

Maria Luísa da Silva Santos

Preparação de sorventes selectivos a
Cloranfenicol para Extracção em Fase Sólida
através da técnica de Impressão Molecular

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
NOVEMBRO/2008



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



0000120050

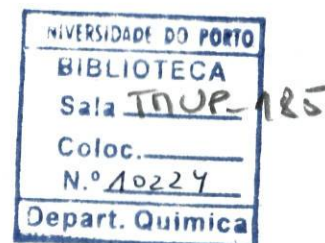
Maria Luísa da Silva Santos

Preparação de sorventes selectivos a Cloranfenicol para Extracção em Fase Sólida através da técnica de Impressão Molecular

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Química



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
NOVEMBRO/2008

*De acordo com
revisão e aprovação pelo júri,
2/ Fevereiro/2009
Ana dos Anjos Ribeiro da Silva*

*“The only difference between an optimist
and a pessimist is a pessimist has more experience.”*

Clare Boothe Luce
(escritora e diplomata Norte-Americana, 1903-1987)

Agradecimentos

Ao Professor Manuel Azenha pela boa disposição, pela grande paciência que sempre demonstrou e por todos os ensinamentos e conselhos.

Á Doutora Maria Isabel Rocha pela simpatia e ajuda prestada.

Ao Mestre Rodrigo Brito e ao Professor Doutor Eduardo Marques pela disponibilidade e ajuda na utilização do Microscópio de Polarização.

Ao Mestre Paulo Magalhães (grupo de Química Analítica – Qualidade Alimentar) por ter disponibilizado o uso do sistema de SPE em vácuo.

Aos colegas de ambos o laboratório pela boa companhia, disposição e auxílio oportuno.

Para a Inês, Manuela, Mariana e Miriam um grande beijo. Obrigada, meninas.

Aos meus pais, meus avós, meu irmão, Daniela e Olívia pela força transmitida.

E em especial ao Ricardo pelo apoio, carinho, compreensão e ajuda que sempre demonstrou.

Resumo

O Cloranfenicol (CAP) é um antibiótico bacteriostático com grande uso em áreas veterinárias, tendo sido considerado altamente tóxico para o ser humano, o que levou à sua proibição na União Europeia em 1994, para uso em animais de consumo humano. Devido ao seu amplo espectro de actividade e o seu baixo custo, o uso de CAP é ainda atractivo em certos países. Os Polímeros de Impressão Molecular (MIP), baseados na teoria do reconhecimento molecular induzido, adaptados como sorventes de Extracção em Fase Sólida (SPE), surgem como vantajosos quando uma extracção selectiva tem que ser realizada e os sorventes comuns/comercias não possuem tanta selectividade. A técnica de Sol-Gel (SG) é extremamente versátil e tem uma vasta área de aplicação em Química Analítica. Os seus materiais finais, além de serem transparentes, inertes, rígidos e porosos, são ideais em dispositivos sensoriais, entre outras aplicações especializadas. A sua síntese é simples e a disponibilidade de uma vasta gama de monómeros funcionais torna o seu uso, em Impressão Molecular, mais atraente.

O objectivo deste trabalho consistia em desenvolver um sorvente de SPE altamente selectivo a CAP, produzido de acordo com a teoria de Impressão Molecular não-covalente e utilizando a técnica de SG. Pretendia-se, portanto, produzir um MISPE (*Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*) selectivo a CAP.

Neste trabalho, o monómero funcional utilizado foi o ureidopropiltrimetoxisilano (UPTMOS), sendo o tetrametoxisilano (TMOS) o elemento principal de entrelaçamento na formação da rede tridimensional. Com o desenvolvimento do trabalho experimental resultaram 7 misturas reaccionais, produzindo 15 xerogéis como sorventes de SPE. Os xerogéis produzidos foram obtidos através da extracção da molécula molde por Soxhlet, outros por calcinação, havendo ainda outros xerogéis que sofreram o tratamento de silanização. Além das diferenças referidas, os xerogéis produzidos diferem entre si pela constituição da solução reaccional, nomeadamente a proporção molar água:alcóxidos de silício, co-solvente, catalisador e adição de polietilenoglicol (PEG). Posteriormente, a eficiência dos xerogéis foi avaliada, utilizando o procedimento comum usado em SPE e a quantificação de CAP retido nos MIX/NIX (*Molecularly Imprinted Xerogel/Non Imprinted Xerogel*) produzidos foi obtida por HPLC (*High Efficiency Liquid Chromatography*) com detecção espectrofotométrica.

Ao longo do trabalho experimental surgiram dois problemas. O primeiro foi a formação de cristais de Tianfenicol nas superfícies dos primeiros xerogéis fabricados, o que levou a que pouca ou nenhuma impressão tenha existido nestes xerogéis. Ultrapassado este problema, surgiram as interacções não específicas que dominaram a capacidade de retenção dos xerogéis produzidos posteriormente.

Assim, a capacidade de retenção dos cartuchos de SPE com os MIXs e os seus respectivos NIXs produzidos encontravam-se estatisticamente iguais ou muito próximos. Apenas surgiram alguns

casos em que se notou alguma capacidade de impressão, nomeadamente: MIX 4 (solução de SG em que não foi adicionada água) com a solução carga de 100% H₂O, MIX 6 (solução de SG com uma proporção molar água:Si de 1:1) com a solução carga de 50% H₂O:50% MeOH, MIX 5 (solução de SG em que o catalisado foi o NaOH) com a solução carga de 10% H₂O:90% MeOH, que apresentaram uma diferença superior a 13% em relação ao seu NIX, na condição em que a molécula molde foi extraída por Soxhlet; com o tratamento de silanização, MIX 7 (solução de SG igual a SG 6 mas com PEG) que apresentou cerca de 22% de diferença do seu NIX, com a solução carga 100% H₂O; na calcinação, MIX 6 apresentou uma diferença de cerca de 11%, com a solução carga 100% H₂O, em relação ao seu NIX.

No final e apesar do objectivo primordial não ter sido alcançado, a produção de um MISPE de CAP, conseguiu-se abrir novas perspectivas para o desenvolvimento deste trabalho.

Abstract

The CAP is a bacteriostatic antibiotic used in veterinarian areas, which was considered highly toxic to humans, leading to its ban in the European Union in 1994, in the use of animals for human consumption. On account of their broad spectrum of activity and its low cost, the use of CAP is still attractive in some countries. The Molecularly Imprinted Polymers (MIP), based on the theory of molecular recognition induced, adapted as Solid Phase Extraction (SPE) sorbents, emerge as advantageous when a selective extraction has to be done and the common sorbents / commercials do not have much selectivity. The technique of Sol-Gel (SG) is extremely versatile and has a wide area of application in analytical chemistry. Their final materials, in addition to being transparent, inert, rigid and porous, are ideal in sensory devices, and other specialized applications. Its synthesis is simple and the availability of a wide range of functional monomers makes its use in Molecular Imprinting much more attractive.

The purpose of this study is to develop xerogels by Molecular Imprinting non covalent highly selective to Chloramphenicol (CAP), using the technique of Sol-Gel (SG), which xerogels are used as sorbents for the technique of Solid Phase Extraction (SPE). This is producing a MISPE (Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction) selective to CAP.

In this work, the functional monomer used is the ureidopropyltrimethoxysilane (UPTMOS), and the tetramethylorthosilicate (TMOS) the main element in the formation of three-dimensional network. With the development of experimental work resulted 7 SG solutions, producing 15 xerogels as sorbents of SPE. The xerogels produced were obtained from the extraction of the template by Soxhlet extraction, others by calcination, and there were others xerogels who suffered the treatment of silanization. Apart from all these differences, the xerogels produced differ in the compounds of the SG solution, including the molar proportion water:alkoxides of silicon, co-solvent, catalyst and the addition of polyethylene glycol (PEG). The efficiency of these was assessed using the procedure commonly used in SPE and quantification of CAP withholding in the MIX/NIX (Molecularly Imprinted Xerogel/Non Imprinted Xerogel) was produced by HPLC (High Efficiency Liquid Chromatography) with UV detection.

In the developing of this work the sequence of experiences we faced two problems. The first was the formation of crystals of thiamphenicol on the surfaces of the first xerogel built, with the result that little or no impression has existed in these xerogels. Going beyond, came the non-specific interactions that dominated the capacity of retaining of CAP in the xerogels produced.

