/postdea.html

36 http://www.chemistry.wustl.edu/~gelb/solgel.html

37 www.solgel.com

38 Han, H.; Wang, Z.; Wu, C.; Xiao, C.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 893, 157-168

39 Huang, Z.; Li, F.; Qiu, W.; Wei, X.; Yang, M.; Zeng, Z.; *J. Chromatogr. A*, **2001**, 934, 51-57

40 Yun, L.; *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 486, 63-72

41 Campos, E.; Campos, S.; Carasek, E.; Oliveira, A.; Silveira, C.; *Chromatographia*, **2005**, 61 (5-6), 277-283

42 Augusto, F.; Lopes, A.; *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1056 (1-2), 13-19

43 Azenha, M.; Malheiro, C.; Silva, A.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1069 (2), 163-172

44 Cai, L. ; Dong, L. ; Wu, C. ; Xing, J. ; *J. Chromatogr. A;* **2003**, 1015, 11-21

45 Gao, S; Li, H.; Li, X.; Zeng, Z.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1023, 15-25

46 Han, S.; Wang, Z.; Wu, C.; Xiao, C.; Xing, J.; *J. Chromatogr. A*, **2001**, 927, 121-130

47 Dong, L.; Wu, C.; Wu, L.; Xing, J.; Yu, J.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 978, 37-48

48 http://www.wordreference.com

49 Hunnius, M.; Maier W.; Rufińska, A.; *Microporous and Mesoporous Materials*, **1999**, 29, 389–403

50 Mosbach, K.; Ye, L.; *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **2001**; 41; 107–113

51 Grobe-Einsler, R.; Sarhan, A.; Wulff, G.; *Makromol. Chem.*, **1977**, 178, 2817 (consulta indirecta)

52 Dickey, F.; *The Preparation of Specific Adsorbents*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., , (**1949**), 35, 227–229 (consulta indirecta)

53 Mayes, A.; Whitcombe, M.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1742– 1778

54 Hodgson G.; Morrison J., Shaw D.; Worsley M.; *Can. J. Chem.*, **1959**, 37, 1986–1995 (consulta indirecta)

55 Alexander, C.; Andersson, H.; Andersson, L.; Ansell, R.; Kirsch, N.; Nicholls, I.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M.; *J. Mol. Recognit.*, **2006**, 19, 106-180

56 Colombo U.; Curti R.; *Chim. Ind.*, **1951**, 23, 103 (consulta indirecta)

57 Anderson P.; Beckett A.; *Nature*, **1957**, 179, 1074–1075 (consulta indirecta)

58 Anderson P.; Beckett A.; *J. Pharm. Pharmacol.*, **1959**, 11 (Suppl), 258T–260T (consulta indirecta)

59 Anderson P.; Beckett A.; *J. Pharm. Pharmacol.*, **1960**, 12, 228T–236T (consulta indirecta)

60 Sarhan, A.; Wulf, G.; *Angew. Chem.*, **1972**, 11, 341 (consulta indirecta)

61 Sagiv, J.; *Isr. J. Chem.*, **1979**, 18, 346-353 (consulta indirecta)

62 Chailapakul, O.; Crooks, R.; *Langmuir*, **1993**, 9, 884-888

63 Hatakeyama, H.; Kurihara, K.; Tabushi, L.; Yamamura, K.; *Tet. Lett.*, **1987**, 28, 4299-4302 (consulta indirecta)

64 Haupt, K.; Mosbach, K.; *J. Mol. Recogn.*, **1998**, 11, 62-68

65 Asanuma, H.; Komiyama, M.; Mukawa, T.; Takeuchi, T.; *Molecular imprinting – From Fundamentals to applications*, Wiley-VCH, **2003**, Alemanha

66 Arshady, R.; Mosbach, K.; *Macromol. Chem.*, **1981**, 182, 687 (consulta indirecta)

67 Cormack, P.; Elorza, A.; *J. Chromatogr. B*, **2004**, 804, 173-182

68 Spivak D.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1779–1794

69 Kemmerer, R.; Poll, H.; Vietmeier, J.; Wulff, G.; *Nouv. J. Chim.*, **1982**, 6, 681-687 (consulta indirecta)

70 Bayoudh, S.; Berggren, C.; Ensing, K.; Sherrington, D.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889; 105-110

71 Borrull, F.; Cormack, P.; Marcé, R.; Masqué, N.; Sherrington, D.; *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 4122-4126

72 Fujiwara, K.; Matsui, J.; Takeuchi, T.; Ugata, S.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, 25-31

73 Barceló, D.; Ferrer, I.; Horvai, G.; Horvath, V.; Lanza, F.; Sellergren, B.; Tolokan, A.; *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3934-3941

74 Andersson, L.; *Analyst*, **2000**, 125, 1515–1517

75 Dirie, M.; Guob, H.; He, X.; Lai, E.; Mullett, W.; *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 414, 123–131

76 Jones, G.; Martin P.; Wilson, I.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, 143 –147

77 Caroa, E.; Cormack, P.; Marcéa, R.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1047, 175–180

78 Piletsky, S.; Piletskaya, E.; Sergeyeva, T.; Panasyuk, T.; Elskaya, A.; *Sens. Actuators B*; **1999**, 60, 216–220

79 Cheng, Z.; Wang, E.; Yang, X.; *Biosens. Bioelectron*, **2001**, 16, 179–185

80 Doron A.; Katz E.; Lahav M.; Patolsky F.; Willner I.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 862–863

81 Bilewicz, R.; Chmurski, K.; Temeriusz, A.; *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 5687–5691

82 Martin-Esteban, A.; Sellergren, B.; Tamayo, F.; Titirici, M.; *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542, 38–46

83 Yang, M.; Yuan, Z.; *J. Mol. Recognit.*; **2005**; 18, 103–108

84 Martin-Esteban, A.; Tamayo, F.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1098. 116–122

85 Haupt, K.; Mosbach, K.; Schmidt, H.; *Adv. Mater.*, **2004**, 16 (8), 719-722

86 Crescenzi, C.; de-Jong, G.; den-Hoedt, W.; Ensing, K.; Koster, E.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 3140–3145

87 Mullett, S.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.*, **2002**, 74,1081–1087

88 Cummins, W.; Duggan, P.; McLoughlin, P.; *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542, 52-60

89 Kunitake, T.; Lee, S.; Yang, D.; *Sensors and Actuators B*, **2005**, 104, 35-42

90 Garcia-D. M.; Laíño, R.; *Microchim. Acta*, **2005**, 149, 19-36

91 Matsui, M.; Mizukami, F.; Sakaguchi, K.; Shiomi, T.; *Biomaterials*, **2005**, 26, 5564-5571

Capítulo 2

2 *Desenvolvimento de fibras com partículas de sílica funcionalizada imobilizadas numa matriz sol-gel*

Sumário

2.1. INTRODUÇÃO
2.2. SECÇÃO EXPERIMENTAL
2.3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS
2.4. CONCLUSÃO
2.5. REFERÊNCIAS

2.1 Introdução

Nos últimos anos, têm sido realizados vários esforços no sentido de desenvolver novos revestimentos para SPME através de diferentes técnicas e para as mais diversas aplicações, sendo a tecnologia sol-gel (ver secção 1.5.1) a metodologia com mais representação na literatura.

Os revestimentos sol-gel têm provado ser mais estáveis a temperaturas elevadas e solventes orgânicos do que os revestimentos comerciais devido à ligação covalente do filme ao substrato. O substrato geralmente mais utilizado para estes revestimentos tem sido a fibra de sílica fundida, no entanto foi demonstrado muito recentemente que os revestimentos sol-gel podem igualmente ligar-se covalentemente a um substrato de titânio[1,2]. Este tipo de substrato traduz uma vantagem significativa pois ultrapassa a limitação relacionada com a fragilidade da fibra.

A tecnologia sol-gel permite também modelar a selectividade através da possibilidade de introduzir diferentes funcionalidades químicas na mistura sol-gel. Tal como referido anteriormente (secção 1.4.4.3), têm sido desenvolvidos novos revestimentos para SPME através da deposição física de um material poroso num substrato (metálico ou sílica fundida) usando cola epóxi de alta temperatura, como por exemplo, partículas de sílica funcionalizada com C_8 e C_{18}[3,4], sílica orgânica / inorgânica mesoporosa[5] e materiais de acesso restrito – RAMs[6,7,8]. A principal vantagem desta abordagem reside na possibilidade de incorporar uma grande variedade de material poroso (ou outros materiais especializados) facilmente disponível, com partículas bem caracterizadas e com dimensões controladas para aplicação em SPME.

Deste modo, estes revestimentos apresentam uma capacidade de adsorção controlada pela dimensão do poro, permitindo simultaneamente que a adsorção possa ser modelada pela incorporação de partículas com grupos funcionalizados pré-determinados durante a sua síntese. No entanto, estes revestimentos apresentam duas grandes desvantagens, nomeadamente a decomposição da cola epóxi a temperaturas acima dos 270ºC e a instabilidade em alguns solventes orgânicos[9].

O presente estudo apresenta uma fibra que explora a possibilidade de substituir a cola epóxi por um revestimento sol-gel à base de PDMS. Se as partículas (neste caso de sílica funcionalizada com C_{18}, ciclohexildiol e fenilo) puderem ser incorporadas na matriz sol-gel mantendo as suas propriedades de adsorção, então será possível obter um novo tipo de fibra

para SPME, termicamente mais estável e resistente a solventes orgânicos do que as fibras à base de cola epóxi.

Por outro lado, o substrato em liga de titânio utilizado neste estudo apresenta vantagens relativamente ao fio de titânio convencional (o qual é maleável, e portanto fácil de dobrar), aumentando ainda mais a robustez mecânica da fibra. Assim, a preparação deste tipo de fibra, para além de permitir o controle da selectividade, tornaria possível ultrapassar as limitações impostas quer pela fragilidade da fibra óptica (e do titânio convencional), quer pela decomposição da cola epóxi a temperaturas superiores a 270°C.

2.2 Secção experimental

2.2.1 Material e reagentes

Para além do material de vidro corrente de laboratório, foi utilizado um suporte para SPME *Supelco,* tubos PCR de capacidade 1,5mL, frascos de vidro de capacidade 22mL (*Supelco*), septos *Supelco* PTFE/Silicone para frascos de 22mL, barras magnéticas, 15mm x 7mm (*Kartell*), agitador *IKA* – modelo *yellow line (TTS)*, agitador magnético *Falc* – modelo *F 60*, banho termostatizado (cabeça de aquecimento GRANT, tipo KM), vaso de paredes duplas e um cromatógrafo gasoso (ver especificações adiante), fibra óptica (tabela 2.1) e fio em liga de titânio (Ti:Al:V (90:6:4); d.i.=250μm).

Os reagentes utilizados neste estudo foram: PDMS hidroxi-terminado (PDMS-HO), metiltrimetóxisilano (MTMOS), ácido trifluoroacético (TFA, 98%) e 2-octanona, benzeno, tolueno, etilbenzeno, benzaldeído, acetofenona e dimetilfenol.

Foram igualmente utilizadas partículas de sílica (tamanho de poro de 60Å) funcionalizadas (C_{18}, fenilo e ciclohexildiol) e partículas de sílica não funcionalizada. Todos os reagentes foram usados tal como recebidos, à excepção do TFA, o qual foi diluído a 95% com água e das partículas de sílica que foram trituradas e peneiradas até se obter um intervalo de tamanho de partículas entre 45 e 75μm.

Antes da utilização, todo o material de vidro e de plástico, foi descontaminado de um dia para o outro em ácido nítrico a 20% e lavado várias vezes em água desionizada de qualidade MilliQ (Millipore, Billerica).

2.2.1.1 *Caracterização da fibra óptica*



***Figura 2.1** - Imagem da fibra óptica recolhida por SEM.*

***Tabela 2.1** - Caracterização da fibra óptica*

Constituição	*Material*	*Diâmetro (μm)*
Núcleo óptico	Sílica com dopagem de germânio (6%)	8,3
Bainha	Sílica pura	125 ± 2
Revestimento primário	Dupla camada de poliacrilato	245 ± 10

2.2.1.2 *Caracterização do fio em liga de titânio*

***Tabela 2.2** – Características do fio em liga de titânio*

Composição (%)	*Marca*	*Diâmetro (μm)*
Ti = 90 **Al** = 6 **V** = 4	Goodfellow	250

2.2.2 *Metodologias*

2.2.2.1 *Pré-tratamento do fio em liga de titânio e da fibra óptica*

As fibras ópticas e os fios em liga de titânio, foram tratados por imersão em NaOH 1M durante uma hora, com posterior lavagem em metanol e água. De seguida, e de modo a retirar o excesso de aniões hidróxido, foram expostos a HCl 0,1M durante 30 minutos, lavando-se novamente com metanol e água.

No caso particular das fibras ópticas, antes de se efectuar o tratamento propriamente dito, foram cortadas porções com cerca de 12cm e descarnadas da camada de poliacrilato por imersão em diclorometano puro durante alguns segundos, tendo-se o cuidado de deixar uma pequena porção de cerca de 3mm. As fibras em liga de titânio, foram cortadas em porções de 9,4cm e tratadas de igual forma.

2.2.2.2 Preparação das fibras

a) Mistura sol-gel

A mistura sol-gel utilizada como revestimento nos estudos em fibra óptica e no fio em liga de titânio foi preparada com base no trabalho desenvolvido por Malik *et al*[10], por adição, num tubo PCR (1,5mL) de: 180mg (aproximadamente) de PDMS, 300µL de MTMOS e 200µL de TFA a 95%, seguida de agitação durante 30s a 2200r.p.m. e de repouso durante 5 minutos. Após este período de separação de fases, a camada superior foi removida com uma seringa e foi utilizada a camada inferior para proceder ao *dip-coating*.

b) Montagem e revestimento

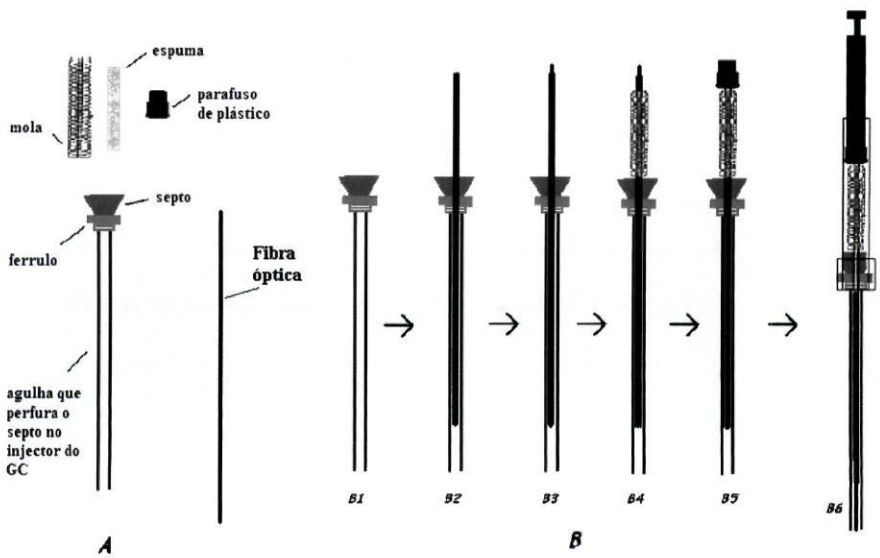


Figura 2.2 *- Ilustração representativa das diferentes fases de montagem de uma fibra para SPME. As letras A e B correspondem, respectivamente aos conjuntos de peças antes e após a montagem do dispositivo, enquanto que as letras B1 a B6 correspondem à sequência de montagem*

Uma porção de cerca de 12cm de fibra óptica tratada e de 9,4cm no caso da fibra em liga de titânio, foi colocada no tubo vedado com septo. Este tubo foi previamente tratado em metanol durante cerca de 24h, de modo a garantir a inexistência de qualquer impureza proveniente de utilizações anteriores. Esta operação exige extremo cuidado no manuseamento de ambas as fibras, pois estas podem ser facilmente quebradas ou dobradas. Após a montagem (figura 2.2 – B6), foi cortada uma porção da fibra, de modo a que ficasse exposta 1,0cm.

É possível observar as diferentes etapas da adaptação das fibras ao suporte para SPME da *Supelco*, denominadas por B1, B2, B3, B4, B5 e B6. A montagem inicia-se perfurando o septo com o tubo metálico (B2), seguida da inserção (pela porção descarnada) da fibra óptica nesse

mesmo tubo metálico e tendo sempre cuidado no manuseamento da fibra, de modo a não promover o seu contacto com qualquer superfície (B3).

Nos esquemas B4 e B5 encontra-se representada a inserção da mola e a colagem do tubo metálico ao parafuso de plástico (foi usada cola Araldit que se deixou secar durante 24h antes de usar a fibra). O dispositivo foi posteriormente inserido no suporte manual para SPME (Supelco) para o processo de revestimento (esquema B6 da figura 2.2).

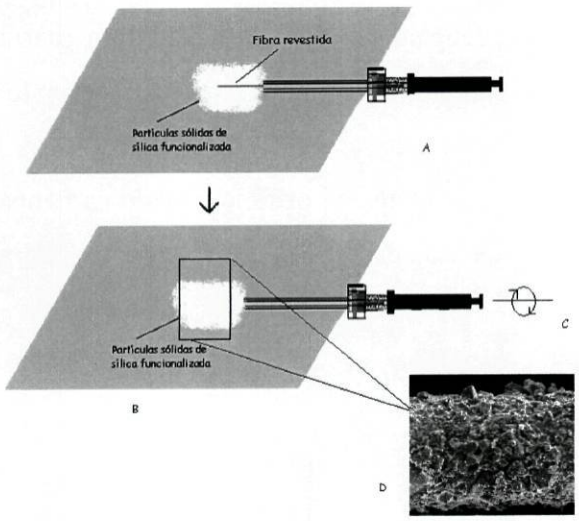


***Figura 2.3** – Ilustração da incorporação das partículas de sílica funcionalizada no revestimento sol-gel (figura D obtida através de SEM)*

O revestimento foi realizado por *dip-coating* através de exposição e imersão vertical de uma porção de fibra (1cm) no interior de um tubo PCR contendo a mistura sol-gel, durante 20min, à temperatura ambiente. Após este período, a fibra foi cuidadosamente coberta com uma porção de partículas, pressionando-as contra o revestimento sol-gel de modo a que as partículas ficassem agarradas (figura 2.3).

A fibra foi depois deixada a secar durante 24h e de seguida mergulhada numa nova mistura sol-gel (mesmo procedimento descrito anteriormente). Após outras 24h, as fibras foram acondicionadas durante 30min a 300ºC no interior do injector do GC sob fluxo de azoto. Foram preparadas fibras de referência pelo mesmo processo, mas sem incorporação das partículas de sílica.

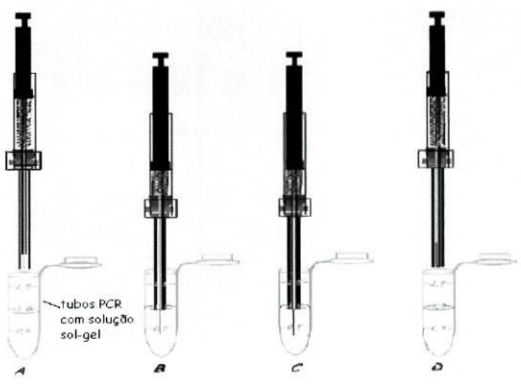


***Figura 2.4** - Ilustração do revestimento por dip-coating da fibra óptica com solução sol-gel*

2.2.2.3 Avaliação da capacidade de extracção por GC

Antes de se proceder à primeira extracção, as fibras foram acondicionadas durante 1h a 300ºC no injector do GC, sob um fluxo de azoto. Para o procedimento de extracção foi utilizada uma solução preparada diariamente contendo 0,5mg/L dos seguintes solutos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, 2-octanona, benzaldeído, acetofenona e dimetilfenol.