Thus, the ability of retaining of CAP in the cartridges of SPE with MIXs and their respective NIXs produced were statistically identical or very close. There were only a few cases in which it was noted some ability of imprinting, including: the MIX 4 (solution of SG in which there was added no water) with the load solution of 100% H₂O, MIX 6 (solution of SG with a molar ratio water:Si of 1:1)

with the load solution of 50% H₂O:50% MeOH, MIX 5 (solution of SG in which the catalyst was the NaOH) with the load solution of 10% H₂O: 90% MeOH, which showed a difference more than 13% against its NIX under the condition where the template was extracted by Soxhlet extraction; with the treatment of silanization, the MIX 7 (equal to the solution of SG 6 but with PEG 6000) showed about 22% difference of its NIX, with the load solution of 100% H₂O; in the calcination, the MIX 6 showed a difference of about 11%, with the load solution of 100% H₂O, in relation to its NIX.

At the end and despite the primordial goal was not achieved, the producing of a MISPE of CAP, we were able to open some new perspectives for the development of this work.

Résumé

Le CAP est un antibiotique bactériostatique utilisé en médecine vétérinaire, qui a été considéré comme hautement toxique pour les humains, conduisant à son interdiction à l'Union Européenne en 1994, chez les animaux destinés à la consommation humaine. Néanmoins, étant donné son application dans un large domaine et son faible coût, le CAP est encore utilisé dans nombreux pays. Les polymères moléculairement imprimés (MIP), basés sur la théorie de la reconnaissance moléculaire induite, adaptés comme adsorbants en SPE, sont avantageux lorsque les adsorbants communs (commerciaux) ne sont pas assez sélectifs. La technique de SG est extrêmement polyvalente et peut être utilisée dans de nombreuses applications en chimie analytique. Ses produits finaux, en plus d'être transparents, inertes, rigides et poreux sont idéaux dans des dispositifs sensoriels et dans d'autres applications spécialisées. Sa synthèse est simple et la disponibilité d'une large gamme de monomères fonctionnels fait que son utilisation en MIP est très intéressante.

Le but de ce travail est de développer des xérogels par la technique d'emprunte moléculaire à hautement sélective au Chloramphénicol (CAP) et ce, par l'utilisation de la polymérisation du Sol-Gel (SG) dans laquelle les xérogels sont utilisés comme adsorbant pour la technique d'Extraction en Phase Solide (SPE).

Le monomère fonctionnel utilisé dans ce travail est leureidopropyltriméthoxysilane (UPTMOS), et le tétraméthylorthosilicate (TMOS) qui est l'élément principal dans la formation du réseau tridimensionnel. Le travail expérimental a donné 7 solutions SG, et la production de 15 xérogels comme adsorbant en SPE. L'efficacité de ceux-ci a été évaluée par la procédure généralement utilisée en SPE et la quantification du CAP contenu dans le MIX/NIX (xérogel imprimé moléculairement / xérogel non imprimé moléculairement) a été réalisée par HPLC (Chromatographie liquide à haute performance). Les xérogels produits ont été obtenus par l'extraction de la cible par extraction Soxhlet, d'autres par calcination, et d'autres ont subi un traitement de silanisation. Hormis ces différences, les xérogels produits diffèrent dans les composés utilisés dans la solution SG, impliquant la proportion molaire eau/alcoolates de silicone, co-solvant, catalyseur et l'addition de polyéthylène glycol (PEG).

Dans le développement de ce travail, nous avons été confrontés à deux problèmes. Le premier était la formation de cristaux de thiamphénicol sur les surfaces des premiers xérogels réalisés aboutissant à ce que peu ou aucune impression n'ait existé dans ces xérogels. De plus nous avons été confrontés aux interactions non-spécifiques qui ont dominés la capacité de rétention du CAP dans les xérogels produits.

Alors, la capacité de rétention du CAP dans les cartouches de SPE avec MIXs et leur respectifs NIXs produits sont identiques ou très proches. Dans quelques cas, de bonnes capacités de rétention ont été remarquées et ce, dans les xérogels suivants: le MIX 4 (solution de sol-gel sans eau

ajoutée) avec une solution de charge de 100% H₂O, MIX 6 (solution de SG avec une proportion molaire en eau/Si de 1:1) avec une solution de charge de 50% H₂O:50% MeOH, MIX 5 (solution de SG avec NaOH comme catalyseur) avec une solution de charge de 10% H₂O: 90% MeOH, celui-ci a montré une différence de plus de 13% par rapport à son NIX formé dans les mêmes conditions ou la cible a été extraite par extraction Soxhlet; avec le traitement de silanisation, le MIX 7 (est égal à la solution SG 6 mais avec PEG 6000) a montré différence de 22% par rapport à son NIX, avec une solution de charge de 100% H₂O; dans la calcination, le MIX 6 a montré une différence de plus ou moins 11%, avec une solution de charge de 100% H₂O, par rapport à son NIX respectif.

A la fin de cette étude et malgré que le but premier n'ait pas été atteint, nous sommes capables d'ouvrir de nouvelles perspectives pour le développement de ce travail.

Índice

Agradecimentos.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	6
Résumé.....	8
Índice.....	10
Índice de figuras.....	12
Índice de tabelas.....	14
Lista de abreviaturas.....	15
Capítulo 1 – Introdução Teórica.....	16
1.1 Como surgiu a Impressão Molecular.....	17
1.2 A Impressão Molecular.....	19
1.2.1 Tipos de Impressão Molecular.....	20
1.2.1.1 Vantagens e Desvantagens dos principais tipos de Impressão Molecular: Impressão covalente vs Impressão não-covalente.....	21
1.2.2 Tipos de materiais para a produção de MIPs.....	22
1.2.3 A técnica de Sol-Gel.....	24
1.2.3.1 Etapas da técnica de Sol-Gel.....	25
1.2.4 Elementos fundamentais para a produção de MIPs.....	31
1.3 Testes de Eficiência da Impressão Molecular.....	33
1.3.1 Extração em Fase Sólida (SPE).....	33
1.3.2 Polímeros de Impressão Molecular como sorventes de SPE.....	35
1.4 O Cloranfenicol.....	36
1.4.1 O uso ilícito do Cloranfenicol.....	39
1.4.2 Determinação Analítica do Cloranfenicol.....	40
1.5 O estado da arte em relação à determinação do Cloranfenicol.....	42
Capítulo 2 – Parte Experimental.....	45
2.1 Reagentes.....	46
2.2 Produção dos Xerogéis estudados.....	47
2.2.1 Descrição das misturas reacionais preparadas.....	47
2.2.2 Obtenção dos Xerogéis finais.....	49
2.2.3 Preparação dos cartuchos de SPE com os Xerogéis produzidos.....	52
2.2.4 Preparação de filmes das soluções de MIP/NIP em superfícies de titânio.....	53
2.3 Avaliação dos MIX/NIX produzidos como sorventes de SPE.....	54
2.3.1 Procedimento de SPE realizado nos cartuchos produzidos.....	54
2.3.2 Detecção e quantificação do CAP por HPLC-UV.....	55
2.4 Medição dos ângulos de contacto das superfícies de titânio preparadas.....	57
2.5 Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com Refletância Total Atenuada (ATR) dos Xerogéis produzidos.....	58
2.6 Análise por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) dos Xerogéis produzidos...	58
Capítulo 3 – Apresentação de Resultados e Discussão.....	59
3.1 Obtenção da mistura reaccional inicial de SG.....	60
3.2 Apresentação dos resultados da avaliação de eficiência dos conjuntos MIX/NIX produzidos como sorventes de SPE.....	63
3.2.1 Resultados preliminares (conjuntos MIX/NIX 1 a 3).....	63

3.2.2 Resultados da segunda fase do trabalho experimental (conjuntos MIX/NIX 4 a 7).	69
3.2.2.1 Resultados dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 com extracção da molécula molde por Soxhlet.....	71
3.2.2.2 Resultados dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 produzidos com o tratamento de silanização.....	74
3.2.2.3 Resultados dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 produzidos com o tratamento de calcinação.....	80
3.2.2.4 Resultados do conjunto MIX/NIX 7 obtidos um mês após a sua preparação...	84
Capítulo 4 – Conclusões.....	86
Apêndices.....	90
Apêndice 1 - Artigos científicos publicados sobre MISPE de SG.....	90
Apêndice 2 – O <i>Spin-Coating</i>	92
Apêndice 3 - Experiências de misturas reaccionais de SG realizadas e excluídas na segunda fase do trabalho experimental.....	94
Apêndice 4 - Os ângulos de contacto.....	96
Apêndice 5 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	98
Lista de referências.....	101

Índice de figuras

Figura 1.1 – Interação antígeno-anticorpo.....	18
Figura 1.2 – Mecanismo do processo de Impressão Molecular.....	19
Figura 1.3 – Representação esquemática das duas estratégias mais comuns na preparação de MIPs: (A) Impressão não-covalente; (B) Impressão covalente.....	21
Figura 1.4 – (A) Exemplos de MF orgânicos que podem ser usados sós ou em combinação na Impressão não-covalente; (B) Exemplo de agentes de ligação utilizados neste tipo de Impressão Molecular; (C) Exemplos de MF orgânicos que podem ser usados na Impressão covalente.....	23
Figura 1.5 – Esquema com uma vista geral de todos os passos e processos da técnica de Sol-Gel.....	25
Figura 1.6 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise em catálise ácida.....	26
Figura 1.7 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise em catálise básica.....	26
Figura 1.8 – Representação esquemática do mecanismo de condensação em catálise ácida..	27
Figura 1.9 – Representação esquemática do mecanismo de condensação em catálise básica	27
Figura 1.10 – Esquema da gelificação sob catálise básica: A – afastado do ponto de gelificação (aglomerados ramificados); B – próximo do ponto de gelificação (crescimento e ramificação adicional); C – ponto de gelificação (aglomerados ligados).....	29
Figura 1.11 – Esquema da gelificação sob catálise ácida: 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)	29
Figura 1.12 – Esquema do condicionamento da coluna.....	34
Figura 1.13 – Esquema da etapa de retenção.....	34
Figura 1.14 – Esquema da lavagem da coluna.....	34
Figura 1.15 – Esquema da etapa de eluição.....	35
Figura 1.16 – Esquema da selectividade relativa de diferentes meios em comparação com os SupelMIPs apresentado pela Supelco.....	36
Figura 1.17 – Estrutura molecular do Cloranfenicol.....	37
Figura 1.18 – Estrutura do Cloranfenicol e os seus derivados.....	39
Figura 1.19 – Esquema apresentado por Shen <i>et al.</i> do conjunto de procedimentos a realizar na preparação de amostras para determinar resíduos de CAP.....	42
Figura 2.1 – Esquema ilustrativo do processo de preparação dos sorventes testados.....	47
Figura 2.2 – Exemplo de um MIP/NIP gelificado.....	49
Figura 2.3 – Montagem do extractor de Soxhlet utilizado.....	50
Figura 2.4 – Representação gráfica exemplificativa da área cromatográfica correspondente ao TAP extraído até á altura que se considerou o MIX “limpo”	51
Figura 2.5 – Exemplo de um cartucho de SPE empacotado com uma determinada massa de xerogel (no caso xerogel calcinado).....	52
Figura 2.6 – Cabeça do eléctrodo com a superfície de titânio e a pasta aderente para a realização do <i>Spin-Coating</i>	53
Figura 2.7 – HPLC-UV utilizado.....	56
Figura 2.8 – Aparelho utilizado na medição dos ângulos de contacto.....	57
Figura 2.9 – Suporte da amostra para o SEM após tratamento da amostra.....	58
Figura 3.1 – Esquema da possibilidade de ligação de uma molécula de CAP com duas moléculas de UPTMOS.....	61

Figura 3.2 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 1 (n=3).....	63
Figura 3.3 – Cromatogramas exemplificativos obtidos para a solução carga e para o eluato de um cartucho de SPE de um MIX produzido neste trabalho (Eixo X = tempo de retenção/minutos).....	64
Figura 3.4 – Imagens obtidas por SEM. A – superfície do xerogel MIP 1; B – superfície do xerogel NIP 1.....	65
Figura 3.5 – Espectros EDXS obtidos das imagens SEM anteriores. A1 – espectro EDXS da zona marcada como Z1 na figura 3.3A; A2 – espectro EDXS da zona marcada como Z2 na figura 3.3A; B1 – espectro EDXS da zona marcada como Z1 na figura 3.3B.....	65
Figura 3.6 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 2 e 3 (n=3).....	67
Figura 3.7 – Imagens obtidas por SEM das superfícies dos xerogéis NIP 4 e NIP 5.....	70
Figura 3.8 – Imagens obtidas por SEM das superfícies dos xerogéis MIP 6 e MIP 7.....	70
Figura 3.9 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 4 a 7, com as diferentes soluções carga (n=3).....	73
Figura 3.10 – Representação dos espectros de FTIR-ATR dos MIXs 4 a 6 retirados 2 meses após a preparação (cor lilás claro) e 2 meses após a silanização (cor preto).....	76
Figura 3.11 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 4 a 6 silanizados, com as diferentes soluções carga (n=3).....	78
Figura 3.12 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 7 silanizados, com as diferentes soluções carga (n=3).....	80
Figura 3.13 – Representação dos espectros de FTIR-ATR dos MIXs 4 a 6 retirados 2 meses após a preparação (cor lilás claro) e 2 meses após a calcinação (cor preto).....	82
Figura 3.14 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 4 a 7 calcinados, com as diferentes soluções carga (n=3).....	83
Figura 3.15 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE dos MIX/NIX 7, nos diferentes métodos de preparação, com a solução carga 100% H ₂ O, (n=3), após preparação vs um mês da sua utilização.....	85
Figura A2.1 – Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por <i>Spin-Coating</i> , em que 1 é a deposição, 2 a rotação, e 3 é a rotação e evaporação.....	92
Figura A2.2 – Fases do processo de <i>Spin-Coating</i>	93
Figura A4.1 – Ilustração de um ângulo de contacto de uma amostra líquida.....	96
Figura A4.2 – Deposição de uma gota de um líquido num substrato sólido em diversas circunstâncias.....	97

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Resumo das vantagens e desvantagens dos principais tipos de Impressão Molecular.....	22
Tabela 1.2 – Algumas propriedades Físico-Químicas do Cloranfenicol.....	38
Tabela 1.3 – Comunicados de imprensa realizados pela Deco entre 2003 e 2007 sobre a presença de Cloranfenicol em alimentos.....	40
Tabela 1.4 – Artigos realizados pela Deco entre 2003 e 2007 sobre a presença de Cloranfenicol em alimentos.....	40
Tabela 2.1 – Descrição dos reagentes utilizados.....	46
Tabela 2.2 – Apresentação das quantidades molares dos principais reagentes das misturas reaccionais.....	48
Tabela 2.3 – Características do HPLC-UV utilizado.....	57
Tabela 3.1 – Resultados obtidos nas medições dos ângulos de contacto com filmes de SG MIP/NIP 4 a 7 em diferentes etapas de produção.....	71
Tabela 3.2 – Resultados obtidos nas medições dos ângulos de contacto com filmes de SG MIP/NIP 4 a 7 após a silanização.....	75
Tabela 3.3 – Resultados obtidos nas medições dos ângulos de contacto com filmes de SG MIP/NIP 4 a 7 após a calcinação.....	80
Tabela A1.1 – Apresentação de dados de artigos científicos publicados sobre MISPE baseados na técnica de SG.....	90
Tabela A3.1 - Experiências realizadas e excluídas na 2ª fase do trabalho experimental.....	94

Lista de abreviaturas

ATR – *Attenuated Total Reflectance* (Reflectância Total Atenuada)

CAP – Cloranfenicol

EDXS – *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy* (Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios X)

FTIR – *Fourier Transform Infrared* (Infravermelho por Transformada de Fourier)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência)

MeOH – Metanol

MF – Monómeros Funcionais

MIP – *Molecularly Imprinted Polymers* (Polímeros de Impressão Molecular)

MISPE – *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*

MIX – *Molecularly Imprinted Xerogel* (Xerogel de Impressão Molecular)

MOTMS – Metoxitrimetilsilano

n – número de ensaios

NIP – *Non Imprinted Polymers* (Polímero Não Impresso)

NIX – *Non Imprinted Xerogel* (Xerogel Não Impresso)

PEG – Polietilenoglicol

rpm – rotações por minuto

SPE – *Solid-Phase Extraction* (Extracção em Fase Sólida)

SG – Sol-Gel

SEM – *Scanning Electron Microscope* (Microscopia Electrónica de Varrimento)