As extracções foram realizadas no *headspace* de *vials* para SPME (23 x 85mm) contendo um volume de solução de 10mL, a qual foi magneticamente agitada a 1000rpm (barra de agitação magnética de 12 x 4,5mm). A temperatura e o tempo de extracção foram respectivamente de 40ºC e 30min.

A introdução da agulha foi efectuada através de um pequeno orifício situado na tampa do frasco perfurando o septo (ver figura 2.6). Para cada uma das fibras, a extracção foi realizada em triplicado.

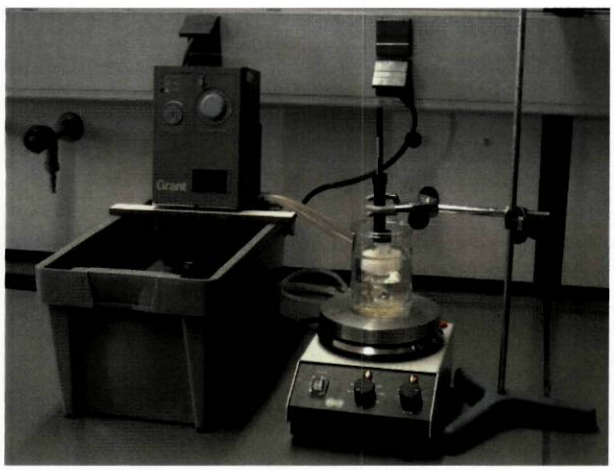


Figura 2.5 *– Fotografia da montagem para extracção*



Figura 2.6 *– Ilustração das fases do procedimento de extracção e posterior desadsorção no injector do GC: A e B) exposição da fibra ao headspace da amostra; C) adsorção do analito; D) recolha da fibra; E, F e G) desadsorção dos analitos no interior do GC*

Este estudo teve como objectivo fundamental a comparação entre as diferentes capacidades de extracção dos vários tipos de fibras preparadas. Para tal, utilizaram-se um total de 8 fibras, divididas em dois grupos: fibras ópticas e fibras em liga de titânio.

Dentro de cada grupo, utilizou-se uma fibra de referência apenas com o revestimento sol-gel (fibra PDMS) e mais quatro fibras com partículas sólidas funcionalizadas com os grupos

C_{18} (fibra C_{18}), fenilo (fibra Ph) e ciclohexildiol (fibra CHD) e sílica não funcionalizada incorporadas no revestimento sol-gel.

As determinações por GC foram efectuadas num instrumento Perkin-Elmer, AutoSystem XL equipado com um injector split/splitless, uma coluna capilar Supelco SPB-5 (comprimento de 30m, diâmetro interno de 0,25mm e espessura de filme de 0,25μm) e um detector de ionização por chama (FID).

Os parâmetros instrumentais foram os seguintes: (i) injector – 300ºC, modo splitless (1min) deixando a fibra durante mais 4 minutos com a válvula split ligada, para assegurar uma limpeza completa; (ii) fluxo na coluna – 1,6mL/min de N_2; (iii) programa de temperaturas – 50ºC (2min) com um aumento gradual de 10ºC/min até 180ºC (15min); (iv) parâmetros do detector – fluxo de H_2 (40mL/min), fluxo de ar enriquecido com O_2 (480mL/min), temperatura de 270ºC.

2.2.2.4 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)



***Figura 2.7** - Representação da montagem experimental para análise SEM*

Para a análise das fibras através de SEM, ao invés de se inserir a fibra no tubo metálico e depois adaptá-lo ao tubo exterior (figura 2.2.), introduziu-se directamente a fibra no tubo exterior previamente vedado com septo (figura 2.7).

Posteriormente, o revestimento e acondicionamento foram realizados com o mesmo procedimento adoptado na produção das fibras para extracção.

As fibras revestidas, após remoção do tubo exterior, foram cortadas com lâmina de bisturi de modo a que uma pequena porção ficasse assente sobre uma fita adesiva de carbono, sendo posteriormente recoberta com uma pequena porção da mesma fita (deixando uma extremidade descoberta) – figura 2.8.



Figura 2.8 *– Fotografia do suporte com as fibras para análise SEM*

De acordo com a entidade que proporcionou a análise das amostras, o Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), o tratamento da amostra consiste na pulverização desta com ouro formando um fino filme de modo a torná-la boa condutora eléctrica. Para o efeito foi utilizado um microscópio JEOL JSM-6301F (Peabody, MA) com 1,3nm de resolução.

2.2.2.5 Estudo das cinéticas de extracção de tolueno, 2-octanona e dimetilfenol

As cinéticas de extracção do tolueno, xileno, 2-octanona e dimetilfenol foram estudadas usando a fibra contendo partículas de sílica funcionalizada com C_{18} e fazendo variar o tempo de extracção entre 10 e 109min. Todos os outros parâmetros de extracção foram já referidos na secção 2.2.2.3.

2.2.2.6 Extracção multi-componente versus componente único

Este estudo foi realizado com a fibra contendo partículas de sílica funcionalizada com C_{18} e procedeu-se à extracção do analito tolueno (0,2 a 10mg/L) a partir de soluções contendo apenas este componente ou contendo igualmente 10mg/L de etilbenzeno. Uma vez mais, os parâmetros de extracção estão descritos na secção 2.2.2.3.

2.3 Apresentação e discussão dos resultados

Na primeira fase deste estudo, foram consideradas várias abordagens no que respeita à incorporação das partículas de sílica na fibra para SPME com revestimento sol-gel. A primeira tentativa consistiu na preparação de uma espessa mistura de partículas de sílica funcionalizadas com C_{18} (100mg) numa mistura sol-gel (cerca de 600µL) e subsequente deposição numa lâmina de vidro.

Posteriormente, foi colocado um fio em liga de titânio (e fibra óptica) no interior da mistura durante 5min, resultando na sua adesão ao fio. Adicionalmente, foi observado que a porção que permaneceu no fio não se separou após imersão em metanol sob agitação vigorosa, dando boas indicações relativamente à estabilidade mecânica das partículas incorporadas.

A maior vantagem desta abordagem foi a grande quantidade de partículas existentes na mistura e consequentemente no fio em liga de titânio (ou fibra óptica). No entanto, a existência de grandes aglomerados nos revestimentos (altamente irregulares em termos de superfície) impediram que o substrato se ajustasse ao interior do tubo exterior do suporte comercial para SPME, originando assim o abandono deste método de preparação.

A segunda abordagem consistiu na aplicação do revestimento sol-gel aos substratos, proporcionando o seu contacto com uma quantidade de partículas de sílica de tal forma que estas aderissem ao revestimento sol-gel. Esta técnica, semelhante à já usada por adesão das partículas com cola epóxi, teria a vantagem de permitir o contacto directo entre as partículas e a amostra, uma vez que estas não estariam incorporadas na matriz sol-gel. No entanto, foi observada a perda de uma grande quantidade de partículas através de ligeiras vibrações ou imersão em metanol.

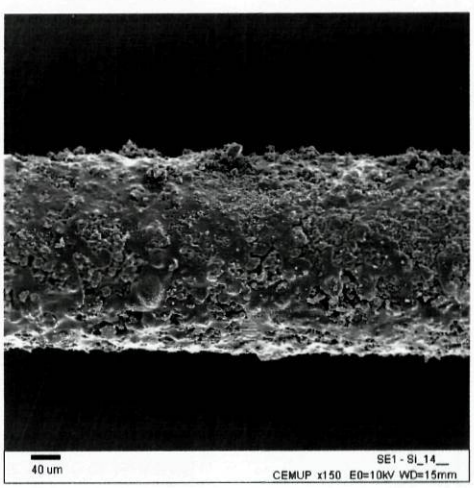


***Figura 2.9** – Imagem obtida através de SEM de uma fibra em liga de titânio revestida com a mistura sol-gel com partículas de sílica*

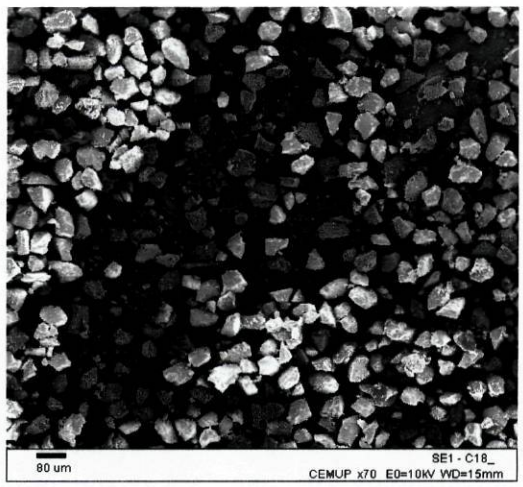


Figura 2.10 *– Imagem obtida através de SEM das partículas de sílica funcionalizada com C_{18} após peneiração entre 45 e 75μm*

Finalmente, o procedimento adoptado consistiu numa ligeira modificação da abordagem anterior aplicando um segundo revestimento sol-gel sobre as partículas, permitindo assim um aprisionamento estável entre dois revestimentos relativamente finos e homogéneos.

Deverá no entanto ressalvar-se que, apesar das partículas terem sido cuidadosamente peneiradas de modo a obter partículas com dimensões entre 45 e 75μm, as imagens SEM mostram claramente que as dimensões das partículas incorporadas são muito inferiores a esse intervalo (figura 2.9). De facto, as imagens SEM das partículas de sílica revelam algumas partículas com dimensões inferiores ao esperado, devido provavelmente à manipulação destas após a peneiração (figura 2.10).

2.3.1 Capacidade de extracção das fibras

Seria de esperar que a incorporação das partículas de sílica funcionalizada alterasse a capacidade de extracção e especialmente a selectividade das fibras. De facto, presumia-se que as partículas funcionalizadas com ciclohexildiol conferissem às fibras um carácter suficientemente polar de forma a aumentar a capacidade de extracção relativamente a compostos polares. Da mesma forma, seria de esperar que as partículas de sílica funcionalizada com o grupo fenilo aumentassem a sua afinidade para com compostos aromáticos e que as partículas com funcionalização C_{18} conferissem um carácter hidrofóbico mais pronunciado. As fibras contendo partículas de sílica não funcionalizada foram preparadas com o objectivo de observar o efeito da presença das partículas no revestimento com PDMS.

A figura 2.11 apresenta os resultados obtidos para a extracção da mistura de compostos com um conjunto de fibras preparadas. Considerando a fibra de PDMS sem partículas como referência, pode ser observado que a inclusão de partículas de sílica (não funcionalizada e funcionalizada com C_{18}) resultou num aumento significativo na capacidade de extracção, enquanto que a incorporação das partículas funcionalizadas com fenilo e com ciclohexildiol não provocou qualquer efeito significativo na eficiência de extracção.

Em nenhum dos casos, porém, a selectividade foi significativamente alterada em comparação com a fibra contendo apenas PDMS, dado que todas as fibras exibiram uma afinidade preferencial relativamente a compostos apolares (cadeia longa ou aromáticos).

Uma possível explicação para estes resultados inesperados é avançada: a inclusão de partículas, por si só, aumenta a área disponível para a deposição de PDMS, permitindo assim uma maior quantidade da fase sol-gel a revestir os substratos, tornando-se esta a fase dominante em termos de selectividade.

Esta explicação está de acordo com o elevado aumento da capacidade de extracção da fibra com partículas de sílica não funcionalizada e com a selectividade inalterada em todas as fibras, porém, não explica a razão pela qual a incorporação de partículas funcionalizadas com fenilo e com ciclohexildiol não origina o mesmo aumento na eficiência de extracção.

Os estudos subsequentes foram realizados com o intuito de clarificar estas questões.

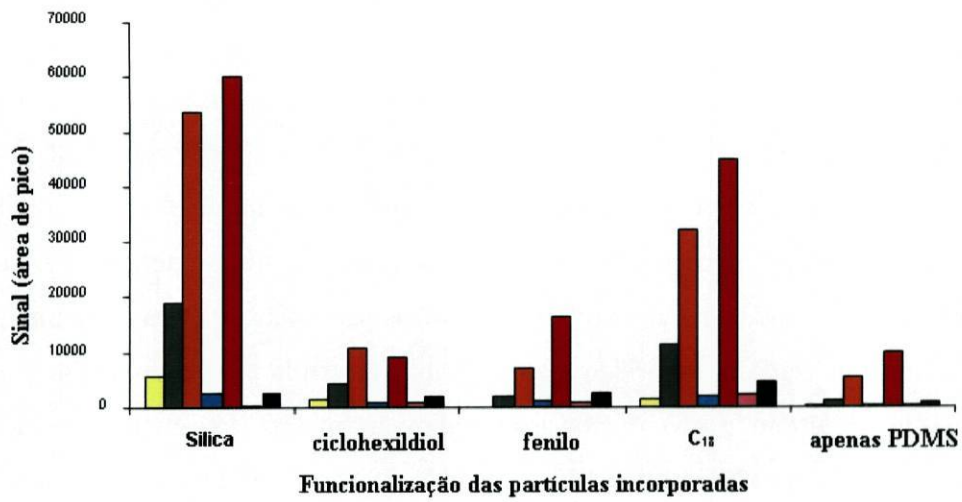


Figura 2.11 *– Gráfico comparativo da eficiência de extracção para as fibras estudadas. Os compostos analisados são (da esquerda para a direita): benzeno, tolueno, xileno, benzaldeído, 2-octanona, acetofenona e dimetilfenol*

2.3.2 Microestrutura versus eficiência de extracção

Após a realização dos estudos de extracção, optou-se por realizar uma análise através de SEM ao conjunto de fibras utilizadas no mesmo. As imagens obtidas (figura 2.12) mostram claramente que as fibras com partículas de sílica funcionalizada com fenilo e ciclohexildiol possuem menor quantidade de partículas na fibra, corroborando a hipótese avançada anteriormente.

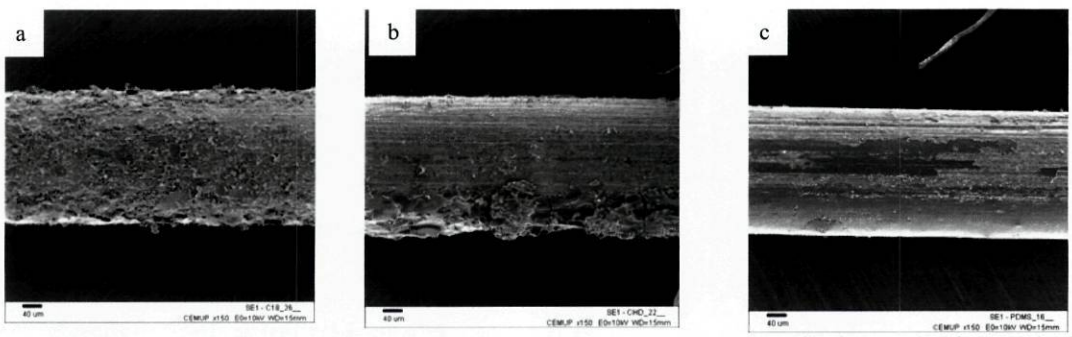


***Figura 2.12** - Imagens SEM das fibras de titânio após o ciclo de extracções: com partículas funcionalizadas com fenilo (a); com partículas funcionalizadas com ciclohexildiol (b) e revestidas apenas com PDMS (c).*

Porém, outra questão se levanta: há alguma razão para estes dois tipos de partículas não se incorporarem tão efectivamente na fibra ou terá sido apenas devido a erros acidentais durante a preparação das fibras? De forma a dar resposta a esta questão foram preparadas mais fibras usando quer o fio de titânio, quer a fibra óptica como substratos e avaliadas as respectivas capacidades de extracção.

Deste estudo foi possível verificar que a reprodutibilidade da preparação das fibras com qualquer um dos tipos de partícula foi baixa, contrariamente às fibras contendo apenas PDMS. No entanto, foi observada uma clara diferença entre as partículas de sílica funcionalizada com C_{18} e não funcionalizada por um lado e as partículas de fenilo e de ciclohexildiol por outro. Enquanto que o último grupo demonstrou sempre a mesma (ou menor) capacidade de extracção quando comparada com a fibra contendo apenas PDMS, já com o primeiro grupo foi possível obter uma eficiência de extracção muito mais elevada (figuras 2.13 e 2.11).

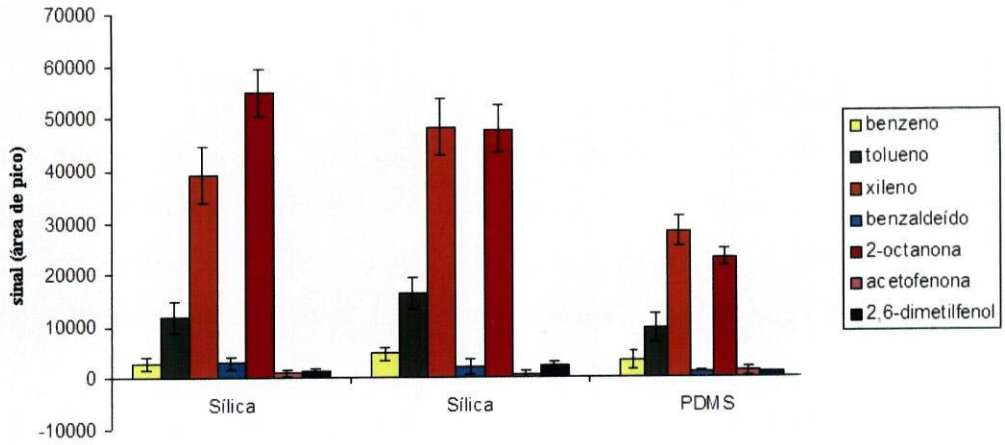


Figura 2.13 *– Gráfico comparativo da eficiência de extracção entre fibras com partículas de sílica não funcionalizada e uma fibra revestida com PDMS*

Os resultados permitiram concluir que as partículas funcionalizadas com grupos fenilo e ciclohexildiol não podem ser tão efectivamente incorporadas na matriz sol-gel como os outros dois tipos, originado portanto capacidades de extracção mais baixas.

A explicação para este facto está certamente relacionada com a propensão da superfície para ser molhada – carácter molhável (*wettability*) - em particular de pequenas partículas. Será portanto pertinente referir que a *wettability* é definida como o ângulo de contacto entre uma gota do líquido e uma superfície horizontal, em equilíbrio térmico, e está fortemente dependente das características da superfície em que está suportado (figura 2.14).

A *wettability* de superfícies pode ser modelada entre super-hidrofilicidade e super-hidrofobicidade (*non wettability*) modificando a sua estrutura química ou topográfica por meio de, por exemplo, irradiação de luz, alteração de pH, tratamento térmico, solventes, entre outros[11,12]. Possivelmente, a estrutura das partículas de sílica funcionalizadas com os grupos fenilo e ciclohexildiol confere *non wettability* pelo polímero líquido PDMS, o que poderá explicar a razão para que estas partículas não sejam cobertas com o PDMS e consequentemente retidas nas fibras[11].

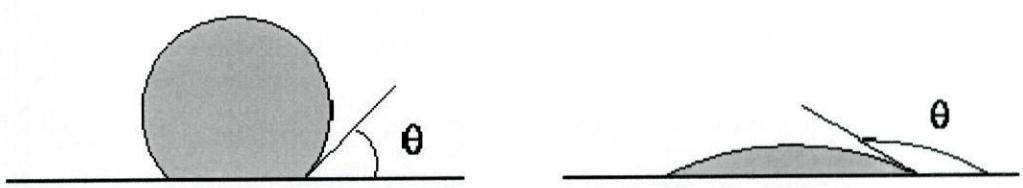


Figura 2.14 *– Imagem de uma gota líquida em equilíbrio com uma superfície horizontal. O ângulo de contacto, θ, define a wettability. Fenómeno de non-wettability ($0 \leq \theta \leq 90$) à esquerda e de wettability ($90 \leq \theta \leq 180$) à direita[11].*

2.3.3 Cinética e mecanismo de extracção

Os resultados apresentados até este ponto conduzem à conclusão de que o presente processo de preparação de fibras não permite retirar vantagens das diferentes características intrínsecas das partículas, de forma a possibilitar a modulação da selectividade em SPME. No entanto, foi concluído que pode ser depositada uma quantidade substancial de PDMS por esta via.

Tendo em consideração o facto de o PDMS possuir características que lhe conferem comportamento líquido, o que facilita a difusão dos compostos extraídos até às partículas, foi considerado pertinente realizar estudos cinéticos e mecanísticos por forma a obter informação acerca da possível influência activa das partículas funcionalizadas com C_{18} incorporadas.

A presença de partículas poderá ser directamente responsável por parte da capacidade de extracção das fibras, o que possivelmente se reflectirá numa alteração do perfil cinético de extracção, devido à existência de diferentes etapas de retenção (absorção no PDMS e adsorção nas partículas de sílica).

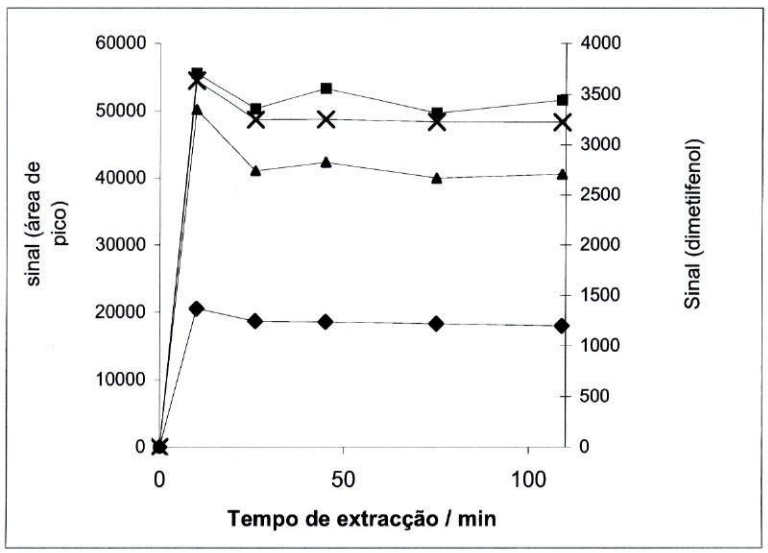


***Figura 2.15** – Perfis cinéticos obtidos para a extracção de tolueno (◆), xileno (■), 2-octanona (▲) e dimetilfenol (x) com uma fibra PDMS/partículas de sílica funcionalizada com C_{18}*

Os perfis cinéticos obtidos para a extracção do tolueno, xileno, 2-octanona e dimetilfenol estão representados na figura 2.15 e, tal como os perfis obtidos para a fibra contendo apenas PDMS (não apresentado), demonstram que se atingiu um patamar de uma forma relativamente rápida (~20min), o qual se manteve durante ~110min. Não foi observada qualquer influência das partículas na cinética de extracção.

Independentemente da natureza do revestimento, as moléculas do analito são retidas na sua superfície. Se estas migram para o interior do revestimento ou se se mantêm à sua superfície depende dos coeficientes de difusão do analito no revestimento. Quando os coeficientes de difusão são elevados (próximos dos valores para solventes orgânicos), o revestimento extrai primeiramente por absorção (comportamento líquido). É o caso do revestimento PDMS. Por outro lado, quando os coeficientes de difusão são muito baixos, durante o período de tempo de extracção praticamente todas as moléculas permanecem à superfície do revestimento, a extracção ocorre via adsorção.

Revestimentos que extraem via absorção exibem gamas lineares muito elevadas, as quais não são afectadas por competição multi-componente. Pelo contário, os limitados locais de adsorção à superfície neste tipo de revestimento originam uma baixa gama linear e a extracção de um composto, sob determinadas condições, poderá sofrer competição por parte de outros compostos.

O estudo da extracção do tolueno, mostrou que a presença de um competidor (etilbenzeno, 10mg/L) não influencia de forma significativa a extracção (figura 2.16), o que significa que a absorção é o mecanismo prevalente e que, igualmente a este nível, a influência das partículas não foi perceptível.

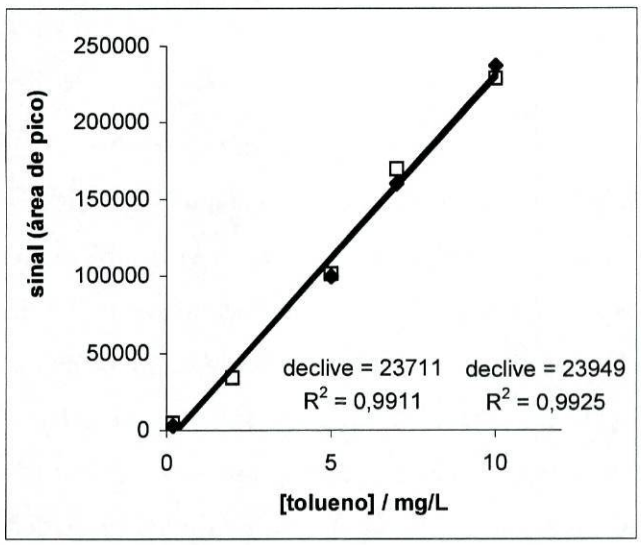


***Figura 2.16** – Curvas de calibração obtidas para a extracção de tolueno com uma fibra de PDMS/partículas de sílica funcionalizada com C_{18}: (□) em solução aquosa; (◆) em solução aquosa contendo 10mg/L de etilbenzeno. Declives: $23,7x10^3$ e $23,9x10^3$ (unidades omitidas) e R^2: 0,991 e 0,993, respectivamente*

2.3.4 Repetibilidade e durabilidade

Considerando a aplicabilidade possível deste tipo de fibras, deverão ser salientados alguns aspectos importantes dos resultados até aqui obtidos. O aumento da capacidade de extracção relativamente à fibra contendo apenas PDMS e a abrangente gama dinâmica mostrada pela extracção competitiva revelam-se como importantes vantagens na utilização desta fibra. Igualmente vantajosa foi a utilização da liga de titânio como substrato, a qual, para além de ser praticamente inquebrável, apresenta muito maior robustez do que o fio de titânio (usado anteriormente)[2] apresentando menos tendência a ser dobrada.

Foi igualmente obtida informação acerca da repetibilidade e durabilidade destas fibras durante os estudos anteriormente descritos. O erro de repetibilidade observado foi de 1% a 8% dependendo do composto considerado. A fibra usada para os estudos cinéticos, de extracção competitiva e outros estudos foi regularmente verificada relativamente à sua capacidade de extracção recorrendo a uma análise de referência (que incluía pelo menos 5min a 300ºC no injector), não se observando perda significativa após 100 utilizações. Não foram realizadas mais verificações.

2.4 Conclusão

O processo proposto para a preparação destas fibras não permitiu tirar partido das vantagens inerentes às partículas de sílica funcionalizada, de forma a modular a sua selectividade na aplicação à SPME, o que constituía o objectivo principal. No entanto, mostrou-se que é possível depositar uma grande quantidade de PDMS através deste processo quando se utiliza partículas de sílica não funcionalizada e funcionalizada com C_{18}, obtendo-se um revestimento sol-gel com capacidade de extracção mais elevada.

Em resumo, a fibra preparada neste estudo apresenta as características de um revestimento líquido, possui as vantagens intrínsecas da robustez e durabilidade dos revestimentos sol-gel e da utilização de um substrato em liga de titânio.

2.5 Referências

1 Fadeev, A.; McCarthy, T.; *J. Am. Chem. Soc.* , **1999**, 121, 12184-12185

2 Azenha, M. A.; Nogueira, P. J.; Silva, A. F.; *Anal. Chem.*, **2006,** 78, 2071-2074

3 Hageman, K.; Hawthorne, S.; Lee, M.; Liu, Y.; Yang, Y.; *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 5001-5005

4 Leidy, R.; Xia, X.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 2041-2047

5 Deng, H.; Du, X.; Gao, J.; Hou, J.; Ma, Q.; *Talanta*, **2004**, 62, 477-482

6 Mullett, W.; Pawliszyn J.; *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1081–1087

7 Levsen, K.; Lubda, D.; Mullett, W.; Pawliszyn J.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 19, 325–334

8 Haginaka, J., Sanbe, H.; *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5206–5210

9 Gorecki, T. em: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of solid phase microextraction*, Royal Society of Chemistry, Hertfordshire, **1999**, ch. 7

10 Chong, L.; Hayes, J.; Malik, A.; Wang, D.; Wilhite, B. *et al*; *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3889-3898

11 http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Contact_angle.svg

12 Huang, C.; Huang, W.; Li, F.; Li, T.; Yi, T.; Zhou, Y.; Zhou, Z.; *Chem. Mater.*, **2006**, 18, 2974

Capítulo 3

3 Desenvolvimento de fibras com revestimento por impressão molecular (MIPs) com polimerização sol-gel

Sumário

3.1. INTRODUÇÃO
3.2. L-DOPA COMO MOLÉCULA ALVO
3.3. SECÇÃO EXPERIMENTAL
3.4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS
3.5. REFERÊNCIAS

3.1 Introdução

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos estudos de impressão molecular em sol-gel para uma grande variedade de moléculas com diferentes aplicações. Na maior parte dos casos, o estudo tem incidido na caracterização físico-química dos materiais, na natureza e força das interacções entre a molécula-alvo e a estrutura sol-gel. Como exemplo, destacam-se de seguida alguns dos estudos realizados com aplicação da tecnologia sol-gel à impressão molecular.

Foi descrita em 1998 por Collinson e Makote[1] a preparação de filmes selectivos à dopamina fazendo uso de um sol compósito formado pela hidrólise e condensação de TMOS, PTMOS e MTMOS. Testando um polímero de impressão molecular para a extracção de propanolol, Marx e Liron[2] demonstraram a capacidade superior deste tipo de impressão relativamente à impressão acrílica como consequência da diminuição significativa das interacções não específicas. Num trabalho semelhante, Marx *et al*[3] demonstraram a capacidade dste tipo de impressão molecular para discriminar selectivamente dois enantiómeros.

Kunitake *et al*, aplicando a tecnologia sol-gel de superfície a misturas de ácidos carboxílicos orgânicos com alcóxidos de titânio produziram filmes ultra-finos (10-20nm de espessura), nos quais as cavidades de tamanho molecular se mantiveram intactas após a remoção da molécula alvo[4]. Ainda na preparação de filmes, mas aplicados a sensores electroquímicos, foi obtida uma selectividade significativa na detecção de paratião, relativamente a pesticidas organofosforados similares[5].

A impressão molecular sol-gel aplicada à produção de sensores encontra-se numa fase inicial, apesar do potencial que tem demonstrado. De facto, os filmes sol-gel impressos têm sido utilizados como camadas de reconhecimento acoplados a vários sistemas de transdução, como por exemplo, a fluorescência e a voltametria[6].

Para além da preparação de filmes, a impressão molecular tem sido também aplicada à produção de polímeros impressos, com aplicação no reconhecimento de enzimas, por condensação de reagentes organosilicados adequados na superfície de partículas porosas de sílica[7].

A impressão molecular, mais concretamente em sol-gel com óxidos metálicos, foi aplicada em membranas de separação de gases (CO_2), preparadas por imersão de substratos de alumina em soluções sol-gel contendo uma mistura de TEOS e MTES[8].

Venton *et al*[9], produziram polisiloxanos impressos para reconhecimento de proteínas. Este procedimento baseou-se no facto das cadeias laterais funcionais orgânicas em monómeros silanol poderem associar-se com grupos funcionais complementares na superfície das proteínas. Existem, no entanto algumas limitações associadas às misturas sol-gel preparadas com óxidos metálicos e à sua aplicação à adsorção selectiva de moléculas orgânicas, tais como a heterogeneidade do sítio activo e a dificuldade de obter as cavidades com a selectividade desejada[10].

Os denominados materiais de impressão molecular catalíticos são uma aplicação da tecnologia sol-gel à impressão molecular e surgiram com um trabalho publicado por Markowitz *et al*[11]. Este método envolve a impressão à superfície de sílica durante a formação das partículas no processo sol-gel. Utilizando este tipo de metodologia, foi conseguida a enantioselectividade em materiais impressos.

Maier *et al*[12] conseguiram controlar a adsorção molecular em superfícies inorgânicas através da preparação de sílicas porosas por sol-gel. No desenvolvimento destes novos materiais catalíticos, coseguiram obter óxidos microporosos com distribuição de tamanho de poro muito pequena, comparável aos zeólitos, na adsorção selectiva de (-)-borneol, (-)-cânfora e (+)-fenchol.

Para a extracção selectiva da cafeína, foi sintetizado um polímero de impressão molecular híbrido orgânico/inorgânico utilizando TEOS e co-monómeros vinílicos, através de um processo sol-gel com catálise ácida[13].

Mais recentemente, foi revestido um eléctrodo através de filmes com propriedades enantioselectivas para reconhecimento de moléculas quirais electroquimicamente activas. Entre estes, destaca-se um revestimento com L-Dopa como molécula alvo, para o qual foi obtida uma capacidade de reconhecimento quiral muito boa, com uma percentagem de interacções não específicas inferior a 5%. Revelaram ainda elevada selectividade quando comparada com uma série de derivados de catecol[14].

Estes resultados demonstram, por um lado, as potencialidades da L-Dopa para utilização como molécula alvo em impressão molecular e por outro, que as suas características permitem preparar um revestimento homogéneo com propriedades que permitem o reconhecimento quiral quando em mistura com outros compostos análogos. O objectivo deste estudo surge neste contexto, dado que até à data, não existem referências à produção de filmes preparados por impressão molecular com polimerização sol-gel aplicados a fibras para SPME. Este assume-se, portanto, como o primeiro trabalho desenvolvido com estas características e espera-se que venha a ser um valoroso contributo para estudos futuros.

3.2 L-Dopa como molécula alvo

O estudo realizado por Arvid Carlsson (Prémio Nobel) em 1950 demonstrou a importância da L-Dopa, (cujo nome IUPAC é 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina) - figura 3.1 - na diminuição de sintomas da Doença de Parkinson (DP) quando administrada em macacos possuidores destes sintomas.

Baseado no facto da DP se caracterizar por uma desordem neurológica progressiva resultante fundamentalmente da degeneração de neurónios dopaminérgicos,[15] e da dopamina não entrar no cérebro por via sanguínea (não podendo ser directamente administrada), o neurologista Oliver Sacks descreve um tratamento em pacientes humanos, usando a L-Dopa (um aminoácido que é precursor metabólico natural da dopamina) para substituir a dopamina que é perdida na DP, uma vez que apenas a L-Dopa apresenta a capacidade de entrar no cérebro por via sanguínea[16].

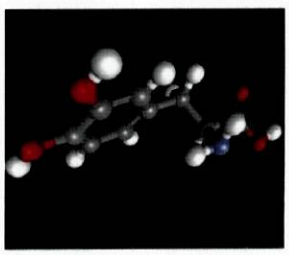
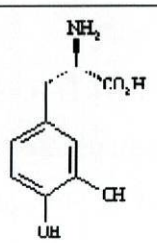


***Figura 3.1** – Estrutura 3D da molécula L-Dopa*[17]

A L-Dopa pode ser obtida sinteticamente a partir de tirosina catalisada ou de produção microbiológica, ou através do extracto de determinadas espécies de feijão, como forma de colmatar a necessidade de produzir esta droga[18].

Mais de trinta anos após o seu desenvolvimento e apesar da existência de estudos que comprovam alguns efeitos adversos a longo prazo (a nível motor), a L-Dopa continua a ser o tratamento mais eficaz no controlo sintomático da DP, em particular no que se refere a tremores, rigidez e movimentos lentos, entre outros[19]. Para além de rapidamente oxidável a pH alcalino e a temperaturas entre 70 e 100ºC, esta droga possui igualmente outras características que são de seguida descritas na tabela 3.1.

***Tabela 3.1** – Propriedades físico-químicas da L-Dopa*[20]

Fórmula	*Especificações*	*Descrição*
	- p*H* de solução aquosa a 1% - 4,5 - 7,0	- Pó cristalino, obtido a partir de matéria-prima vegetal, inodoro e de coloração branco-creme.
	- Rotação óptica - 1,27 a - 1,34	
	- Perda por secagem - 0,5% (máx.)	- Solúvel em ácido clorídrico e ácido fórmico diluídos. Solubilidade em água de 66mg em 40ml.
	- Cinzas sulfatadas - 0,1% (máx.)	- Praticamente insolúvel em etanol, benzeno, clorofórmio e acetato de etilo.
	- Absorvância (282nm) - 134 a 147	- Oxida-se rapidamente na presença de humidade e do oxigénio atmosférico, escurecendo.
Fórmula: $C_9H_{11}NO_4$ M=197,19 g.mol^{-1}	- Teor (Calculado sobre o produto seco) - 99,0% a 101,0%	

3.3 Secção experimental

Nesta secção pretende-se descrever todos os procedimentos adoptados durante o desenvolvimento das fibras para SPME aplicando a impressão molecular sol-gel, no entanto, alguns dos procedimentos e reagentes não serão descritos nem enunciados de forma a evitar a duplicação de procedimentos adoptados no capítulo anterior.

Cada um dos substratos utilizados neste trabalho foi escolhido de acordo com as potenciais vantagens que poderiam proporcionar à preparação das fibras. O fio em liga de titânio foi seleccionado pelo aumento da estabilidade mecânica que garante relativamente ao fio de titânio comum (para além de todas as outras vantagens já discutidas, inerentes a ambos); a sílica fundida, pela disponibilidade e facilidade de aquisição e pelo facto de ser um substrato com características bem estudadas no que respeita ao revestimento por sol-gel, torna-a um óptimo substrato para esta aplicação. Finalmente, no caso particular deste capítulo, experimentou-se um novo substrato, desta feita em vidro modificado, uma vez que foi demonstrado que estas, quando revestidas com PDMS, originam filmes de maiores espessuras e consequentemente a capacidade de extracção relativamente ao substrato de sílica fundida convencional.

3.3.1 Material e reagentes

Para além do material de vidro corrente de laboratório, foi utilizado um suporte para SPME-HPLC *Supelco,* tubos PCR de capacidade 1,5mL, frascos de vidro de capacidade 22mL, septos Supelco PTFE/Silicone para frascos de 22mL, placas de titânio de 127μm de espessura, sistema de filtração por filtros de membrana descartáveis com 13mm de diâmetro e 0,2μm de porosidade (*Schleicher & Schuell*), agitador *IKA* – modelo *yellow line (TTS)*, agitador magnético *Falc* – modelo *F 60* e fio em liga de titânio (Ti:Al:V (90:6:4); d.i.=250μm).