TAP – Tianfenicol

TFA – Ácido trifluoroacético

TMOS – Tetrametoxisilano

UPTMOS – Ureidopropiltrimetoxisilano

Capítulo 1

Introdução Teórica

Capítulo 1 – Introdução Teórica

1.1 Como surgiu a Impressão Molecular

O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais selectivos e sensíveis é de grande relevância em diferentes áreas do conhecimento, contemplando, por ex., os sectores alimentar, biotecnológico, ambiental, farmacêutico, entre outros. As ciências analíticas desempenham um papel fundamental no estabelecimento de protocolos analíticos que compreendem desde a preparação da amostra até à identificação e quantificação das espécies de interesse. Normalmente a etapa de preparação da amostra considera etapas de extracção e/ou pré-concentração. Contudo, devido à complexidade de algumas matrizes e aos baixos níveis dos analitos, em alguns casos a preparação da amostra pode não eliminar a presença das espécies interferentes, levando a um desempenho menos eficiente da técnica de separação. Notam-se situações desta natureza quando se pretende analisar amostras cujos analitos possuem estruturas moleculares muito similares. Estas considerações apontam que a aplicação de materiais selectivos, tanto na etapa de preparação de amostra como na de separação, é sobretudo relevante em matrizes complexas e quando as espécies de interesse estão presentes em baixas concentrações.¹

Muitas estratégias analíticas que permitem obter materiais selectivos baseiam-se no reconhecimento biomolecular de muitos processos biológicos, como o de replicação de ADN (ácido desoxirribonucleico), interacção antígeno-anticorpo, enzima-substrato e muitos outros sistemas. Nestes sistemas, as biomacromoléculas possuem locais receptores capazes de se ligar selectivamente a uma molécula, na presença de outras com estruturas moleculares análogas. Entre os sistemas citados, o princípio de interacção antígeno-anticorpo tem sido o mais aplicado em associação com técnicas de Extracção em Fase Sólida (SPE) e de separação para diferentes espécies químicas, tais como herbicidas e hidrocarbonetos poliaromáticos.¹

Baseado no princípio da produção de anticorpos pelo sistema imunológico de vertebrados em resposta à presença de moléculas estranhas no organismo (antígeno), estes métodos selectivos, conhecidos como ensaios de imunoafinidade, promovem a extracção baseada no reconhecimento molecular. Na prática, os anticorpos ligam-se covalentemente a um sorvente apropriado, o imunossorvente, que é posteriormente disposto em cartuchos de SPE ou em colunas cromatográficas. Face às características de bioafinidade apresentada pelo anticorpo frente ao antígeno (espécie de interesse), o imunossorvente permite isolar a espécie de interesse sem efectuar qualquer interacção com moléculas co-existentes eliminando, desta forma, a ocorrência de co-eluição geralmente verificada durante as etapas de eluição quando se emprega sorventes pouco selectivos. A elevada selectividade obtida na separação constitui uma alternativa às etapas de purificação e/ou pré-concentração de amostras complexas. Apesar das características marcantes dos imunossorventes como

materiais selectivos, devem-se ressaltar algumas desvantagens dos anticorpos incluindo o elevado custo, necessidade de purificação, dificuldade de obtenção e instabilidade quando utilizado em condições diferentes das do seu ambiente natural. Além disso, após a obtenção dos anticorpos, estes devem ser imobilizados num suporte sólido a fim de os orientar adequadamente e preservar as suas características selectivas. Devido a estas limitações, várias estratégias têm sido propostas no sentido de substituir os materiais biológicos por materiais sintéticos que possuam o mesmo grau de reconhecimento molecular ou, por outras palavras, o mesmo grau de selectividade. Neste caso, a selectividade é obtida se o receptor sintético possuir uma cavidade com tamanho e formato adequados, bem como locais capazes de estabelecer uma interacção favorável com a espécie de interesse. Moléculas como a ciclodextrina e o éter coroa têm sido frequentemente empregues como receptores moleculares sintéticos.¹

Outra abordagem sintética que permite formar locais receptores que simulam a interacção antígeno-anticorpo (figura 1.1) baseia-se na preparação de Polímeros de Impressão Molecular. O conceito de Impressão Molecular surgiu a partir da teoria de Pauling sobre a formação de anticorpos, onde um antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respectiva cadeia de anticorpos. A partir desta concepção, surgiu a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde que pudesse actuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efectuar selectivamente o reconhecimento molecular. Estes polímeros são actualmente conhecidos como MIP (*Molecularly Imprinted Polymers*).¹



Figura 1.1 – Interacção antígeno-anticorpo

Além do carácter selectivo, os MIPs demonstram vantagens em relação aos imunossorventes no que toca à estabilidade química, capacidade de adsorção e reprodutibilidade na preparação do polímero. O primeiro trabalho com MIPs em Química Analítica foi em 1972, onde Wulff e Sarhan² descreveram a síntese do polímero com locais selectivos para separação enantiomérica de racematos de açúcares. Desde então, os referidos materiais têm sido largamente utilizados na preparação de amostras em técnicas como Extracção em Fase Sólida e Microextracção em Fase Sólida, em técnicas de separação, tais como Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC), Electroforese Capilar, e Electro cromatografia Capilar. Também, existe um amplo campo de pesquisa de MIPs em associação

com técnicas electroanalíticas focando o desenvolvimento de sensores selectivos, bem como em Espectrofluorimetria.

Segundo Piletsky e colaboradores³, existiam em 2001, 18 grupos de pesquisa concentrados na Europa, 15 nos Estados Unidos e Canadá e 26 no continente Asiático. Neste mesmo trabalho, um dado interessante revela que as ciências na área de separação contemplam 36% das aplicações dos MIP, 34% corresponde à ciência de materiais, 19% é atribuído ao desenvolvimento de sensores, 6% concentram os trabalhos na área de catálise e 5% ao uso dos MIP com funções especiais, nomeadamente materiais para a libertação controlada de drogas.

1.2 A Impressão Molecular

O desenvolvimento e a aplicação de Polímeros de Impressão Molecular (MIPs) tem amadurecido nas duas últimas décadas, e hoje em dia é considerada uma técnica versátil e virada directamente para a geração de receptores sintéticos de pequenos constituintes orgânicos, sendo cada vez mais adoptada para macromoléculas biológicas.⁴

São necessários para a formação do Polímero de Impressão Molecular: os monómeros funcionais (MF), a molécula molde a ser impressa, o solvente e o agente de entrelaçamento.⁵

O processo de impressão molecular é constituído por três passos (Figura 1.2):

1. Formação de um complexo covalente ou não-covalente entre o MF e a molécula molde;
2. Polimerização do complexo MF-molécula molde;
3. Remoção da molécula molde do polímero.⁵

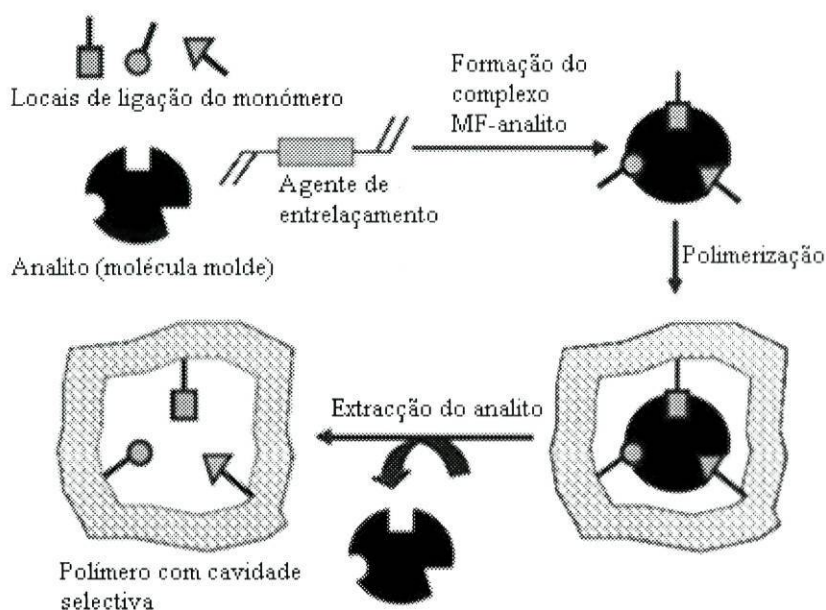


Figura 1.2 – Mecanismo do processo de Impressão Molecular⁶

No passo 1, o MF e a molécula molde (ou análoga) estão ligados covalentemente (Impressão covalente) ou interactuam por intermédio de interacções não-covalentes (Impressão não-covalente). No passo 2, as estruturas dos complexos MF-molécula molde ficam retidos na rede polimérica tridimensional formada pelo agente de entrelaçamento. No passo 3, as moléculas molde são removidas do polímero, deixando cavidades que possuem os grupos funcionais dos monómeros em locais específicos criando um “efeito de memória”/reconhecimento da molécula molde. Estas cavidades são similares em tamanho, estrutura, e outras propriedades físico-químicas à molécula molde, e permitem que esta (ou outra análoga) se ligue com eficiência e selectividade.⁵

1.2.1 Tipos de Impressão Molecular

Para a Impressão Molecular foram estabelecidas essencialmente duas estratégias, exemplificadas na figura 1.3, baseadas na molécula molde que se associa aos monómeros funcionais usando ligações covalentes ou interacções não-covalentes. A abordagem semi-covalente é um híbrido das duas estratégias anteriores.⁷

- Impressão covalente

A abordagem covalente foi introduzida por Wulf e Sarhan². A Impressão covalente refere-se às estratégias de Impressão Molecular onde a molécula molde e um ou mais monómeros funcionais se ligam por ligações covalentes para formar um complexo MF-molécula molde por um passo químico independente da formação do polímero. A remoção da molécula molde e o passo subsequente de re-ligação envolvem reacções químicas.⁸ Existem vários artigos de revisão nos quais a abordagem covalente se encontra explanada em detalhe (referências 8 a 13).