Os reagentes utilizados neste estudo foram: L-Dopa, feniltrimetoxisilano (PTMOS), metiltrimetoxisilano (MTMOS), etoxietanol e HCl 0,1M. Todos os reagentes foram usados tal como recebidos, à excepção do HCl, o qual foi preparado por diluição. Foi ainda utilizado neste estudo o composto 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metil-L-alanina, doravante denominado por Metil-L-Dopa, cujas soluções foram preparadas de acordo com o procedimento descrito para a L-Dopa.

Antes da utilização, todo o material de vidro e de plástico, foi lavado várias vezes em água desionizada de qualidade MilliQ (Millipore, Billerica, MA).

3.3.2 Metodologias

Para além da fibra óptica comercial vulgar, foi utilizada também uma fibra de vidro modificada, a qual foi preparada derrentendo quantidades apropriadas de Li_2CO_3 (PA), $ZrOCl_2.8H_2O$ (98%, PA), $Ba(CH_3CO_2)_2$ e SiO_2 (PA) durante 3h a 1100ºC[21]. A massa derretida foi retirada de modo a formar fibras à base de cerâmica usando o instrumento apresentado na figura 3.2.

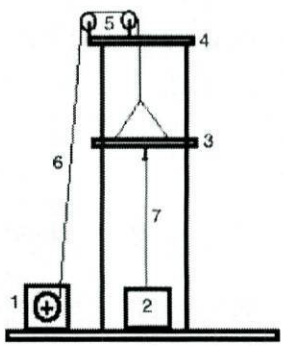


***Figura 3.2** – Instrumento para produzir fibras de vidro modificado. (1) bomba peristáltica, (2) forno; (3) plataforma móvel, (4) plataforma fixa, (5) sistema de alavancas, (6) cabo de aço, (7) ponto do cabo que fica em contacto com a massa de vidro derretida[21].*

O material final apresenta a composição descrita de seguida:

***Tabela 3.2** – Caracterização da fibra de vidro modificado*

Diâmetro	*Composição*	
~120μm	Li_2O	29%
	ZrO_2	1%
	BaO	5%
	SiO_2	65%

3.3.2.1 Pré - tratamento das fibras

O procedimento adoptado para o pré-tratamento das fibras utilizadas neste estudo foi o mesmo descrito no estudo 2.2.2.1.

3.3.2.2 Estudo em titânio

Foi realizado um estudo preliminar com o objectivo de verificar a deposição do filme sol-gel na superfície de uma placa de titânio. A placa de titânio foi escolhida para o efeito pois por um lado promove uma melhor visualização do filme e por outro porque está comprovado que o titânio forma espontaneamente uma fina camada de óxido à superfície[22].

Para o revestimento da placa de titânio pré-tratada (5x55mm) promoveu-se o *dip-coating* em 600μL da solução sol-gel utilizada (ver adiante) durante 20min, deixando-a secar ao ar

durante algumas horas. A experiência originou um revestimento homogéneo, visível a olho nú em toda a superfície de contacto com a solução sol-gel.

De modo a verificar a estabilidade do revestimento a solventes orgânicos, mergulhou-se a placa de titânio em metanol sob agitação vigorosa durante cerca de 24h não se verificando qualquer alteração relativamente ao seu estado antes do teste.

Depois de confirmada a deposição do filme sol-gel à superfície do titânio, procedeu-se à análise por SEM das fibras de titânio e das fibras ópticas de modo a observar a sua morfologia.

3.3.2.3 Preparação da solução L-Dopa

Segundo o procedimento descrito por Marx, S. *et al*[14], o composto deveria ser dissolvido em etanol, no entanto, dada a dificuldade encontrada em dissolvê-lo, optou-se por estudar a sua solubilidade noutros solventes. Assim, dado o pouco conhecimento disponível acerca do comportamento da L-Dopa em diferentes solventes, testou-se a sua dissolução em metanol, HCl 0,1M e em água.

Para cada um dos solventes, foi preparada uma solução L-Dopa 0,05M num volume de 1,0mL com dissolução por ultra-sons durante 15min. Foi observada a dissolução completa apenas quando se utilizou HCl 0,1M e água. A partir destas observações e dada a necessidade de obter uma solução com pH próximo de 7, foi utilizada a água como solvente.

3.3.2.4 Preparação de MIP's e NIP's

A solução sol-gel utilizada[14] na preparação dos NIPs (polímeros não impressos) consistiu em 500µL de TMOS 98% (tetrametoxisilano), 125µL de PTMOS (feniltrimotoxisilano), 5mL de etoxietanol, 130µL de H_2O ultra pura e 200µL de HCl 0,1M. Os MIP's foram preparados por adição de 200µL de solução L-Dopa 0,05M (previamente preparada) a 1,0mL da mistura NIP. Em ambos os casos, a solução foi agitada a 800rpm durante 2h à temperatura ambiente.

3.3.2.5 Limpeza dos MIP's

A limpeza dos MIPs (ou remoção da molécula alvo) foi realizada por imersão dos mesmos num volume de 600µL de solução de ácido fórmico 2% durante cerca de 24h à temperatura ambiente. Os extractos obtidos foram analisados por HPLC nas condições descritas adiante.

3.3.2.6 Revestimento das fibras

As fibras foram revestidas por *dip-coating* fazendo mergulhar uma porção de 1,00cm de fibra durante 20min, tendo sempre o cuidado de evitar qualquer vibração durante o período de revestimento. Após o revestimento das fibras, optou-se por expô-las à temperatura de 100ºC de modo a acondicioná-las, no entanto, imagens obtidas por análise de SEM permitiram observar o aspecto das fibras com e sem acondicionamento, como se ilustra na secção 3.8. Uma vez que os revestimentos das fibras com acondicionamento a 100ºC apresentaram fissuras, optou-se por não dar continuidade a este procedimento.

O procedimento adoptado para a análise por SEM encontra-se descrito na secção 2.2.2.4.

3.3.2.7 Optimização do método cromatográfico – HPLC



***Figura 3.3** – Fotografia do instrumento de HPLC utilizado no estudo*

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer – modelo *Séries 200* ilustrado na figura 3.3 o qual foi acoplado a uma interface SPME-HPLC (ver adiante). Este instrumento, constituído por uma bomba isocrática e um detector UV-Vis, foi equipado com uma coluna C_{18} numa fase inicial e posteriormente com uma coluna C_8 (ambas de fase-reversa). As características de cada uma das colunas está descrita na tabela 3.3.

***Tabela 3.3** - Características das colunas comerciais de C_{18} e C_8*

Coluna	Características		
C_{18}	Dimensões	Comprimento	150mm
		Diâmetro interno	4,6mm
C_8		Comprimento	150mm
		Diâmetro interno	4,6mm

Para a injecção das amostras foi utilizada uma fase móvel com composição em água:metanol:ácido fosfórico de 980:16:4 (v/v/v) – pH=2,0 – (sujeito a ultra-sons durante 10min após a sua preparação). O fluxo de fase móvel foi de 1,0mL/min e a detecção ao comprimento de onda de 282nm. Todas as amostras foram previamente filtradas com filtro de 0,2μm.

3.3.2.8 Optimização da interface SPME-HPLC

A interface SPME-HPLC adquirida à Supelco, encontra-se representada na figura 3.4. Para este estudo optou-se pelo método estático, uma vez que permite a desadsorção de analitos com maior retenção. Na figura 3.4B encontra-se esquematizado, com maior pormenor, o processo de injecção da amostra para o método estático.

O procedimento adoptado baseou-se na inserção da agulha de vedação no guia de agulha e fecho da garra de aperto. De seguida introduziu-se o solvente de extracção (neste caso, o metanol) na câmara de desadsorção. Abriu-se a garra de aperto, expôs-se a fibra e voltou-se a fechar a garra deixando a desadsorver durante 5min. Finalmente, procedeu-se à rotação da válvula para a posição "*inject*".

O estudo de optimização foi realizado, numa primeira fase, com fibras de titânio revestidas com PDMS, uma vez que davam mais garantias a nível de robustez mecânica durante o seu manuseamento. Cedo se verificou que o ferrulo de origem não seria o mais apropriado para este tipo de fibra uma vez que se observou fuga do eluente a partir da câmara de desadsorção.

Deverá ser referido que esta interface fornecida pela *Supelco* apenas é compatível com fibras para SPME comerciais, ou seja, fibras com substrato de fibra óptica e portanto seriam de prever dificuldades acrescidas na utilização de fibras com diferentes substratos.

De forma evitar a fuga do eluente, optou-se inicialmente por exercer maior pressão sobre a câmara, apertando um pouco mais a tampa de pressão por acção de dois pequenos parafusos. No entanto, esta pressão nunca poderia ser demasiado elevada dada a possibilidade de a garra de aperto quebrar.

Por outro lado, a fuga do eluente através da câmara apenas ocorria quando a válvula era alterada da posição "*load*" para a posição "*inject*". A razão para o ocorrido é o aumento da pressão do sistema quando o loop fica sob a pressão existente no sistema de HPLC para o fluxo pré-determinado, 1mL/min.

Para evitar o referido aumento de pressão, testou-se a diminuição gradual do fluxo desde 1 até 0,3mL/min. Observou-se a diminuição da pressão do sistema, mas sem que a fuga de eluente deixasse de se verificar.

A solução passava portanto por forçar um pouco mais a garra de aperto – este procedimento foi repetido testando o intervalo de fluxo referido através de pequenos ajustes de ambos os parafusos – até um limite em que se verificou uma ligeira deformação da garra de aperto. Adicionalmente, devido aos ajustes mecânicos realizados quer na câmara de desadsorção, quer nos ferrulos utilizados, foi verificado que o revestimento das fibras apresentava um aspecto mais esbranquiçado (sinal de desgaste do revestimento).

Tendo consciência da limitação do uso deste tipo de ferrulo, foram procurados outros tipos que se adaptassem à fibra de titânio, no entanto sem sucesso.

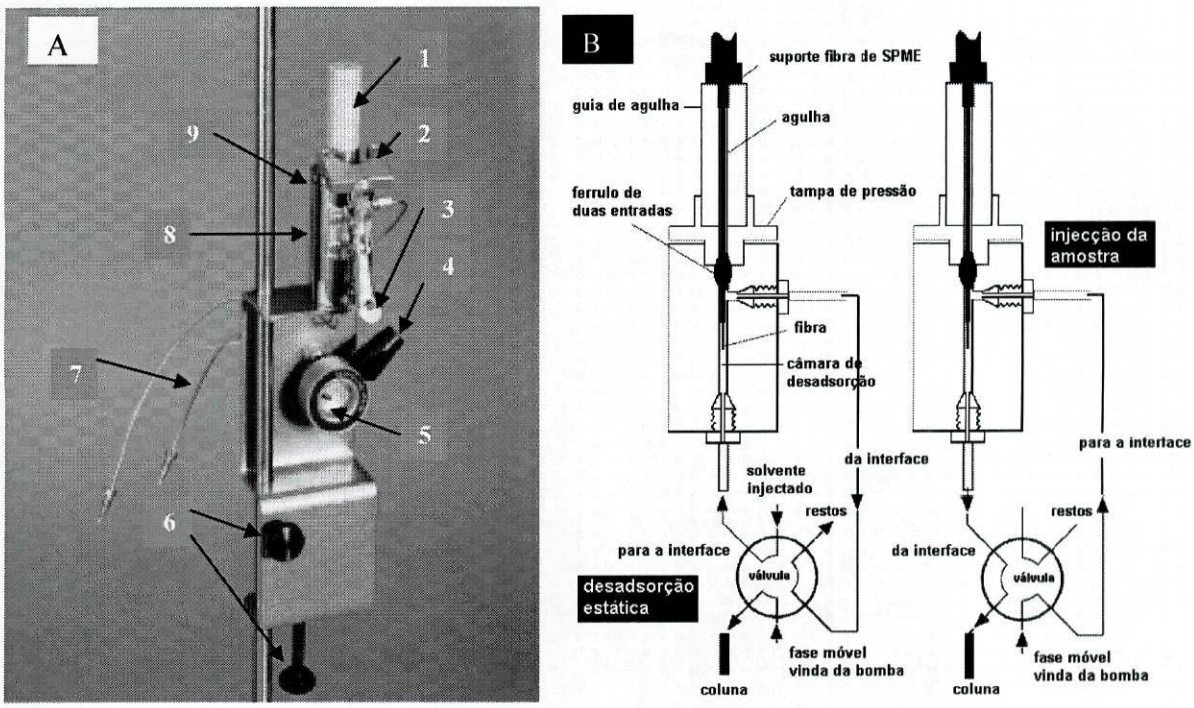


Figura 3.4 *– Imagens da interface SPME-HPLC da Supelco. A- vista da estrutura da interface (1) Guia da agulha, (2) Prato de pressão, (3) Garra de aperto, (4) Válvula de HPLC de 6 portas, (5) Orifício de injecção, (6) Parafusos de aperto, (7) Tubos para restos, (8) Câmara de desadsorção (500μL), (9) Tampa de pressão; B-vista em pormenor do processo de injecção em modo estático*[23,24]

Por fim, após todas estas tentativas foi observado o estado do revestimento, o qual se caracterizava por se encontrar em algumas zonas notoriamente danificado, visível pela sua cor mais esbranquiçada. Esta observação leva a concluir que sempre que se procedeu ao aperto da tampa de pressão, o ferrulo era igualmente apertado diminuindo o espaço disponível para a fibra, o que acabava por danificar o revestimento.

Após várias tentativas fracassadas de optimizar a interface com um substrato que não o recomendado pelo fabricante, optou-se por utilizar fibras com substrato em fibra óptica

igualmente revestidas, numa primeira fase, com PDMS. Estas fibras foram montadas de acordo com a figura 3.5 e apresentam um diâmetro compatível com o diâmetro do ferrulo utilizado.

O procedimento adoptado para este tipo de fibra foi idêntico ao utilizado para a fibra de titânio, porém, foram encontrados os mesmos problemas de fuga de eluente através da câmara de desadsorção. Assim, dadas as inúmeras tentativas frustradas de optimizar a interface SPME-HPLC, optou-se por uma segunda via na tentativa de concretizar os objectivos inicialmente propostos iniciando-se o processo de extracção "*off-line*".

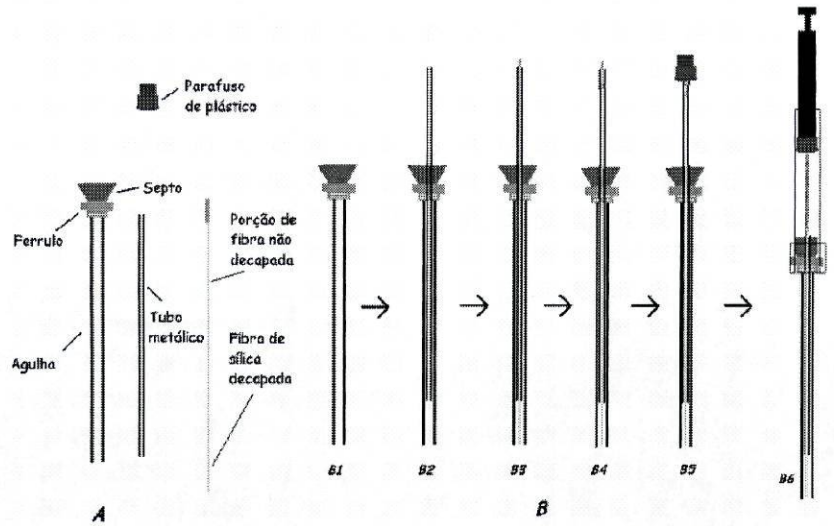


***Figura 3.5** – Esquema dos componentes e da montagem da fibra óptica utilizada.*

3.3.2.9 Extracção directa SPME-HPLC "off-line"

No estudo de optimização da extracção por SPME "*off-line*" foram utilizadas as fibras em substrato de fibra óptica revestidas com MIPs e NIPs preparados de acordo com a secção 3.3.2.4. A solução de extracção era constituída por 10mL de L-Dopa 10ppm em água, com 10% de NaCl, a um pH≈7[25].

O procedimento de extracção/desadsorção consistiu na exposição da fibra à solução por extracção directa durante 2h no interior de um vial de 22mL fechado com tampa furada. De seguida, a porção de fibra exposta foi deixada a secar durante cerca de 10min no interior de um tubo fechado, de modo a evitar qualquer contaminação (poeiras, principalmente). Após o período de secagem, a fibra foi mergulhada num volume de 400µL de solução de ácido fórmico a 2%, com pH≈1,6, onde ocorreu a desadsorção durante pelo menos 10h.

Após o período de desadsorção, o extracto foi evaporado à secura através de um fluxo de N_2, durante cerca de 90min. Seguidamente, foi adicionado um volume de 100µL da mesma

solução extractora, a qual foi injectada no sistema cromatográfico depois de lentamente agitada e devidamente filtrada.

Para a caracterização cromatográfica dos MIPs e dos NIPs, vários foram os estudos realizados, nomeadamente estudos de limpeza, capacidade de extracção, selectividade e de repetibilidade/reprodutibilidade, sendo que alguns deles foram já descritos.

O estudo de capacidade de extracção consistiu na comparação entre os MIPs e os NIPs e ainda de ambos com uma fibra óptica sem revestimento. Como referido, os extractos obtidos após a extracção e a desadsorção foram analisados por HPLC nas condições referidas. A concentração da solução L-Dopa utilizada foi de 10ppm, no entanto, foram também realizados alguns estudos com concentrações superiores. Para além das fibras ópticas comerciais, foi avaliada a capacidade de extracção das fibras preparadas por Oliveira, A. *et al*[21].

No que se refere ao estudo de selectividade, foi testada a capacidade dos MIPs reconhecerem um composto análogo ao seu, no caso, o composto 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilamina. Finalmente os estudos de repetibilidade/reprodutibilidade foram realizados avaliando a capacidade das fibras no mesmo dia através de várias repetições, em dias diferentes e testando várias fibras. Para todos os estudos foram utilizados os NIPs como fibras de controlo.

3.4 Apresentação e discussão dos resultados

Os resultados apresentados nesta secção referem-se a um tipo de fibra para SPME possuindo um revestimento preparado através de impressão molecular numa rede polimérica sol-gel. A matriz sol-gel utilizada foi escolhida com base nos bons resultados obtidos por Marx, S. *et al*[3,14], os quais verificaram a formação de um filme homogéneo e uma cobertura total da superfície revestida através de *spin-coating*. Nesta técnica, a solução sol-gel é depositada num substrato que se encontra sobre um disco rotatório. Inicialmente, o disco roda em sentido ascendente e posteriormente no sentido descendente, permitindo assim que o filme se espalhe por toda a superfície e promovendo simultaneamente os processos de evaporação, secagem e as reacções de condensação.

O filme assim obtido apresentará propriedades diferentes de um obtido através de *dip-coating*, sendo possível inclusivamente obter filmes com espessura e uniformidade desejada ajustando a velocidade de rotação e consequentemente a força centrífuga actuante sobre o filme. Durante o revestimento, os processos de condensação, evaporação e secagem ocorrerão

mais facilmente. Adicionalmente, as características de um filme numa superfície plana são diferentes de um filme que reveste uma superfície cilíndrica, ou seja, será de esperar que os filmes formados apresentem microestruturas diferentes em ambos os substratos. Consequentemente, houve necessidade de recorrer a uma análise SEM de forma a observar a morfologia dos filmes que revestem os substratos em fibra em liga de titânio e em sílica fundida.

3.4.1 Morfologia / Características físicas dos revestimentos

Como referido na secção anterior, a primeira fase deste estudo consistiu na preparação de fibras utilizando substratos em liga de titânio, em fibra óptica e em fibra de vidro modificado revestidos com uma solução sol-gel sem L-Dopa (NIP) e com L-Dopa (MIP) e na visualização da morfologia desses revestimentos através de análise SEM. Na figura 3.6 apresentam-se alguns exemplos de imagens obtidas para estas fibras.

Pela análise das imagens, é possível verificar que as fibras revestidas quer com MIP, quer com NIP apresentam um filme praticamente homogéneo (Figura 3.6 - imagens A, B), à excepção de algumas zonas, devido provavelmente às temperaturas elevadas a que as fibras foram sujeitas durante o acondicionamento. No fio em liga de titânio não se observa um filme uniforme, mas sim um filme com um aspecto fissurado (figura 3.6 – imagem C).

Um facto importante que deverá ser referido é a semelhança dos filmes verificada para o MIP e o NIP, na fibra óptica (figura 3.6 - imagens A e B), comprovando a possibilidade de revestir este tipo de substrato com o polímero utilizado. A observação das fibras de vidro modificado mostra um substrato que possui alguma rugosidade na sua superfície (figura 3.6 – imagem D) e que quando revestido, apresenta pequenas manchas mais escuras (figura 3.6 – imagem E).

Uma análise elementar às manchas na superfície desta fibra revela a presença de Bário e de Cloro (entre outros, já esperados) e o seu aparecimento poderá estar relacionado com reacções químicas entre estes e a mistura sol-gel utilizada para o revestimento.

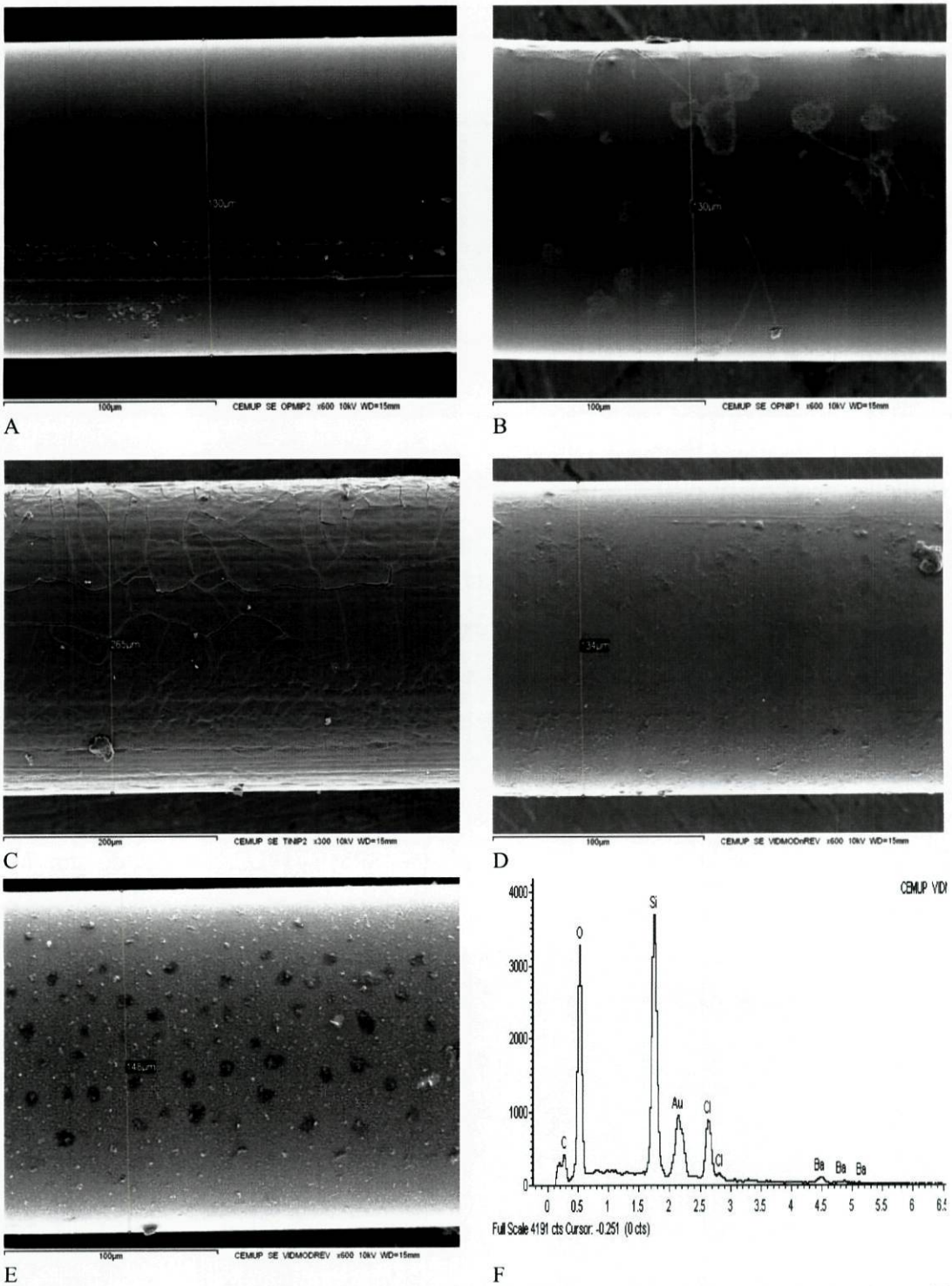


Figura 3.6 *– Imagens por análise SEM de fibras com medição do diâmetro e análise elementar da fibra de vidro modificado. Imagem A: fibra óptica revestida com MIP; Imagem B: fibra óptica revestida com NIP; Imagem C: fibra de titânio revestido com NIP; Imagem D: fibra de vidro modificado não revestido; Imagem E: fibra de vidro modificado revestido; Imagem F: análise elementar da fibra de vidro modificado revestida*

Para este conjunto de fibras, foi igualmente estimada a espessura dos filmes obtidos, por comparação entre o diâmetro dos substratos antes e após o revestimento e as quais são apresentadas de seguida:

Tabela 3.4 – Estimativa das espessuras das fibras utilizadas na análise SEM

Fibra (imagem da figura 3.6)	*Diâmetro do substrato (μm)*	*Diâmetro da fibra após revestimento (μm)*	*Espessura do filme (μm)*
Fibra óptica - MIP (A)	125	130	5/2=2,5
Fibra óptica - NIP (B)			
Fibra em liga de titânio (C)	250	265	15/2=7,5
Fibra de vidro modificado (E)	134	148	14/2=7,0

Como é possível verificar pela análise da tabela 3.4, a fibra óptica, de vidro modificado e em liga de titânio apresentam espessuras de filme (aproximadas) de 2,5, 7,5 e 7μm, respectivamente. Porém, a impossibilidade de adaptar as fibras em liga de titânio à interface SPME-HPLC (que originou alguns problemas experimentais, nomeadamente no que respeita ao diâmetro das fibras e do ferrulo) e a observação de que o filme neste subtrato apresenta fissuras em toda a sua superfície conduziram à necessidade de realizar os estudos subsequentes apenas com as fibras de sílica fundida e de vidro modificado.

Após observada a presença do filme nos substratos de sílica fundida e de vidro modificado, procedeu-se à optimização da interface SPME-HPLC através de um novo conjunto de fibras. Posteriormente, devido às referidas dificuldades encontradas na tentativa de optimizar esta interface, optou-se por continuar o estudo através da extracção "*off-line*", o qual se apresenta de seguida.

3.4.2 Processo de remoção da molécula alvo

Para o estudo de extracção SPME-HPLC "*off-line*", foi necessário proceder à remoção da molécula alvo (L-Dopa), de forma a libertar as cavidades do polímero. Para o efeito, a fibra foi mergulhada numa solução de ácido fórmico 2% durante cerca 24h, tal como referido na secção 3.3.2.5. O tempo de desadsorção da molécula alvo foi escolhido com base na literatura[3,17].

3.4.3 Resposta linear do método de análise da L-Dopa

Este estudo visou a avaliação de uma gama linear de trabalho (no caso, entre 0,1 e 10ppm) do método de análise, nas condições cromatográficas utilizadas com L-Dopa e metil-L-Dopa. No gráfico da figura 3.7 estão representadas duas rectas correspondentes aos dois compostos, porém, apenas a L-Dopa será objecto de estudo nesta secção.

A determinação desta gama de linearidade é justificada pelo carácter não quantitativo deste estudo, dado que se pretendeu avaliar a eficiência de extracção das fibras em termos relativos, isto é, pretendeu-se trabalhar dentro dessa gama para assegurar que a comparação do desempenho de um conjunto de fibras poderia ser efectuado por simples comparação de áreas de pico cromatográfico. Os resultados mostram que a L-Dopa apresenta resposta linear entre 0,1 e 10ppm, (figura 3.7). As condições cromatográficas utilizadas para este estudo são descritas na secção 3.3.2.7.

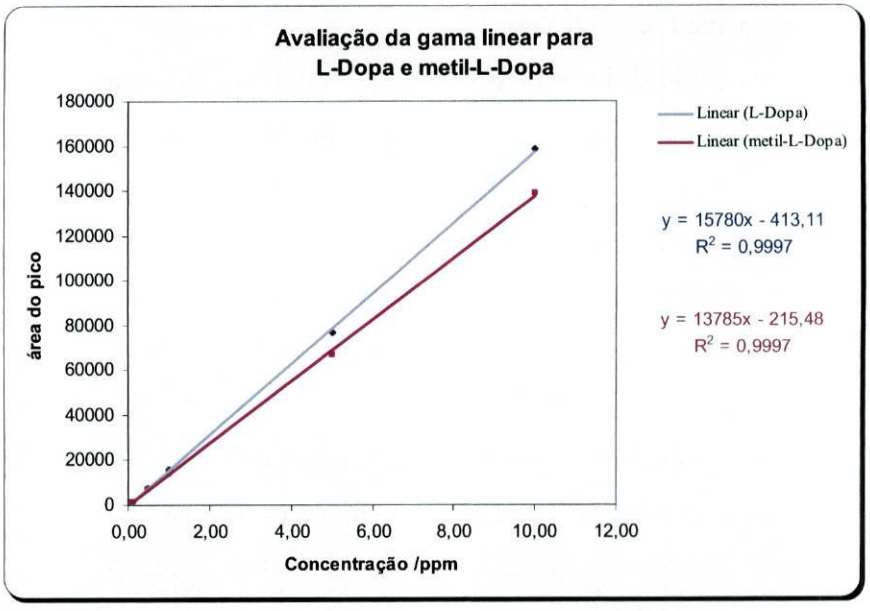


***Figura 3.7** – Estudo da gama linear para a L-Dopa e metil-L-Dopa nas condições cromatográficas utilizadas*

3.4.4 Estudo do desempenho dos MIPs

O estudo de desempenho dos MIPs foi realizado com as fibras de sílica fundida e com a fibra de vidro modificado. Para este estudo, foi adoptado um conjunto de condições experimentais (ver secção 3.3.2.9) tendo como base alguns trabalhos já publicados.

Num estudo de Djozan *et al*[25], foi verificado que a extracção da L-Dopa era significativamente melhorada com uma solução em NaCl a 10%. Este estudo compara ainda a eficiência de uma série de solventes na desadsorção do mesmo analito e conclui que o ácido fórmico 2% apresenta uma capacidade superior aos outros estudados.

Todavia, deverá ser referido que este estudo consiste na extracção de L-Dopa através de SPME-HPLC "*on-line*" e em tubo, ou seja, no interior de uma coluna capilar e portanto, não há qualquer indicação do tempo de extracção necessário para adsorver a L-Dopa. Neste caso, a extracção foi realizada através de um fluxo contínuo de solvente.

Para as características do presente trabalho, foi necessário determinar um tempo de extracção suficientemente longo (2h) por forma a garantir que o equilíbrio fosse atingido, mas que apresentasse exequibilidade experimental, quer a nível de tempo, quer a nível de estabilidade do composto (a L-Dopa é estável durante apenas 8h à temperatura ambiente).

O comportamento esperado quanto à eficiência de extracção para as fibras testadas neste estudo seria: MIP_A $\approx$ MIP_B > NIP_A > fibra óptica, no entanto, esta relação apenas ocorreu para as concentrações de 25ppm e 10ppm (figura 3.8). A concentração de 10ppm para a solução L-Dopa utilizada neste estudo foi seleccionada dada a necessidade de um compromisso entre a obtenção de sinais (áreas de pico) mensuráveis e a menor concentração possível, uma vez que quanto menor a concentração do analito, mais facilmente se fará sentir o efeito das cavidades específicas existentes no polímero impresso. Estas, encontram-se em número limitado e se forem saturadas, a ligação não específica poderá predominar e mascarar o eventual efeito de impressão.

Na avaliação da eficiência de extracção destas fibras a 10ppm verificou-se que a razão entre o sinal e o ruído (*signal to noise – S/N*) era da ordem dos 5 a 10, considerando-se que não era possível efectuar extracções de soluções de L-Dopa menos concentradas.

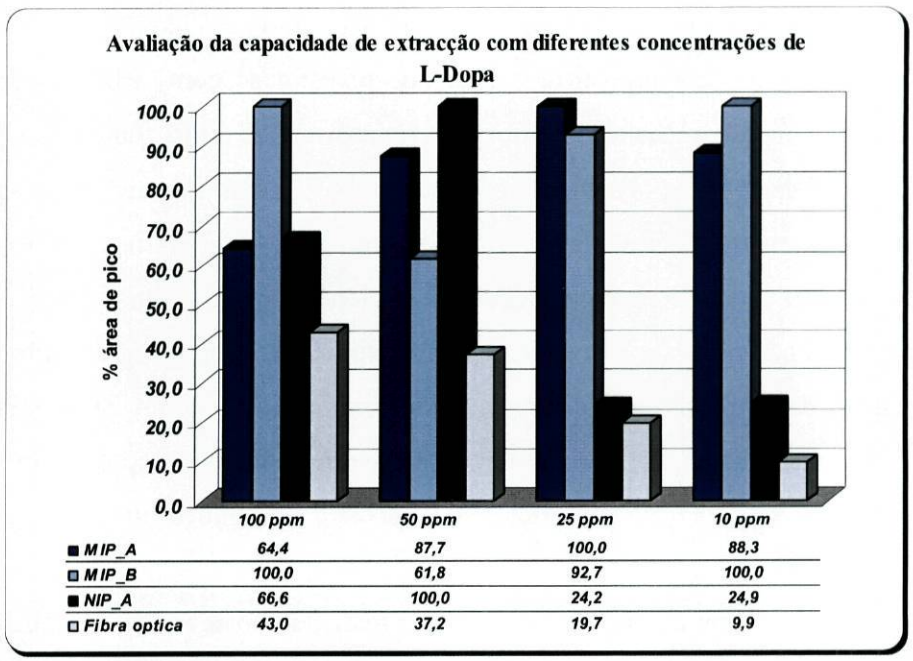


Figura 3.8 *– Gráfico correspondente à avaliação da capacidade de extracção relativa para diferentes concentrações de L-Dopa para MIP_A, MIP_B, NIP_A e fibra óptica – A percentagem de área de pico foi determinada devido ao facto das determinações não terem sido realizadas no mesmo dia (e portanto em condições experimentais diferentes). Esta percentagem foi calculada através da razão entre as áreas de pico individuais e o maior valor de área para cada concentração.*

Com o intuito de testar as fibras de vidro modificado, procedeu-se a um estudo comparativo (utilizando MIPs), entre estas e as fibras de sílica fundida. Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.9:

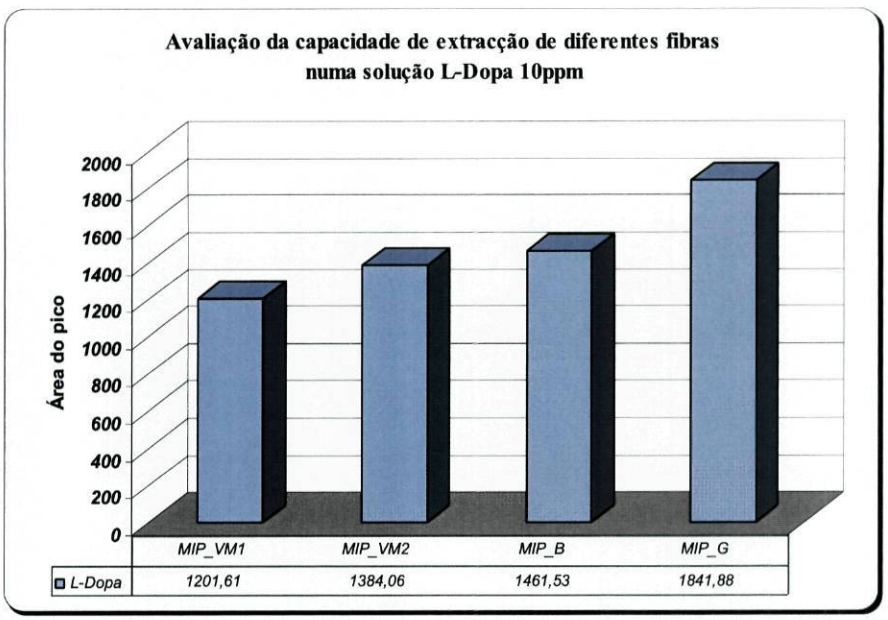


Figura 3.9 *- Gráfico correspondente à avaliação da capacidade de extracção de diferentes fibras numa solução L-Dopa 10ppm. MIP_VM1 e MIP_VM2: fibras de vidro modificado; MIP_B e MIP_G: fibras de sílica fundida*

Os substratos de vidro revestido foram usados neste estudo devido às vantagens esperadas decorrentes das suas características. Quando revestidos com PDMS, apresentaram capacidades de extracção superiores às fibras com substrato de sílica fundida[21] e por isso, foi tentada a possibilidade de se observar o mesmo comportamento na mistura sol-gel utilizada neste estudo. No entanto, apesar de existirem diferenças significativas na espessura dos filmes, não foi verificado o aumento esperado na eficiência de extracção.

Esta diferença não pôde ser convenientemente explorada, uma vez que as fibras utilizadas para os estudos de extracção são diferentes das fibras analisadas por SEM (esta técnica é destrutiva). Adicionalmente, foi verificado que a espessura do substrato de vidro modificado não é constante ao longo da sua superfície, podendo este ser também um factor de influência na capacidade de extracção.

Para avançar com uma explicação, teria de ser realizada nova análise por SEM das fibras (sílica fundida e vidro revestido) após os estudos de eficiência das mesmas. Deste modo, seria possível conhecer qual a relação existente entre as capacidades de extracção e a espessura dos filmes.

A partir destes resultados, optou-se por realizar os restantes estudos em fibra óptica, dada a maior disponibilidade deste material. Os MIPs e NIPs preparados utilizando substrato de sílica fundida revelam diferenças significativas na eficiência de extracção, como é possível verificar nas figuras 3.10 (resultados em dias diferentes).