- Impressão não-covalente

A abordagem não-covalente foi introduzida por Arshady and Mosbach¹⁴, e baseia-se na formação de interacções não-covalentes relativamente fracas entre os monómeros seleccionados e a molécula molde antes da polimerização. A Impressão não-covalente usa as típicas forças inter-moleculares, tais como ligações de hidrogénio, interacções iónicas, interacções dipolo-dipolo, ligações electrostáticas, interacções δ - δ e forças de van der Waals para formar o complexo da molécula molde e monómeros funcionais em solução. Esta abordagem é bastante usada por causa do processo simples de remoção da molécula molde e de resultar num grande número de locais com elevada selectividade. O uso destes materiais pode ser atribuído à sua simples síntese e à grande gama de monómeros funcionais disponíveis.⁷

o Impressão semi-covalente

A abordagem semi-covalente é um híbrido dos métodos não-covalentes e covalentes. As ligações covalentes são estabelecidas entre a molécula molde e o monómero funcional antes da polimerização. Após a remoção da molécula molde da matriz do polímero, a subsequente re-ligação do analito ao MIP ocorre por interações não-covalentes, seguindo a teoria da Impressão não-covalente.⁷ As referências 9 e 15 a 18 discutem vários exemplos da Impressão Molecular semi-covalente.

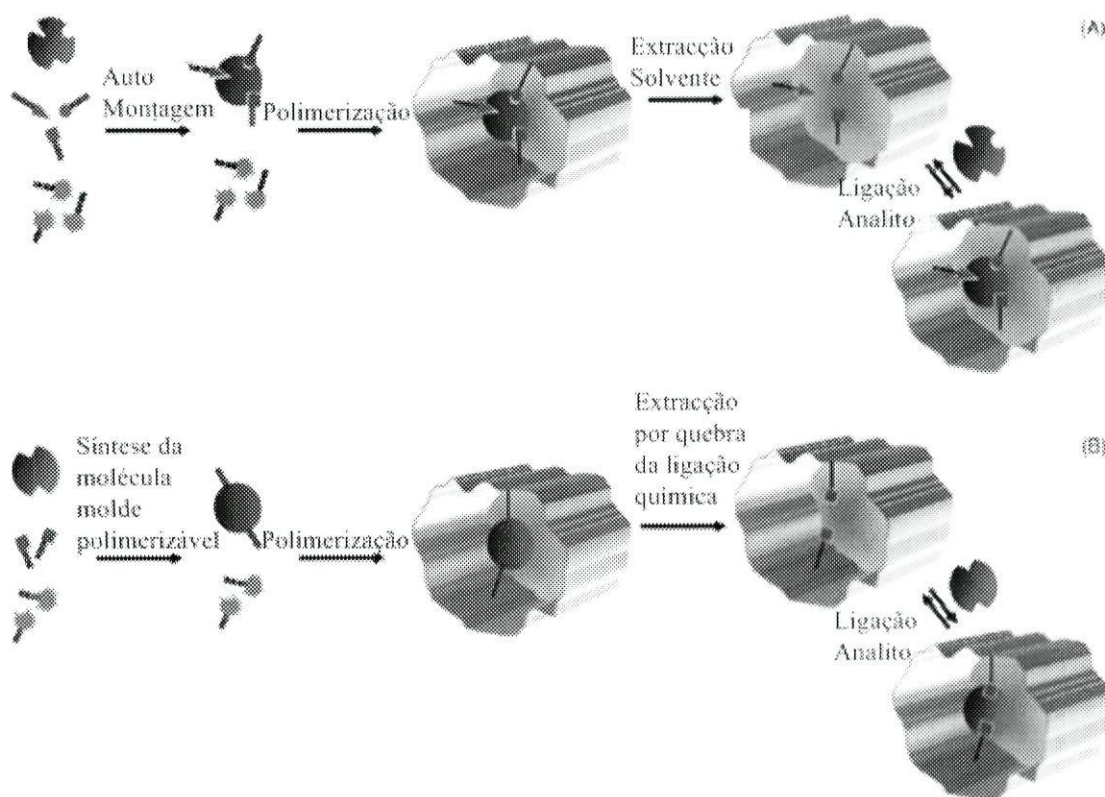


Figura 1.3 – Representação esquemática das duas estratégias mais comuns na preparação de MIPs: (A) Impressão não-covalente; (B) Impressão covalente¹⁹

1.2.1.1 Vantagens e Desvantagens dos principais tipos de Impressão Molecular: Impressão covalente vs Impressão não-covalente⁵⁻²⁰

Na tabela 1.1 resumem-se as vantagens e desvantagens da Impressão covalente e não-covalente. Não se deve esquecer que a escolha do método de impressão deve ter em conta as características finais do polímero produzido, o tipo de molécula alvo e molde usadas, custos e tempo de preparação.

Tabela 1.1 – Resumo das vantagens e desvantagens dos principais tipos de Impressão Molecular

	Impressão covalente	Impressão não-covalente
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ▪ É necessária a síntese de um complexo MF-molécula alvo, o qual é estável e estequiométrico, assim a Impressão Molecular e as cavidades produzidas são bem definidas; ▪ Existe uma gama de condições de polimerização que pode ser aplicada desde que as ligações formadas sejam covalentes e estáveis. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Não é necessária a síntese de um complexo MF-molécula alvo; ▪ A formação das cavidades de ligação e de saída do analito é mais rápida; ▪ A remoção do analito é fácil, devido às ligações não-covalentes, a passagem de um solvente em que o analito seja solúvel é suficiente.
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A formação do complexo MF-molécula alvo é complicada e menos económica; ▪ O número de ligações covalentes disponíveis existentes é limitado; ▪ Uma vez que a formação do complexo e a saída da molécula alvo envolvem a formação e ruptura de ligações covalentes, o processo é lento; ▪ Aquando da ruptura das ligações covalentes na saída da molécula o efeito de impressão é diminuído. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O processo de impressão não é tão definido como na Impressão covalente, pelo que o complexo formado não é tão estável e rígido; ▪ As condições de polimerização devem ser bem escolhidas de modo a maximizar a formação da cavidade não-covalente na mistura; ▪ O(s) MF(s) existe(m) em excesso pelo que dá origem a cavidade de ligação não específicas, diminuindo a selectividade da ligação e a eficiência do MIP.