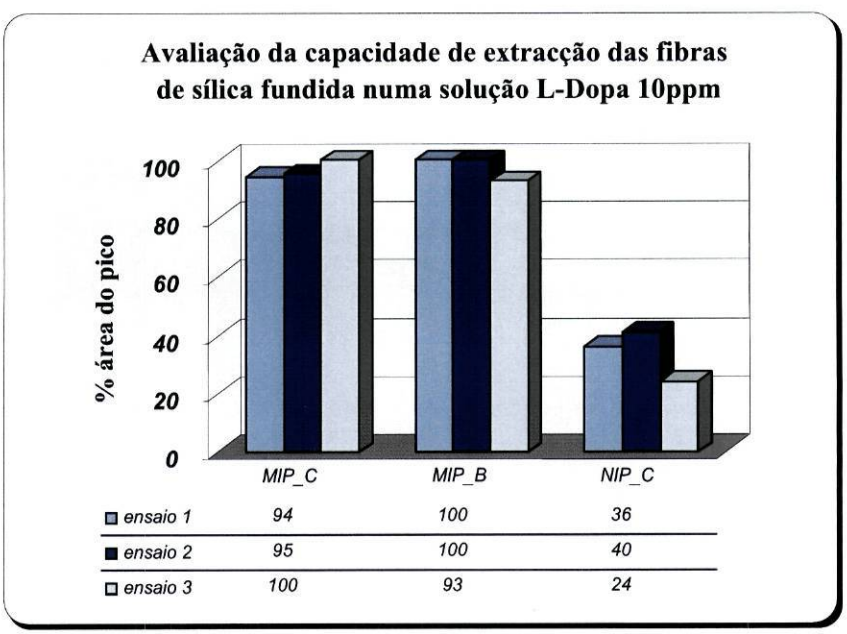


***Figura 3.10** - Gráfico correspondente à avaliação da capacidade de extracção numa solução L-Dopa 10ppm para as fibras MIP_C, MIP_B e NIP_C - A percentagem de área de pico foi determinada devido ao facto das determinações não terem sido realizadas no mesmo dia (e portanto em condições experimentais diferentes). Esta percentagem foi calculada através da razão entre as áreas de pico individuais e o maior valor de área para cada ensaio*

Verifica-se que qualquer um dos tipos de fibra retém a L-Dopa, como resultado de interacções não específicas entre o polímero que reveste o substrato e as moléculas de analitos, no entanto, nos MIPs, para além das interacções não específicas, ocorrem interacções específicas com o analito e consequentemente a eficiência de extracção é aumentada. De facto, para os três ensaios realizados, verificou-se que a quantidade de L-Dopa extraída foi invariavelmente superior (sempre superior ao dobro) para os dois MIPs, revelando que estas fibras possuem uma maior afinidade para a L-Dopa do que o NIP.

Não obstante a necessidade de realizar novos estudos com fibras diferentes, este estudo, apesar de exploratório, forneceu boas indicações acerca do potencial desta fibra para extrair a L-Dopa, uma vez que foi possível obter eficiências de extracção semelhantes com duas fibras diferentes e em dias distintos.

De forma a testar a selectividade dos MIPs relativamente à extracção de L-Dopa numa mistura com um composto análogo (Metil-L-Dopa), procedeu-se ao estudo seguinte.

3.4.5 Estudo de selectividade

Este estudo visou avaliar a selectividade das fibras preparadas, através da extracção directa de uma solução 10ppm em L-Dopa e metil-L-Dopa. Previamente à realização deste estudo, foi efectuada a avaliação de uma gama de linearidade (0,1 a 10ppm) relativa à Metil-L-Dopa nas mesmas condições experimentais descritas para a L-Dopa. Os resultados obtidos são apresentados no gráfico da figura 3.7 (secção 3.4.3).

Como é possível verificar pela análise do gráfico da figura 3.7, existe uma diferença na sensibilidade entre os dois compostos. Esta diferença ronda os 15% e portanto houve necessidade de proceder a um ajuste dos dados experimentais (ver legenda da figura 3.11).

No que respeita ao estudo de selectividade propriamente dito, procedeu-se à análise da eficiência de extracção de 4 fibras, sendo 2 de MIPs e as restantes de NIPs. Os resultados obtidos neste estudo apresentam-se na figura 3.11:

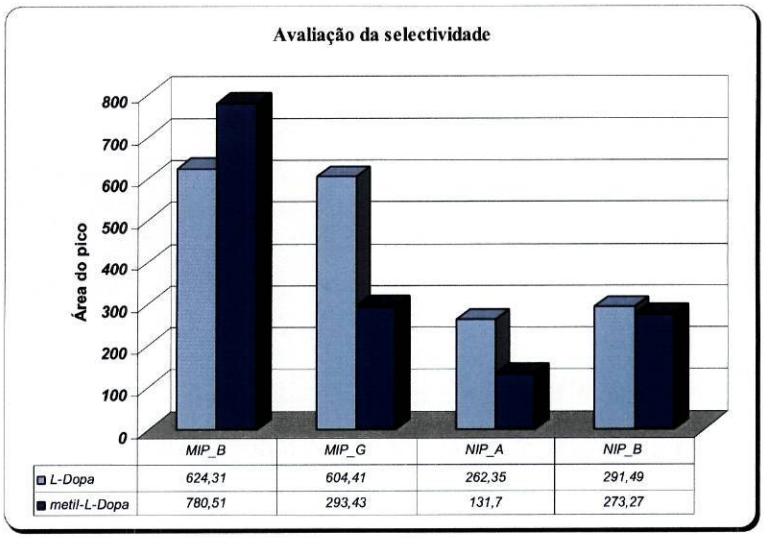


Figura 3.11 *- Gráfico correspondente à avaliação selectividade de diferentes fibras relativamente a dois analitos: L-Dopa e metil-L-Dopa. Os valores apresentados foram ajustados devido à diferença de sensibilidade entre os dois compostos.*

Com a realização deste estudo, seria de esperar que as fibras MIP extraíssem maior quantidade de L-Dopa do que Metil-L-Dopa e que os NIPs apresentassem uma capacidade de extracção semelhante relativamente aos dois compostos (mas inferiores aos MIPs). Porém, os resultados mostram que apenas um dos MIPs e um dos NIPs se comportam desta forma, enquanto que os restantes apresentam comportamentos que não seguem esta tendência.

Do referido, fica patente que os resultados apresentados não são suficientes para aferir das reais capacidades destas fibras para discriminar a L-Dopa do seu composto análogo, e portanto poderá afirmar-se que o estudo apresentado foi inconclusivo. Para além de ser necessário efectuar mais extracções para demonstrar a eficiência do método de preparação destas fibras, será fundamental recorrer a um novo conjunto de fibras.

3.5 Conclusão

Apesar de inicialmente previsto, não foi conseguida, neste estudo, a optimização da interface SPME-HPLC com os substratos utilizados, nomeadamente em fibra óptica, fio em liga de titânio e vidro modificado, sendo necessário recorrer à extracção "*off-line*".

No que respeita à preparação de fibras para SPME combinando a impressão molecular à tecnologia sol-gel, foi concluído que os MIPs apresentam uma capacidade de extracção para o composto L-Dopa significativamente superior aos NIPs revelando que, pela primeira vez, a aplicação da impressão molecular com polimerização sol-gel à produção de fibras para SPME é viável e merece especial atenção em trabalhos futuros.

Por fim, não foi possível avaliar a selectividade das fibras relativamente a um composto análogo à L-Dopa (no caso, Metil-L-Dopa), devido à insuficiência de dados experimentais. Será portanto importante realizar futuramente mais estudos que avaliem as potencialidades destas fibras.

3.6 Referências

1 Collinson, M.; Makote, R.; *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 2440-2445

2 Liron, Z.; Marx, S.; *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 3624-3630

3 Avnir, D.; Fireman-Shoresh, S.; Marx, S.; *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 3607-3613

4 Kunitake, T.; Lee, S.; *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 1–6

5 Mandler, D.; Marx, S.; Turyan, I.; Zaltsman, A.; *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 120-126

6 Chambers, J.; Lulka, M.; Thompson, R.; Valdes, E.; Valdes, J.; *Anal Lett*, **1997**, 30, 2301-2313

7 Glad, M.; Norrlow, O.; Mosbach, K.; Sellergren, B.; Siegbahn, N.; *J Chromatogr.*, **1985**, 347, 11-23

8 Gallezot, P.; Loisil, P.; Pinel, C.; *Adv Mat*, **1997**, 9, 582-585

9 Gudipati, E.; Venton, D.; *Biochim Biophys Acta - Protein Structure Molecular Enzymol*, **1995**, 1250, 26-36 (consulta indirecta)

10 Garcia-D. M.; Laíño, R.; *Microchim. Acta*, **2005**, 149, 19-36

11 Deng, G.; Gaber, B.; Klaehn, J.; Kust, P.; Markowitz, M.; *Anal Chim Acta*, **2001**, 435, 177-185

12 Hunnius, M.; Maier, W.; Rufinska, A.; *Microporous and Mesoporous Materials*, **1999**, 29, 389-403

13 Chang, C.; Joseph, A.; Lee, Y.; Lin, C.; Wang, Y.; *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 481, 175-180

14 Avnir, D.; Fireman-Shoresh, S.; Mandler D.; Marx, S.; Turyan, I.; *Langmuir*, **2005**, 21, 7842-7847

15 Dunnett, S.; Monville, C.; Torres, E.; *Brain Research Bulletin*, **2005**, 68, 16–23

16 http://en.wikipedia.org/wiki/L-DOPA

17 http://www.chem.ox.ac.uk/InorganicChemistry3/Chapters/chapter17/L-Dopa.html

18 Alves, T.; Costa, G.; Vieira de Melo, R.; Vieira de Melo, S.; *J. Supercritical Fluids*, **2005**, 34, 231–236

19 http://www.biopsychiatry.com/l-dopa.html

20 http://www.pvp.com.br/pvpport/pharmaceutical/levodopa.html

21 Campos, E.; Campos, S.; Carasek, E.; Oliveira, A.; Silveira, C.; *Talanta*, **2005**, 66, 74-79

22 Fadeev, A.; McCarthy, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 12184-12185

23 http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4760.pdf

24 http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4700/4643.pdf

25 Dj. Djozan, D.; Zehni, M.; *Chromatographia*, **2005**, 62 (3-4), 127-132

Considerações finais

O trabalho apresentado reflecte um esforço, que tem sido recentemente desenvolvido, no sentido de produzir novas fibras para SPME que representem melhorias significativas a nível tecnológico relativamente às demais fibras existentes no mercado.

O primeiro estudo desenvolvido, a preparação de fibras em substrato de titânio com partículas funcionalizadas incorporadas numa matriz, visava aproveitar as características intrínsecas dos grupos funcionais à superfície da partícula por forma a extrair selectivamente compostos com afinidades semelhantes. No entanto, foi concluído que não existe qualquer influência dos grupos funcionais das partículas de sílica, mas sim das partículas em si, ou seja, verificou-se que a quantidade de partículas e, consequentemente, a quantidade de PDMS que reveste o substrato é o factor responsável pelo aumento da capacidade de extracção dos compostos estudados.

Relativamente ao segundo estudo realizado, que consistiu no desenvolvimento de fibras com revestimento por impressão molecular com polimerização sol-gel, foi experimentado um tipo de substrato em vidro modificado, o qual permitiria aumentar a espessura do filme e, consequentemente, a eficiência de extracção das fibras. No entanto, não se verificou o esperado para as fibras estudadas. Estes resultados, contudo, não são conclusivos, uma vez que as fibras utilizadas para os estudos de extracção foram diferentes das fibras analisadas por SEM (técnica destrutiva). Adicionalmente, foi verificado que a espessura do substrato de vidro modificado não é constante ao longo da sua superfície, podendo este ser também um factor de influência.

No sentido de avançar com uma explicação, novos estudos terão de ser realizados, por exemplo, através de análises por SEM das fibras após os estudos de eficiência das mesmas. Deste modo, será possível conhecer a relação existente entre as capacidades de extracção das fibras e a espessura dos filmes.

A avaliação da eficiência de extracção das fibras em substrato de sílica fundida revelou, para os dois MIPs, que a quantidade de L-Dopa extraída foi invariavelmente superior (sempre superior ao dobro), demonstrando que estas fibras possuem uma maior afinidade para a L-Dopa do que o NIP. Não obstante a necessidade de realizar novos estudos com fibras diferentes, este estudo, apesar de exploratório, forneceu boas indicações acerca do potencial

desta fibra para extrair a L-Dopa, uma vez que foi possível obter eficiências de extracção semelhantes com duas fibras diferentes e em dias distintos.

Poderá ainda ser testada a eficiência de extracção de uma fibra com vários revestimentos sucessivos (promovendo assim o aumento da espessura dos filmes) e compará-la com as fibras revestidas apenas uma vez.

O estudo de selectividade realizado para estas fibras mostrou ser inconclusivo, devido à insuficiência de dados experimentais, e portanto, estudos adicionais quer a nível de selectividade, quer de enantioselectividade deverão ser efectuados. Depois de realizados os referidos estudos, a eficiência das fibras deverá ser testada em matrizes mais complexas, de forma a avaliar as suas reais potencialidades.

Apesar do filme em substrato em liga de titânio ter apresentado uma grande quantidade de fissuras, terão de ser realizados mais estudos sem, no entanto, se proceder ao acondicionamento da fibra a 100ºC. Este factor poderá ter sido responsável pela existência das mesmas fissuras.

Finalmente, este estudo, sendo o primeiro realizado na preparação de fibras para SPME e apesar de exploratório, demonstrou existirem motivos para a realização de novos estudos que complementem estes resultados.

Apêndice

A Princípios gerais das técnicas instrumentais analíticas

Sumário

A.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO REVESTIMENTO
A.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS
A.3. REFERÊNCIAS

A.1 Caracterização física do revestimento

A caracterização física dos revestimentos preparados neste estudo foi realizada por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM), contudo, existe um leque variado de outras técnicas de caracterização, como por exemplo, a porosimetria de adsorção de azoto, a porosimetria de mercúrio, a termoporosimetria, RMN de relaxamento spin-spin, "*Small-Angle Scattering*", absorção de raio X, microscopia atómica e microscopia de força atómica

Neste estudo, porém, apenas algumas destas técnicas poderiam ter sido utilizadas na caracterização do revestimento sol-gel, como por exemplo a técnica "*Small-Angle Scattering*".

A.1.1 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

Quando integrado numa unidade de detecção de raios X, o SEM (acrónimo inglês de microscópio electrónico de varrimento) torna-se um instrumento de larga utilização no apoio à investigação e no desenvolvimento e controlo de qualidade de materiais de aplicação tecnológica.

Entre as suas aplicações, destacam-se a caracterização microestrutural de materiais de diversos tipos, as aplicações em áreas tão importantes como a medicina ou a biologia, ou mesmo no desenvolvimento e controlo de qualidade de semicondutores e no desenvolvimento de estudos de corrosão e desgaste[1]. Relativamente ao objectivo do presente estudo, esta técnica adquire vital importância, uma vez que permitiu a visualização dos filmes e revestimentos produzidos.

A.1.1.1 Fundamentos teóricos

A microscopia electrónica baseia-se na incidência de um feixe de electrões acelerados permitindo assim, sem efeitos de difracção significativos, originar um feixe electrónico de diâmetro e abertura angular muito reduzidos. Ao comportamento aleatório deste feixe, está associado um comprimento de onda que diminui com o aumento da energia cinética. É possível, deste modo, obter um poder resolvente e uma profundidade de campo muito superiores aos obtidos em microscopia óptica.

O sistema óptico do microscópio electrónico fundamenta-se, quer na produção de um feixe de electrões de energia cinética controlada, quer na utilização de campos electromagnéticos com conformação e intensidades adequados, de modo a conseguir a configuração e focagem do feixe de electrões. Uma vez que este tipo de análise exige a utilização de câmaras de alto-vácuo, as características das amostras para observação são restritas.

De seguida enunciam-se algumas das condições que as amostras, quando analisadas ao microscópio electrónico, deverão obedecer[1]:

- ✓ Estabilidade em condições de alto-vácuo;
- ✓ Condutividade eléctrica superficial (assegurada, por exemplo, pela aplicação de um filme de revestimento condutor);
- ✓ Estabilidade física e química, nas condições de observação/interacção com o feixe de electrões.

A.1.1.2 Funcionamento

Na microscopia electrónica de varrimento, faz-se incidir um feixe de electrões, finamente focado, que percorre sequencialmente a superfície da amostra originando a sua respectiva imagem num monitor. A energia transmitida à amostra por esses electrões é suficiente para que localmente esta, por sua vez, emita diferentes tipos de radiação, ou seja, diferentes tipos de electrões. Na figura A.1 apresenta-se um esquema da estrutura e do funcionamento do microscópio electrónico.

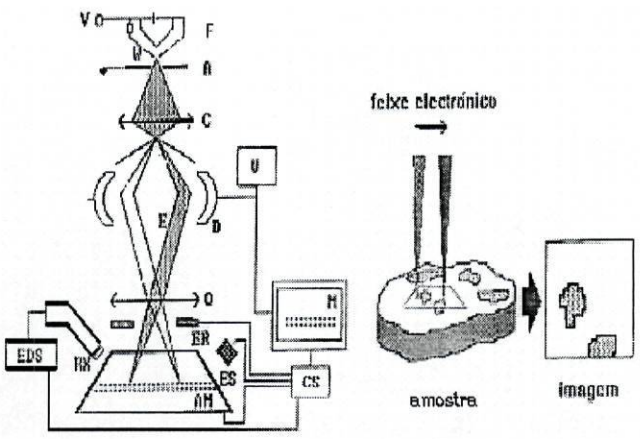


***Figura A.1** - Estrutura e funcionamento do SEM[1]*
***ES, ER, RX** – detectores de electrões secundários, retrodifundidos e raios X;*
***E** – fei3xe de electrões; **AM** – amostra; **V** – controlo de varrimento;*
***D** – bobines de deflexão; **CS** – condicionamento de sinal; **M** – monitor*
***F, W** – filamento e whenelt; **A** – ânodo; **O** – objectiva; **C** – condensador*

Entre os electrões que são emitidos (figura A.2), destacam-se os electrões secundários (baixa energia), os electrões *Auger* (energia de cerca de 2.5 keV) e os electrões retrodifundidos (energia elevada). São igualmente emitidas radiação visível (fotões) e raios X[1].

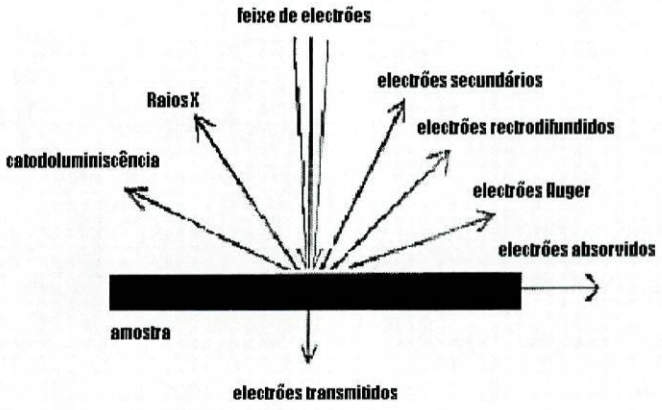


***Figura A.2** - Tipos de electrões emitidos em análise SEM*[1]

A composição química será uma ferramenta que facilitará a observação das imagens obtidas por SEM e consequentemente ajudará na caracterização do revestimento. Como para cada elemento existe um espectro raio X característico, o espectrómetro raios X permitirá identificar qualquer elemento presente na amostra.