1.2.2 Tipos de materiais para a produção de MIPs

A escolha da construção do bloco de polimerização funcional é um passo importante na preparação de materiais de Impressão Molecular. Em geral, estes componentes são monómeros reactivos que são capazes de formar uma rede polimérica estável ou géis que mantêm a “memória” da molécula molde ou um análogo.¹⁹

o Materiais Orgânicos

Os polímeros de vinil e acrílico (figura 1.4) possuem uma grande variedade de monómeros funcionais disponíveis. Estes monómeros podem ser carregados positiva ou negativamente, fazer ligações de hidrogénio, hidrofóbicas, coordenação metálica, etc.¹⁹ A síntese destes polímeros é complexa, necessita de solventes porogénicos não-polares e condições de produção em atmosfera

inerte. Os solventes têm que ser orgânicos para que todos os monómeros funcionais sejam solúveis, o que limita o seu uso em aplicações ambientais e biológicas.^{20,21}

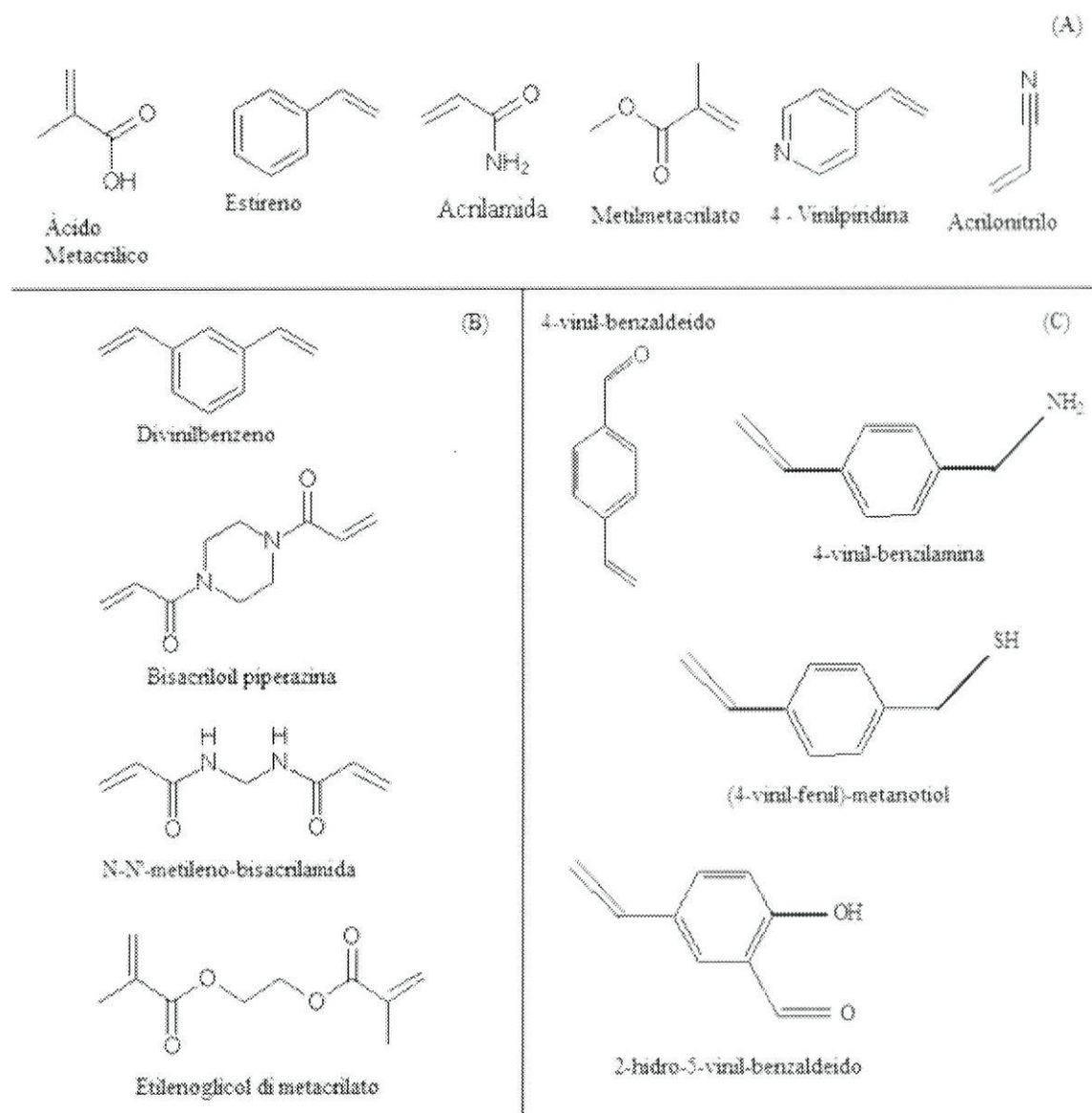


Figura 1.4 – (A) Exemplos de MF orgânicos que podem ser usados sós ou em combinação na Impressão não-covalente; (B) Exemplo de agentes de ligação utilizados na Impressão Molecular com MF orgânicos; (C) Exemplos de MF orgânicos que podem ser usados na Impressão Covalente¹⁹

o Materiais Inorgânicos

A técnica de Sol-Gel (SG) permite encapsular espécies activas no material. Xerogéis derivados de SG são materiais atractivos porque as suas propriedades físico-químicas podem ser manobradas pela escolha do(s) precursor(es) e pelo processo a seguir. As cavidades dos xerogéis podem ser preparadas com: (i) uma gama de área superficial larga, diferentes dimensões de poros e distribuição de tamanhos de poros, (ii) uma boa estabilidade térmica, (iii) foto-estabilidade excepcional, (iv) condutividades eléctricas ajustáveis, e (v) uma janela óptica razoável que permite o uso de ferramentas modernas de espectroscopia para estudar substâncias no xerogel.¹⁹

Seguidamente encontra-se descrita a técnica de SG para melhor entendimento das observações anteriores.

1.2.3 A técnica de Sol-Gel

O processo de Sol-Gel pode ser dividido em duas classes, dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado: a dos sais (cloretos, nitratos, sulfatos, etc.) e a dos alcóxidos metálicos. A rota que envolve o uso de precursores do tipo alcóxido aparece como a mais versátil actualmente.⁶

A técnica de SG pode ser definida como um método de preparação de materiais cerâmicos e vidros através de reacções de hidrólise e condensação de alcóxidos metálicos (átomo de metal com ligandos orgânicos). Nos dias de hoje, os alcóxidos mais utilizados na síntese de novos materiais são os de silício, alumínio, zircónio e titânio, embora seja possível a síntese de alcóxidos dos mais diversos metais.

Um sol (suspensão coloidal de partículas sólidas num líquido) é formado por uma mistura de um líquido precursor de alcóxido metálico, água, co-solvente e um catalisador ácido ou básico à temperatura ambiente. Os alcóxidos metálicos são precursores populares porque reagem rapidamente com a água (hidrólise). Se o monómero fizer mais que duas ligações não há limite no tamanho da molécula que se pode formar. Se uma molécula atingir dimensões macroscópicas de modo a que se difunda por toda a solução, a substância chama-se gel. O ponto gel é o tempo ou estado da reacção no qual a última ligação é formada completando a molécula gigante.^{22,23}

A nível dos grupos funcionais, duas reacções descrevem o processo de SG: a hidrólise e a condensação. As características e propriedades da rede inorgânica de SG estão relacionadas com um número de factores que afectam a velocidade da reacção de hidrólise e de condensação, tais como: o pH, temperatura e tempo de reacção, concentração dos reagentes, natureza e concentração do catalisador, proporção água:grupos alcóxidos, temperatura e tempo de maturação e secagem.

Uma característica importante do processo de SG é a possibilidade de controlo de todas as etapas que ocorrem durante a passagem do precursor molecular até o produto final, possibilitando um melhor controlo do processo global, e a possibilidade de se obter materiais com as características e propriedades planeadas.^{22,23}

A figura 1.5 apresenta um esquema simples dos processos envolvidos na técnica de SG, demonstrando as possibilidades de materiais finais produzidos.

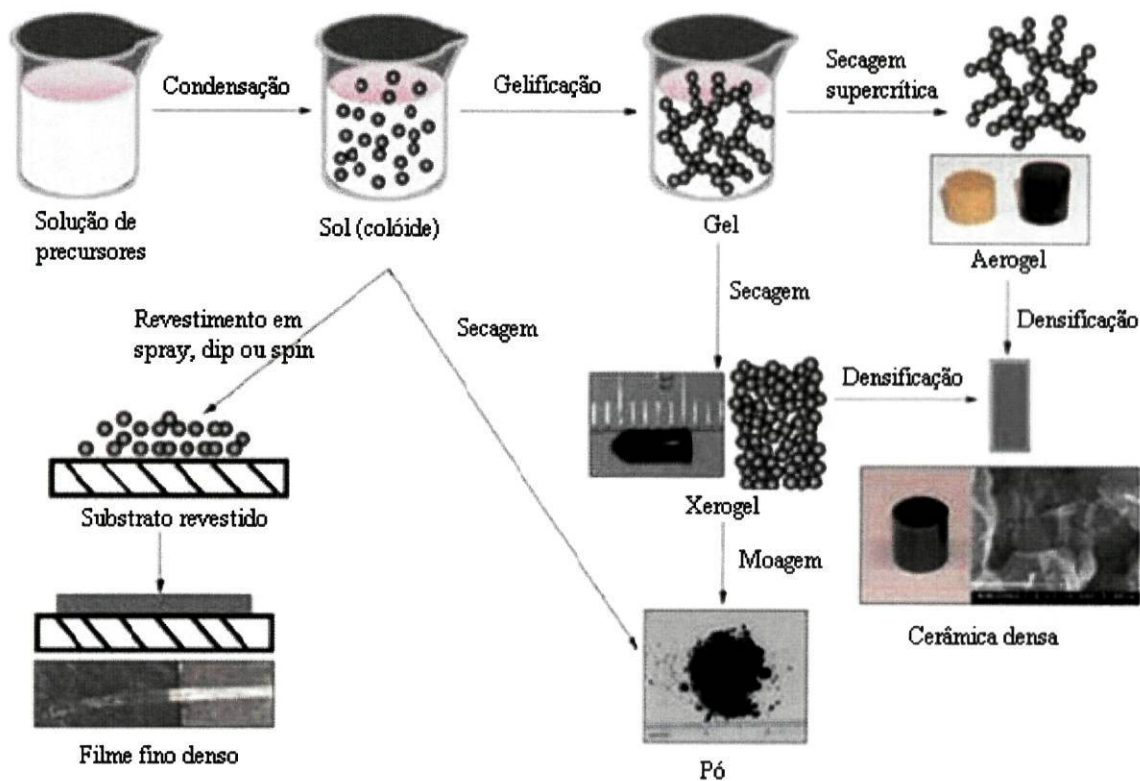


Figura 1.5 – Esquema com uma vista geral de todos os passos e processos da técnica de Sol-Gel²⁴

Em termos de caracterização dos materiais de SG há a mencionar algumas das técnicas mais utilizadas: na caracterização química a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a Espectroscopia no Infravermelho, Raman e Vibracional, e na caracterização física a Porosimetria de Adsorção de Azoto, Porosimetria de Mercúrio, Termoporosimetria, Difracção de Raios-X, Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM), Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM), Microscopia de Polarização, medição do ângulo de contacto de superfícies, entre outras.

De forma a perceber melhor o processo de SG explicam-se de seguida as etapas do processo.

1.2.3.1 Etapas da técnica de Sol-Gel

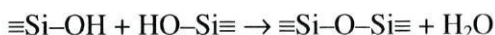
Os alcóxidos metálicos utilizados neste trabalho foram os de silício. Estes possuem uma electrofilicidade relativamente baixa e a capacidade de insaturação de coordenação do metal é igual a zero (número de coordenação 4 – estado de oxidação 4 = 0), pelo que são alcóxidos pouco reactivos – as taxas das reacções de hidrólise-condensação têm de ser aumentadas por catálise. No caso de reacções de alcóxidos metálicos de não-silicatos, as reacções de hidrólise e condensação têm de ser controladas usando aditivos químicos.²⁵

A reacção de polimerização de SG pode ser dividida em duas etapas básicas:

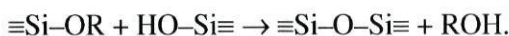
(1) a hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reactivos do tipo silanol:



(2) a condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente à formação do sol e, eventualmente, ao gel:



ou



Do mecanismo de SG apenas a primeira etapa, a hidrólise, é melhor conhecida, pois as reacções de condensação começam antes das reacções de hidrólise terminarem, tornando o mecanismo muito complexo e envolvendo muitas reacções de hidrólise e condensação ao mesmo tempo.⁶

o Hidrólise

A reacção de hidrólise dos alcóxidos de silício pode ocorrer por catálise ácida ou básica.

O mecanismo da reacção de hidrólise com **catálise ácida** é o seguinte:

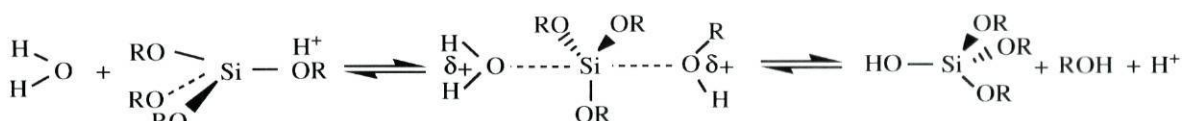


Figura 1.6 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise em catálise ácida

No primeiro passo, que é rápido, ocorre a protonação do monómero funcional. A densidade electrónica do átomo de silício diminui, tornando-o mais susceptível ao ataque do nucleófilo. No segundo passo, ocorre o ataque do nucleófilo (água). Este ataca o átomo de silício na posição oposta ao grupo protonado, sendo a sua densidade electrónica aumentada, facilitando assim a saída da molécula de álcool. Enquanto houver precursor por hidrolisar a reacção repete-se.²²

O mecanismo da reacção de hidrólise com **catálise básica** é seguinte:

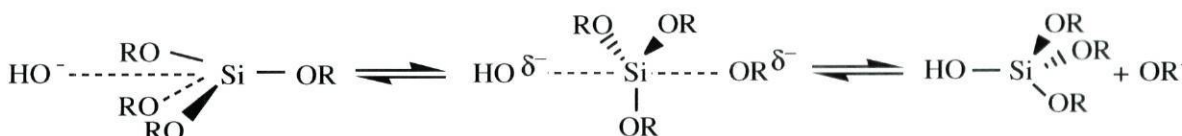


Figura 1.7 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise em catálise básica

Em condições básicas, a água dissocia-se rapidamente, colocando iões hidróxido em solução. Estes atacam o átomo de silício substituindo os grupos do alcóxido. A hidrólise inicial é mais lenta do que as restantes, consequência do facto do oxigénio básico do grupo alcóxido repelir o nucleófilo – OH (grupo hidroxilo), após a primeira hidrólise. As seguintes reacções irão sendo sucessivamente mais rápidas.²²

As diferenças de velocidade de reacção da catálise ácida e básica podem ser explicadas a partir do efeito electrónico. Os grupos alcóxidos são dadores de electrões mais fortes do que os grupos hidroxilo. Sendo assim, na catálise ácida há formação de um estado intermédio positivo, à medida que aumenta o número de grupos alcóxido substituídos por grupos hidroxilo. O estado de transição torna-se menos estável e conseqüentemente a velocidade decresce. Na catálise básica, na presença de um estado intermédio negativo, quantos mais grupos -OH estiverem ligados ao átomo central maior é a estabilidade e portanto a velocidade de reacção é também maior.²²

○ Condensação

Assim como a reacção de hidrólise, a condensação dos alcóxidos de silício pode ocorrer por catálise ácida ou básica.

Em **meio ácido**, o mecanismo da reacção de condensação é apresentado a seguir:

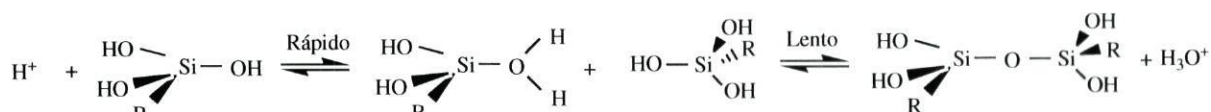


Figura 1.8 – Representação esquemática do mecanismo de condensação em catálise ácida

Na condensação, o primeiro passo é a protonação das espécies silanol, que torna o átomo de silício mais electrofílico, logo mais susceptível ao ataque nucleofílico. A reacção de condensação decorre entre espécies neutras e silanol protonadas, presentes em monómeros ou no final da cadeia de grupos ou oligómeros.²²

Em **meio básico**, o mecanismo da reacção de condensação é o seguinte:

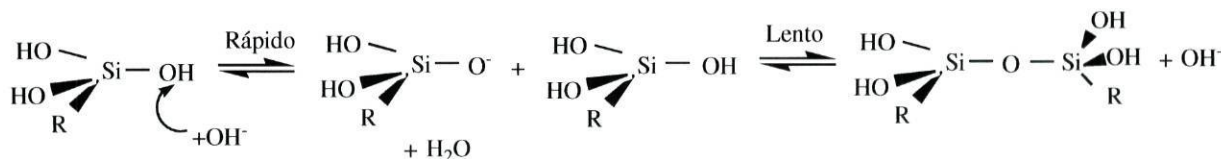


Figura 1.9 – Representação esquemática do mecanismo de condensação em catálise básica

O mecanismo de condensação, em meio básico, é favorecido pelo ataque de uma espécie silanol desprotonada (-Si-O⁻) a um siloxano neutro. O resultado final é a formação de cadeias silicatadas altamente compactas e ramificadas. A maior ou menor ramificação irá depender do grau de substituição dos precursores.²²

Tal como na hidrólise, a velocidade de reacção de condensação também depende dos efeitos estereoquímicos e da carga do estado de transição. Assim sendo, o primeiro passo da condensação ácida é mais rápido que os restantes, pois o estado de transição tem carga positiva e vai tornar-se mais

instável à medida que aumenta o número de grupos hidroxilo. Este fenómeno dá origem a estruturas densas com pequenos poros. A condensação básica é mais rápida, uma vez que o estado de transição (carregado negativamente) é mais estável à medida que aumenta o número de grupos hidroxilo. Desta forma a interligação entre os polímeros é rápida e consequentemente forma-se uma rede mais porosa.²²

→ Efeito dos substituintes do precursor^{22,23}

A hidrólise de precursores alcóxidos de silício é muito sensível a repulsões estereoquímicas. A utilização de ligandos alcóxido de cadeia longa e/ou ramificada conduz a uma drástica diminuição na velocidade da reacção. Substituintes capazes de doar electrões favorecem a reacção com catálise básica e substituintes que podem aceitar electrões favorecem a reacção com catálise ácida.