O tratamento da amostra, utilizado neste trabalho, consiste na pulverização de modo a produzir um filme fino de ouro o qual reveste a amostra. O ouro é o metal utilizado devido à necessidade de proporcionar uma boa condutividade durante o processo de análise.

O estudo realizado por SEM irá, deste modo, permitir a caracterização da morfologia dos revestimentos desenvolvidos neste trabalho, através da obtenção de imagens numa gama de amplificações (de x10 a x500000) e com uma profundidade de campo muito superiores aos obtidos em microscopia óptica[1]. Será portanto um instrumento de grande relevância para o conhecimento dos progressos alcançados ao longo do presente estudo.

A.2 Técnicas cromatográficas

A.2.1 Cromatografia – considerações gerais

Etimologicamente formada pela conjugação das palavras gregas *chroma* (cor) e *graphein* (escrita), a cromatografia é a técnica analítica de separação por excelência (desenvolvida no início do século XX pelo botânico russo Mikhail Tswett), uma vez que se trata do método mais aplicado na identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Esta técnica compreende a passagem dos componentes de uma mistura através de uma fase estacionária por acção de um fluxo de uma fase móvel líquida ou gasosa, de modo a que a separação se processe com base nas diferenças de velocidades de migração dos diferentes componentes.

Em geral, os métodos cromatográficos apresentam-se classificados em dois tipos: cromatografia em coluna e cromatografia plana. Na cromatografia em coluna, a fase estacionária é sustentada num estreito tubo e a fase móvel é forçada a passar através do tubo sob pressão ou por acção da gravidade. Na cromatografia plana, a fase estacionária é fixa a uma placa ou nos poros de um papel, enquanto que a fase líquida atravessa a fase estacionária por acção capilar ou por acção da gravidade. Na tabela A.1 encontram-se descritos os diferentes tipos de métodos cromatográficos em coluna, (actualmente estes são os métodos mais utilizados), diferenciados com base no tipo de fase móvel utilizada.

***Tabela A.1** – Resumo de algumas características da cromatografia líquida, gasosa e com fluídos supercríticos*

Classificação geral	Fase móvel	Fase estacionária	Método específico	Tipo de equilíbrio
Cromatografia líquida (LC)	Líquida	Líquido adsorvido num sólido	Líquido-líquido ou partição	Partição entre líquidos imiscíveis
		Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Fase ligada líquida	Partição entre líquido e superfície ligada
		Sólida	Líquido-Sólido ou adsorção	Adsorção
		Resina de permuta iónica	Permuta iónica	Permuta iónica
		Líquido em interstícios de um sólido polimérico	Exclusão	Partição
Cromatografia gasosa (GC)	Gás	Líquido adsorvido num sólido	Gás – Líquido	Partição entre gás e líquido
		Espécies orgânicas ligadas a superfície sólida	Fase ligada gasosa	Partição entre líquido e superfície ligada
		Sólida	Gás – Sólido	Adsorção
Cromatografia por fluidos supercríticos (SFC)	Fluído supercrítico	Espécies orgânicas ligadas a superfície sólida	--------	Partição entre fluído supercrítico e superfície ligada

Ainda para este tipo de classificação, também a fase estacionária serve de base à diferenciação entre cada um dos métodos cromatográficos específicos, os seja, dependendo da natureza líquida ou sólida (e consequentemente do tipo de equilíbrio envolvido), os métodos dividem-se em cromatografia de partição ou de adsorção, respectivamente.

A cromatografia de adsorção é baseada na adsorção de substâncias líquidas ou gasosas em superfícies sólidas. Uma vez que os seus coeficientes de distribuição (razão entre a quantidade de analito presente numa determinada quantidade de na fase estacionária e a quantidade analítica na fase móvel) são na sua grande maioria superiores aos característicos para a cromatografia de partição, este tipo de cromatografia apenas se torna útil para a separação de analitos que não são retidos nas colunas líquido-líquido ou gás-líquido.

Na cromatografia em geral, ocorre a eluição da fase móvel através da fase estacionária, ou seja, os solutos dissolvidos na fase móvel são distribuídos entre as duas fases. Uma vez que o movimento dos solutos apenas sucede na fase móvel, a velocidade de migração média dos solutos depende da fracção de tempo que este passa na referida fase. Neste contexto, esta fracção é pequena para solutos fortemente retidos na fase estacionária e é grande para solutos com maior afinidade para a fase móvel[2].

De seguida (figura A.3), apresenta-se um esquema representativo do processo cromatográfico que ocorre quando se pretende separar dois solutos com diferentes afinidades relativamente às duas fases.

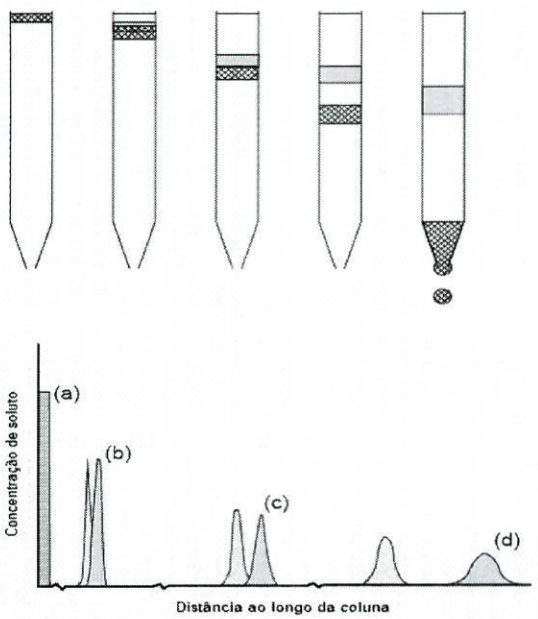


***Figura A.3** - Progresso de uma separação de dois solutos numa coluna cromatográfica e respectivo cromatograma: (a) início da eluição; (b) e (c) início da separação dos solutos; (d) separação de cada soluto em bandas individuais*[3]

Representando o sinal da concentração do soluto (à qual um detector colocado no fim da coluna responde) em função do tempo (ou do volume de fase móvel), obtém-se um cromatograma. Este consiste numa série de picos simétricos e permite de uma forma simples a análise qualitativa e quantitativa dos analitos dissolvidos num soluto.

Quando a amostra é introduzida no topo da coluna, é observada uma banda estreita no início do cromatograma, a qual, em condições ideais apresenta uma forma rectangular (figura A.3a). À medida que a amostra desce ao longo da coluna, os solutos iniciam um processo de separação e as respectivas bandas começam a alargar adquirindo uma forma gaussiana (figura A.3b e A.3c). Por fim, se as interacções de cada um dos solutos com a fase estacionária forem suficientemente diferentes, ocorre a separação dos dois solutos em bandas individuais (figura A.3d)[3].

A eficácia de uma coluna cromatográfica é avaliada pela sua capacidade de separar dois solutos e consequentemente, pela velocidade relativa com que os solutos são eluídos. De seguida, apresentar-se-ão alguns dos parâmetros que caracterizam um pico cromatográfico, bem como a eficiência da sua separação em cromatografia de partição.

A.2.1.1 Velocidade de migração dos solutos

a) Razão de partição/distribuição de um soluto

A velocidade de migração dos solutos depende das razões de partição dos solutos por ambas as fases no equilíbrio:

$$\text{Soluto}_{\text{fase móvel}} \Leftrightarrow \text{Soluto}_{\text{fase estacionéria}}$$

A constante de equilíbrio para esta reacção é denominada por razão de partição ou coeficiente de partição e é definida por:

$$K = \frac{c_e}{c_m}$$

Equação A.1

Em que c_e representa a concentração molar do soluto na fase estacionária e c_m representa a concentração molar do soluto na fase móvel. Idealmente, a razão de partição é constante num grande intervalo de concentrações, ou seja, c_e é directamente proporcional a c_m, desde que o

soluto não se encontre envolvido em nenhum outro equilíbrio quer na fase móvel, quer na fase estacionária[2].

b) Tempo de retenção de um soluto

Na figura A.4 é apresentado um cromatograma no qual se destaca o tempo de retenção, t_r, o tempo morto, t_M, e a largura de banda (adiante discutida), *w*. O pequeno pico da esquerda corresponde às espécies que não são retidas pela fase estacionária e define o tempo morto, t_M. Este pico permite a determinação da velocidade de migração da fase móvel:

$$u = \frac{L}{t_M}$$

Equação A.2

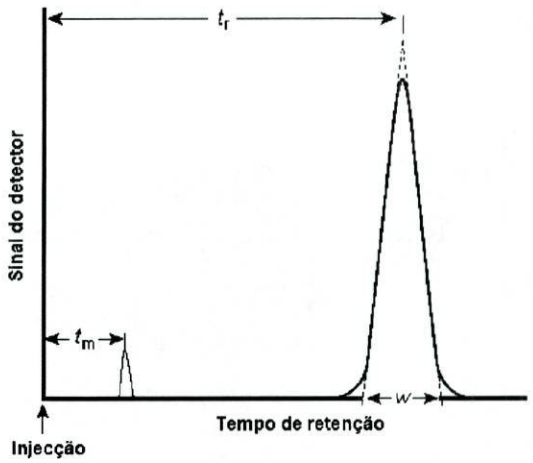


Figura A.4 *- Cromatograma mostrando as bandas correspondentes ao tempo morto (t_m) e ao tempo de retenção de um soluto (t_r)*[3]

em que *u* corresponde à velocidade linear média da fase móvel e *L* ao comprimento da coluna.

No pico da direita da figura A.4, está representado o tempo de retenção, t_r, que é definido como o tempo necessário para que o soluto alcance o detector após a injecção da amostra[2]. Este tempo de retenção pode igualmente ser obtido indirectamente a partir do volume de retenção, V_r (volume de fase móvel que passa através da coluna entre o ponto de injecção e o máximo do pico cromatográfico), dividindo o último pela velocidade da fase móvel, *u*.[3]

Por fim, a velocidade linear média de migração do soluto é expressa como[2]:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_r}$$

Equação A.3

As duas grandezas descritas pelas equações A2 e A3 estão relacionadas através da fracção de tempo que o soluto passa na fase móvel (definida como a razão entre o número médio de

moles de soluto na fase móvel em cada instante pelo número total de moles de soluto na coluna) e é expressa pela equação A.4:

$$\bar{v} = u \times f_t^M$$

Equação A.4

em que f_t^M corresponde à fracção de tempo que o soluto passa na fase móvel. Ou ainda,

$$\bar{v} = u \times \frac{n_M}{n_T}$$

Equação A.5

Na equação A.5, n_M designa o número médio de moles de soluto na fase móvel em cada instante e n_T o número total de moles de soluto na coluna.

Ainda no que diz respeito à figura A.4, a largura de banda, *w*, é igualmente um importante parâmetro na caracterização de um pico cromatográfico. Este parâmetro é determinado pela intercepção das linhas tangentes aos pontos de inflexão, em cada um dos lados do pico cromatográfico, com a linha de base.

c) Factor de capacidade

O factor de capacidade é um parâmetro utilizado para descrever a velocidade de migração dos solutos nas colunas cromatográficas. Para um dado soluto X, o factor de capacidade é definido como:

$$k'_X = \frac{K_X V_e}{V_m}$$

Equação A.6

Este parâmetro é utilizado também como uma medida do grau de saturação do soluto pela fase estacionária, ou seja, quanto mais tempo o componente fica retido pela coluna, maior é o factor de capacidade, *k'*. A equação A.6 pode assim ser reescrita da seguinte forma[2]:

$$k'_X = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

Equação A.7

d) Factor de selectividade

O factor de selectividade, α, é definido como o quociente entre os factores de capacidade de dois solutos diferentes, revelando a selectividade por um dos solutos:

$$\alpha = \frac{k'_Y}{k'_X} = \frac{(t_r)_Y - t_M}{(t_r)_X - t_M}$$

Equação A.8

As designações dos solutos são escolhidas de tal forma que aquele que possui menor tempo de retenção surge no numerador da equação A.8. Deste modo, o factor de selectividade é igual a 1 quando os tempos de retenção são iguais e é maior do que 1 quando o tempo de retenção de Y é maior do que o tempo de retenção de X.[3]

A.2.1.2 Eficiência da coluna cromatográfica

A eficiência de uma coluna cromatográfica depende fundamentalmente de dois factores, nomeadamente a diferença nos tempos de eluição entre picos (quanto mais afastados os picos, melhor a sua separação) e o alargamento dos picos (quanto mais largos os picos, pior é a sua separação). Serão estes dois factores e os respectivos parâmetros que de seguida irão ser abordados[4].

a) Resolução cromatográfica

Sendo a resolução (R) uma medida quantitativa do grau de separação entre dois picos cromatográficos, este parâmetro vai de encontro ao principal objectivo da cromatografia, o qual passa por separar da forma mais eficaz uma amostra numa série de picos cromatográficos, cada um dos quais representando um componente individual da amostra.

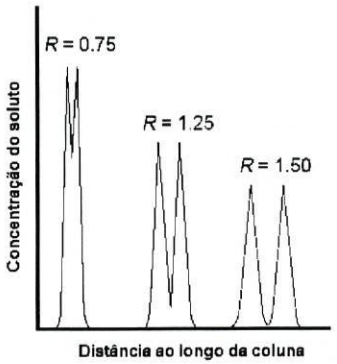


***Figura A.5** - Relação entre a resolução cromatográfica e a qualidade de separação de dois picos*[3]

A resolução é expressa de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{(t_r)_Y - (t_r)_X}{0{,}5(w_Y + w_X)} = \frac{2\Delta t_r}{w_Y + w_X} = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_X}{1 + k'_X}\right)$$

Equação A.9

Em que w_Y e w_X corresponde respectivamente à largura de banda dos componentes Y e X e N ao número de pratos teóricos (ver adiante). Tal como mostra a figura A.5, quanto maior o valor de R, melhor é a separação entre dois picos[3].

b) Difusão

Tal como a resolução, este parâmetro ganha especial realce uma vez que é igualmente uma das principais razões para o alargamento de banda de um pico cromatográfico. A difusão é uma propriedade medida através do coeficiente de difusão, o qual representa a constante de proporcionalidade entre o número de moles que atravessa cada metro quadrado por segundo. A expressão que traduz esta relação é apresentada de seguida.

$$\text{fluxo}\left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^2.\text{s}}\right) = -D.\frac{dc}{dx}$$

Equação A.10

Deverá ser referido ainda que o sinal negativo surge devido ao facto de o fluxo progredir de zonas de maior concentração para zonas de menor concentração. Ainda, esta propriedade permite determinar o desvio padrão de uma banda, ou seja[4],

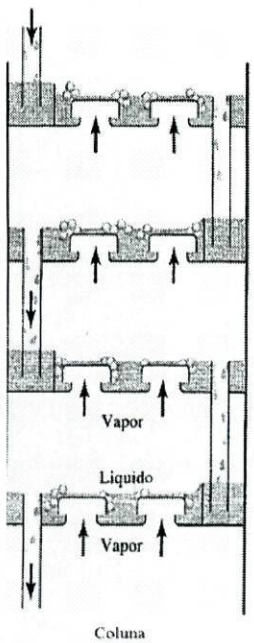
$$\sigma = \sqrt{2Dt}$$

Equação A.11

c) Prato teórico

Nos modelos teóricos de cromatografia define-se a eficiência da coluna quer em termos de altura do prato teórico (H), quer em termos de número de pratos teóricos (N). O prato teórico consiste numa série de pequenas zonas (pratos), nos quais ocorre a partição dos solutos entre as fases móvel e estacionária (figura A.6)[4].

Ambos os parâmetros estão relacionados pela expressão:



$$N = \frac{L}{H}$$

Equação A.12

na qual L corresponde ao comprimento da coluna e H à altura do prato teórico. Uma vez que a eficiência de uma coluna cromatográfica aumenta com o aumento do número de pratos teóricos e com a diminuição da altura do prato teórico, torna-se necessário conhecer quais os factores que afectam estes dois parâmetros[2].

***Figura A.6** – Esquema ilustrativo da definição de prato teórico*[2]

Admitindo um perfil gaussiano (acima referido) para os picos cromatográficos e sabendo que a extensão do alargamento da banda é medida através do desvio padrão associado (equação A.11), é possível definir a altura do prato teórico como uma função da variância:

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Equação A.13

Dividindo o desvio padrão pela velocidade linear média da fase móvel, u, obtém-se um desvio padrão em unidades de tempo, τ (equação A.14), o qual pode ser relacionado com a largura de banda, *w*, através da equação A.15.

$$\tau = \frac{\sigma . t_r}{L}$$

Equação A.14

$$w = 4.\tau$$

Equação A.15

Este conjunto de relações deriva finalmente numa expressão que traduz a eficiência de uma coluna cromatográfica com o tempo de retenção de um soluto e com a largura de banda do respectivo pico[2,3]:

$$N = 16\left(\frac{t_r}{w}\right)^2$$

Equação A.16

d) Equação de van Deemter

O alargamento de banda, e portanto, a diminuição da eficiência da coluna é consequência da velocidade finita à qual ocorrem vários processos de transferência de massa durante a migração de um soluto ao longo de uma coluna. Apesar de se conhecer as diversas variáveis experimentais que afectam a eficiência de uma coluna, verifica-se que nenhuma é inteiramente adequada para explicar as complexas interacções físicas que originam o alargamento de banda[2].

No entanto, vários modelos têm vindo a surgir na tentativa de esclarecer quais e como estas variáveis afectam a eficiência de uma coluna. A equação de van Deemter é um desses exemplos e é traduzida pela expressão:

$$H = \frac{B}{u} + C_e.u + C_m.u$$

Equação A.17

Nesta expressão, o termo $\frac{B}{u}$ refere-se à difusão longitudinal a qual resulta da migração de um soluto desde o centro concentrado de uma banda para as regiões mais diluídas em cada um

dos lados. A magnitude do termo B é determinada pelo coeficiente de difusão (D, na equação A.10) do analito na fase móvel, sendo directamente proporcional a esta constante.

O segundo termo na equação, $C_e.u$, o qual é vulgarmente denominado por coeficiente de transferência de massa da fase estacionária, combina os efeitos dos fenómenos de transferência de massa que ocorrem durante a difusão dos solutos na fase líquida e no suporte sólido. Finalmente, o terceiro termo, $C_m.u$, denominado por coeficiente de transferência de massa da fase móvel, apresenta uma grande dependência com a velocidade da fase móvel e está relacionada com variabilidade de caminhos que o soluto dissolvido na fase móvel percorre através das partículas empacotadas ao longo da coluna.

Na figura A.7, apresentam-se os efeitos que a velocidade da fase móvel tem nos referidos termos da equação de van Deemter. A curva superior representa o somatório dos vários efeitos e verifica-se que existe uma velocidade de fase móvel óptima à qual a altura do prato teórico é um mínimo e a eficiência de separação é um máximo[2].

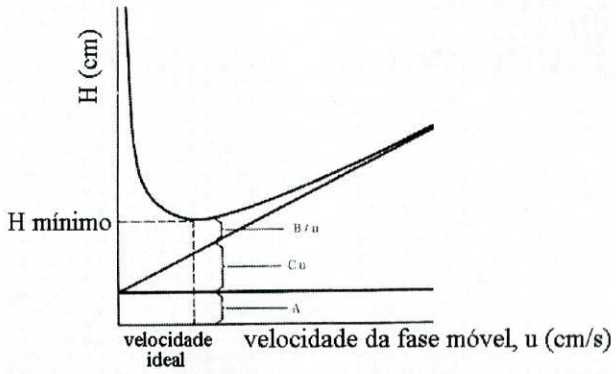


***Figura A.7** – Gráfico representativo dos efeitos da velocidade da fase móvel nos termos da equação de van Deemter[2]*

A.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida adquire especial relevância uma vez que a maioria dos analitos não são suficientemente voláteis para aplicação em cromatografia gasosa.

Com o aumento das exigências de eficiência e resolução dos sistemas cromatográficos líquidos, surge a cromatografia líquida de alta eficiência, a qual combina o aumento da velocidade de difusão do soluto através da fase estacionária com a diminuição da altura dos pratos teóricos e consequentemente com o aumento da eficiência da separação.

Neste contexto, este tipo de cromatografia caracteriza-se por utilizar elevadas pressões de modo a ser possível aumentar o fluxo de fase móvel (e de soluto dissolvido) através de um empacotamento de partículas de dimensões na ordem dos micrómetros. A separação é

determinada pelas interacções entre o soluto e a fase estacionária incluindo a partição (líquido-líquido), adsorção (líquido-sólido), permuta iónica e dois tipos de cromatografia de exclusão, nomeadamente as cromatografias de permeação-gel e filtração-gel[2].

No que diz respeito ao objectivo da presente tese, apenas irá serão abordadas as técnicas de cromatografia de partição e de adsorção, para a qual se descreve de seguida alguns dos componentes instrumentais em HPLC.

A.2.2.1 Instrumentação em HPLC

Na figura A.8, encontra-se esquematizado um sistema de HPLC (bomba quaternária) com os diferentes componentes. Entre os vários componentes, destacam-se a bomba isocrática, o injector, a pré-coluna e a coluna e por fim o detector.

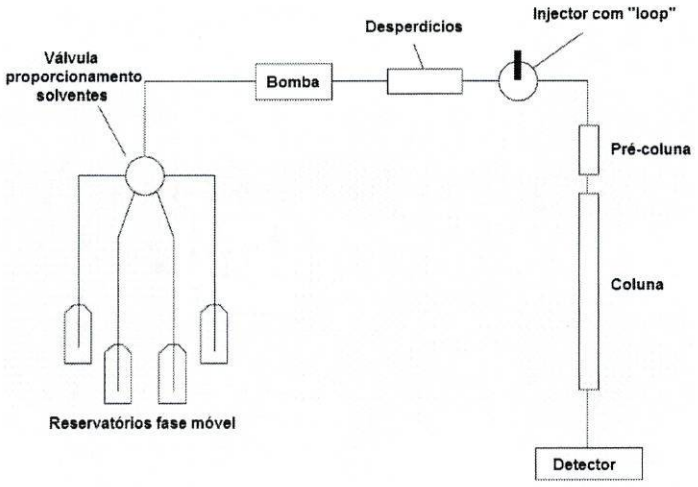


***Figura A.8** – Representação esquemática dos diferentes componentes de um sistema HPLC com bomba quaternária*[3]

A bomba, um dos componentes principais do sistema cromatográfico, deverá originar pressões até 6000psi, fluxos entre 0,1 e 10 $mL.min^{-1}$ e possuir resistência à corrosão relativamente a uma grande variedade de solventes, entre outras características.

O tipo de bomba de uso mais abrangente, a denominada bomba recíproca, apresenta algumas vantagens entre as quais se destacam um pequeno volume interno, a promoção de altas pressões (até 10000psi), a rápida adaptação à eluição de gradiente e permite a utilização de fluxos constantes[2].

a) Sistema de injecção

Em HPLC, a amostra é introduzida através de um injector em "loop", o qual, em posição "load" se encontra isolado da fase móvel e aberto para a atmosfera. Após a injecção da amostra (válvula em posição "inject"), a fase móvel desloca-se através do "loop" e a amostra é arrastada para a coluna[3].

b) Colunas analíticas

Geralmente constituídas por um tubo de aço inoxidável, as colunas em HPLC são empacotadas com pequenas partículas de sílica porosas com dimensões entre 3 e 10μm e apresentam uma eficiência típica de 40000 a 60000 pratos teóricos por metro. Posicionadas no sistema cromatográfico antes da coluna propriamente dita, as pré-colunas têm como principal função aumentar o tempo de vida da coluna que a sucede (contém o mesmo material de empacotamento)[3].

c) Detectores

Em HPLC, tal como noutras técnicas cromatográficas, um detector ideal será aquele que seja sensível a baixas concentrações para cada analito, origine uma resposta linear, não origine alargamento dos picos cromatográficos e que não seja sensível a variações de temperatura e composição de solventes. Porém, para este tipo de cromatografia tal detector não se encontra disponível.

Destacam-se de seguida alguns dos mais utilizados detectores em HPLC, nomeadamente os detectores espectroscópicos, electroquímicos e referem-se ainda outros detectores. A nível da detecção espectroscópica, a absorção UV/Vis e a fluorescência ocupam um lugar de destaque nestes sistemas cromatográficos (limites de detecção de 100pg a 1ng e 1 a 10pg respectivamente), principalmente quando é utilizado um sistema de "*diode array*", o qual permite um varrimento a todos os comprimentos de onda[3].

Os detectores electroquímicos caracterizam-se fundamentalmente por medições voltamétricas, amperométricas, coulorimétricas ou condutimétricas com limites de detecção de aproximadamente 10pg a 1ng. Existem outros detectores com aplicação em HPLC, sendo a espectrometria de massa aquela que proporciona maior sensibilidade experimental, com limites de detecção que em alguns casos atingem o intervalo de 1 a 10pg de analito. Apresenta

no entanto uma limitação que não se aplica à cromatografia gasosa, ou seja, existe incompatibilidade entre a fase móvel líquida e os requisitos de alto vácuo do espectrómetro de massa, dificultando a interface com o sistema cromatográfico[3].

A.2.2.2 Aspectos práticos em HPLC

As denominadas fases estacionárias ligadas têm predominado em relação às fases estacionárias líquido-líquido devido à maior estabilidade que confere ao respectivo empacotamento através das ligações covalentes características. Estas fases estacionárias são ligadas pela reacção das partículas de sílica com um organoclorosilano de fórmula geral $Si(CH_3)_2RCl$, sendo R um grupo alquilo (figura A.9).



***Figura A.9** – Esquema de um exemplo da formação de uma fase estacionária*[3]

As propriedades da fase estacionária são determinadas pelo grupo alquilo ligado ao organosilano, sendo a polaridade da fase estacionária estabelecida pelo carácter polar ou apolar do referido grupo. A fase móvel possuirá sempre polaridade contrária à fase estacionária.

Neste contexto, denomina-se cromatografia de fase normal à combinação de uma fase estacionária polar com uma fase móvel apolar e por cromatografia de fase reversa à combinação inversa, ou seja, à combinação de uma fase estacionária apolar com uma fase móvel polar[3].

Um processo cromatografia de partição eficiente implica um balanço apropriado das forças intermoleculares entre ambas as fases e ainda com o analito em estudo. Este balanço depende qualitativamente da polaridade relativa dos três intervenientes. Torna-se assim de grande importância avaliar cuidadosamente a escolha das duas fases para cada analito estudado[2].

A.2.2.3 Escolha da fase estacionária e da fase móvel

As separações cromatográficas são, geralmente, conseguidas fazendo coincidir a polaridade do analito com a polaridade da fase estacionária[2]. A escolha da fase móvel, por outro lado, apresentará uma polaridade consideravelmente diferente, utilizando-se mais frequentemente solventes que se adicionam à água em diferentes proporções, como o metanol ou o acetonitrilo, entre outros[3].

Em HPLC de partição, a eluição pode ser realizada usando um único solvente com composição constante (isocrática) e que seja compatível com a maior parte dos solutos. Alternativamente, a composição do solvente é alterada ao longo da separação cromatográfica, denominando-se eluição por gradiente[3].

A.2.3 Cromatografia gasosa

Os princípios gerais de separação e as relações matemáticas descritos anteriormente para a cromatografia líquido-líquido são aplicáveis também na cromatografia gás-líquido com apenas algumas modificações que emergem devido à compressibilidade das fases móveis gasosas.

Ao contrário de outras técnicas cromatográficas, em cromatografia gasosa (GC) a fase móvel não interactua com as moléculas do analito, tendo como função única a de transportar o analito através da coluna após a injecção da amostra, a qual é vaporizada para a cabeça da coluna cromatográfica[2].

A cromatografia gasosa é baseada na partição do analito entre uma fase móvel gasosa e uma fase líquida imobilizada na superfície de um sólido inerte (fase estacionária líquida) onde ocorre a retenção dos analitos por absorção. Nesta técnica torna-se mais útil utilizar o volume de retenção (V_r), em vez do tempo de retenção, de modo a ter em conta os efeitos de pressão e temperatura.

A relação entre os dois é descrita pelas equações A.18 e A.19:

$$V_r = t_r \times F$$

Equação A.18

$$V_M = t_M \times F$$

Equação A.19

em que F corresponde ao fluxo médio que passa através da coluna e V_M corresponde ao volume morto.

O fluxo médio que passa através da coluna não pode ser directamente medido, por essa razão, é determinado experimentalmente a velocidade do gás quando sai da coluna através de um medidor de fluxo.

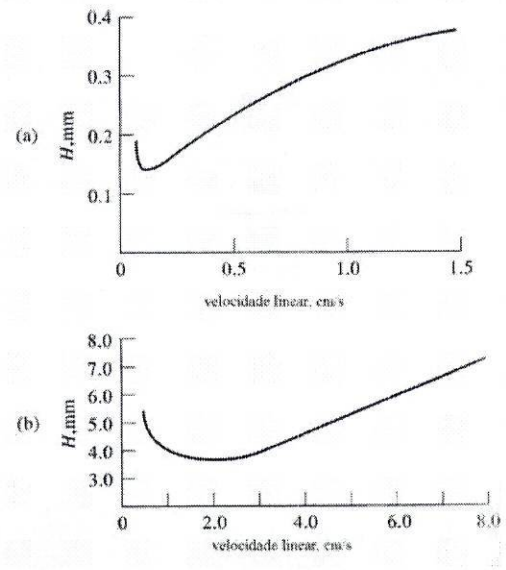


***Figura A.10** – Efeito do fluxo da fase-móvel na altura do prato teórico para (a) cromatografia líquida e (b) cromatografia gasosa*[5]

Os efeitos da velocidade da fase móvel são também um parâmetro que distingue esta técnica da cromatografia líquido-líquido, nomeadamente no que diz respeito ao termo B/u o qual ganha maior importância na cromatografia gás-líquido. Uma vez que as velocidades de difusão dos gases são muito superiores às dos líquidos (10^4 vezes), o mínimo observado para a curva que relaciona a altura do prato teórico (H) com estas velocidades é consideravelmente mais alargada, como é possível verificar na figura A.10.[5]

A.2.3.1 Instrumentação em GC

Os componentes básicos de um cromatógrafo gasoso encontram-se esquematizados na figura A.11 , sendo de destacar o bloco do injector e do detector, e o forno, onde se localiza a coluna de separação.

De seguida abordar-se-á alguns dos componentes mais importantes neste tipo de sistema.

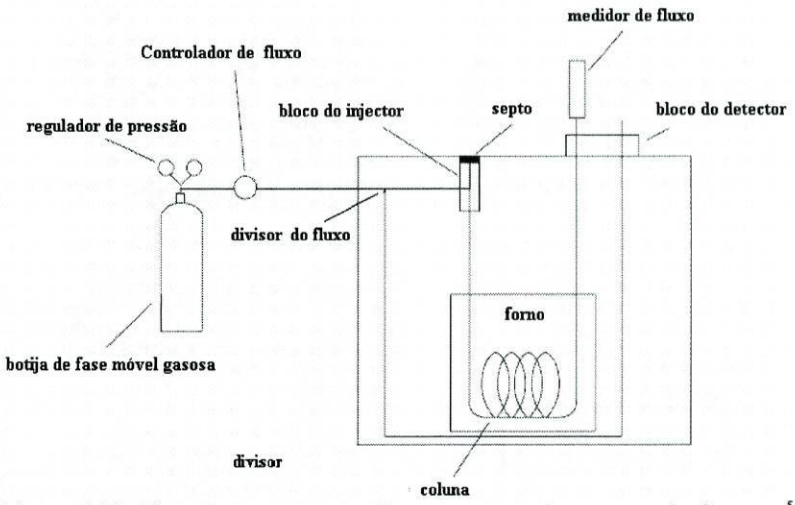


Figura A.11 – Esquema representativo dos componentes de um cromatórafo gasoso[5]

a) Tipos de colunas e forno

Os tipos de coluna geralmente utilizados em cromatografia gasosa são as colunas de empacotamento e as colunas capilares tubulares abertas. Estas são construídas em aço inoxidável, sílica fundida ou Teflon e podem possuir um comprimento entre 2 a 60 metros[5].

No entanto, enquanto que nas colunas de empacotamento, a fase estacionária é baseada num material de suporte granulado, nas colunas capilares não possuem material de suporte (nestas, a fase estacionária liquida é depositada nas paredes do capilar)[6].

A temperatura da coluna é uma variável muito importante em CG e portanto deve ser rigorosamente controlada. Por este motivo, a coluna é mantida no interior de um forno termostatizado[5].

b) Fase móvel

As fases móveis mais comuns em cromatografia gasosa são He, Ar, N_2 e H_2, os quais apresentam a vantagem de serem quimicamente inertes quer relativamente à amostra, quer em relação à fase estacionária. A escolha destes gases depende em parte do detector usado.

O fluxo da fase móvel (que deve ser mantido constante para medições reprodutíveis) é controlado por um regulador de pressão na cabeça da botija e apresenta uma pressão de entrada típica na gama de 10 a 50psi, originando fluxos de 25 a 150mL/min para colunas de empacotamento e de 1 a 25mL/min para colunas capilares de tubo aberto[6].

c) Sistema de injecção

A injecção da amostra envolve o uso de uma microseringa que permite a introdução da amostra líquida ou gasosa através de um septo para uma câmara de vaporização colocada no topo da coluna.

A injecção deverá ser efectuada de forma rápida, para que a amostra passe à fase de vapor (para tal, o injector deverá estar a uma temperatura suficientemente elevada – 150 a 300ºC) pois uma injecção lenta origina o alargamento dos picos cromatográficos.

Usando colunas de empacotamento são normalmente injectados volumes entre 0,5 a 20μL, enquanto que com colunas capilares o volume de amostra injectado está entre 0,5 a 2μL, porém, deste volume, apenas 0,005 a 0,02μL passam efectivamente para a coluna após atravessar a divisão do fluxo de gás de arraste[5].

d) Detectores

Os detectores utilizados em CG apresentam limites de detecção entre 10^{-8} a 10^{-15}g/s e idealmente deveriam possuir[5]:

- boa estabilidade e reprodutibilidade,
- resposta linear a solutos numa vasta gama de magnitudes,
- gama de temperaturas desde a temperatura ambiente até pelo menos 400ºC,
- tempo de resposta independente do fluxo da fase móvel,
- boa fiabilidade e facilidade de utilização,
- não destrutivo.

O detector de ionização por chama (FID) é o detector mais utilizado e é aquele com aplicação mais generalizada. Este detector possui uma sensibilidade elevada dependendo dos compostos (~10^{-13}), um grande intervalo de resposta linear (10^{7}), um baixo ruído e é de fácil utilização; apresenta a desvantagem de destruir a amostra durante a análise[5].

Actualmente, o detector mais importante e mais utilizado é o detector por espectrometri a de massa (MS), no qual o efluente proveniente da coluna é introduzido directamente na câmara de ionização do espectrómetro de massa de tal forma que é eliminado a maioria do gás de arraste. Nesta câmara, todas as moléculas (gás de arraste residual, solvente e solutos) são ionizados e os iões são separados através da razão massa/carga.

Devido ao facto de cada soluto possuir uma fragmentação em iões mais pequenos característica, é possível identificá-los de uma forma qualitativa através do seu espectro de massa (intensidade do ião como função da razão massa/carga). Este tipo de detectores permitem obter limites de detecção muito baixos (25fg a 100pg)[3].

Os detectores de condutividade térmica (TCD), apesar de serem dos primeiros detectores desenvolvidos, apresentam ainda grande aplicação devido ao seu carácter não destrutivo e à boa resposta quer para espécies orgânicas, quer a espécies inorgânicas; a sua baixa sensibilidade é, no entanto, uma grande limitação.

Para amostras ambientais, o detector por captura electrónica (ECD) tem encontrado uma elevada receptividade, dada a sua elevada selectividade em amostras mais complexas apresentando simultaneamente a vantagem de não alterar significativamente a amostra. Por outro lado, a sua gama de resposta linear está limitada a duas ordens de magnitude.

Existem ainda alguns detectores com aplicações mais específicas tais como os detectores termoiónicos (TID), detectores de emissão atómica (AED), detectores de quimioluminiscença de enxofre (SCD) ou detectores fotométricos por chama, os quais são menos utilizados neste tipo de cromatografia[5].

A.2.3.2 Aspectos práticos em CG

Em cromatografia gasosa, a selectividade é influenciada pela escolha da fase estacionária. No caso particular da cromatografia gás-líquido, a ordem de eluição é determinada pelo ponto de ebulição do soluto e pela sua interacção com a fase estacionária. Se por um lado solutos com pontos de ebulição muito diferentes são facilmente separados, por outro, solutos com pontos de ebulição próximos podem apenas ser separados se a fase estacionária interagir em maior extensão com um deles.

De um modo geral, fases estacionárias não polares separam mais facilmente solutos não polares e fases estacionárias polares separam mais facilmente solutos polares.

Nem todas as amostras podem ser directamente injectadas num sistema GC e portanto, para que os analitos se desloquem ao longo da coluna, deverão ser voláteis. Solutos com baixa volatilidade podem ser retidos pela coluna e continuar a eluir durante a análise de amostras subsequentes. Compostos não voláteis condensam na coluna degradando a eficiência desta.

No início de uma análise em CG, a coluna é mantida a temperatura constante e é geralmente ligeiramente inferior ao ponto de ebulição mais baixo de entre os solutos presentes, de modo a aumentar a interacção do soluto com a fase estacionária. À medida que a

separação progride, a temperatura é ligeiramente aumentada a velocidade constante ou em séries de patamares (quando há necessidade de reduzir o tempo de corrida devido à presençade analitos com tempo de retenção muitos elevados)[3].

A.3 Referências

1 Sá, Carlos Pinto Moreira, *"Caracterização morfológica, microestrutural e microanalítica de materiais por: microscopia electrónica de varrimento – SEM e microanálise por raios X – EPMA: EDS/WDS"*; Centro de Materiais da Universidade do Porto, 2002

2 Holler, J. F.; Skoog, D. A.; West, D.; "Fundamentals of Analytical Chemistry"; 7th Edition, Saunders College Publishing, U.S.A., 1997

3 Harvey. D.; "Modern Analytical Chemistry"; 1st Edition, McGraw Hill, U.S.A., 2000

4 Harris, D. C.; "Quantitative Chemical Analysis", 4th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1995.

5 Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Skoog, D. A.; *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Edition, Saunders College Publishing, New York, 1998

6 Kellner, R.; Mermet, J.; Otto, M.; Widmer, H.; Analytical Chemistry, Wiley–VCH, Weinheim, 1998