Precursores de silício com quatro substituintes alcóxido conduzem à formação de materiais bastante frágeis, devido à grande tensão que é exercida, que resulta das repulsões estereoquímicas. Estruturas mais abertas, do tipo $(R)_nSi(OR)_{4-n}$ podem solucionar este problema.

→ Proporção molar H_2O : grupos alcóxidos (R)^{22,23}

É esperado que uma maior razão R favoreça a reacção de hidrólise. Normalmente é aconselhada a razão 4:1, não podendo ser esquecido, no entanto, o facto de a água ser um produto da reacção de condensação e, por conseguinte, razões menores poderão ser suficientes. Quando os precursores reagem com uma baixa concentração de água, formam-se inicialmente monómeros parcialmente hidrolisados, que condensam para formar espécies poliméricas esterificadas, lineares e/ou ramificadas. Se aumentarmos a razão R, em sistemas acídicos, obtêm-se polímeros praticamente hidrolisados. No caso da catálise básica, produzem-se cadeias completamente hidrolisadas, podendo existir monómeros hidrofóbicos não reactivos, que induzem uma separação de fases. Quando a razão R é muito elevada, devido à separação dos diferentes agregados e consequente redução da condensação, ocorre a formação de estruturas cíclicas isoladas. Resultam partículas esféricas muito densas.

○ Gelificação

O processo de gelificação ocorre quando se formam as ligações entre as partículas de sol de sílica, produzidas pela hidrólise e condensação, quer sob catálise ácida ou básica (figura 1.10 e 1.11), até que a dada altura os agregados formados dão origem a uma rede polimérica infinita.²²

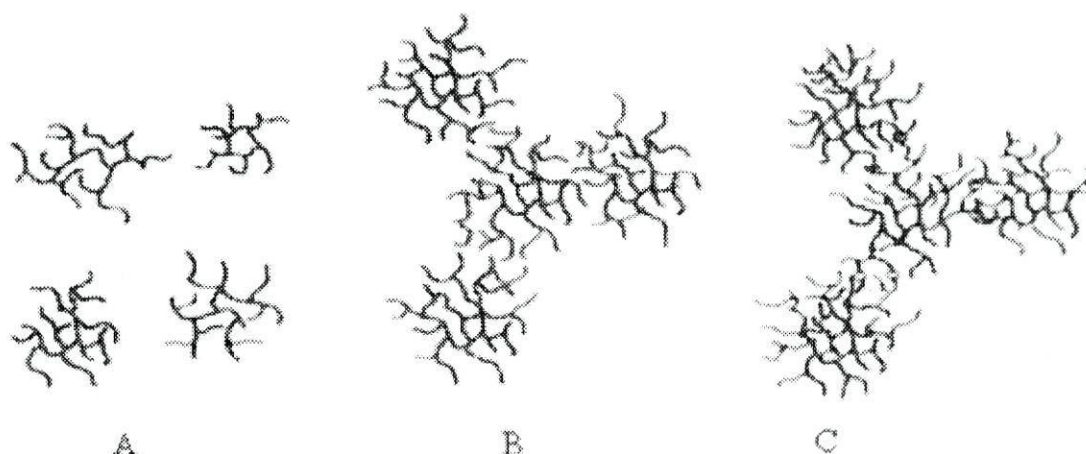


Figura 1.10 – Esquema da gelificação sob catálise básica: A – afastado do ponto de gelificação (aglomerados ramificados); B – próximo do ponto de gelificação (crescimento e ramificação adicional); C – ponto de gelificação (aglomerados ligados)²⁶

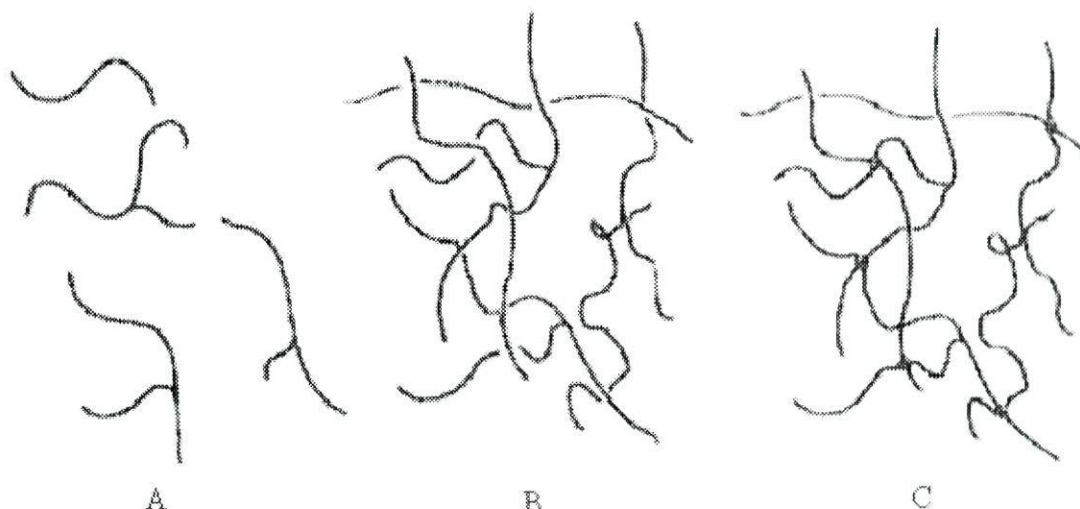


Figura 1.11 – Esquema da gelificação sob catálise ácida: A – afastado do ponto de gelificação; B – próximo do ponto de gelificação (envolvimento primário de macromoléculas lineares); C – ponto de gelificação (entrelaçamento adicional nas junções)²⁶

Antes de atingir a zona de gelificação, o gel inicial possui uma elevada viscosidade, tendo porém uma elasticidade reduzida. No ponto de gelificação não ocorre qualquer reacção química, endotérmica ou exotérmica, apenas a viscosidade aumenta de forma rápida. Depois da zona de gelificação o aumento de fenómenos de entrelaçamento e inclusões químicas de partículas sol isoladas nos agregados provocam um aumento da elasticidade de amostra.²²

O processo de gelificação pode ocorrer de diversas formas, dependendo do tipo de aplicação a que se destina a solução de Sol-Gel.

○ Maturação

O processo de maturação é uma extensão do processo de gelificação que consiste no reforço da rede de gel por polimerizações (reacções de condensação) sucessivas, possíveis a diferentes

temperaturas e solventes.²⁷ O processo de maturação pode prolongar-se por longos períodos de tempo para amostras a temperatura ambiente, onde a velocidade depende do pH, temperatura e composição do gel. O efeito deste processo é o encolhimento e endurecimento da rede. O encolhimento ocorre porque se formam novas ligações onde apenas existem ligações fracas entre os grupos hidroxilo superficiais e os grupos alcóxido. A contracção leva à expulsão do solvente dos poros do gel. O passo de maturação pode ser controlado pela variação do pH, temperatura, pressão, co-solvente e mistura de precursores presentes na composição inicial, de modo a que sejam optimizadas as propriedades do material.²²

- Secagem²⁸

O processo de secagem consiste na remoção da água e de co-solvente do gel. O método a utilizar depende do produto final que se quer obter.

O *cryogel* resulta de um processo de secagem por congelamento. Usualmente o material, que é hidrofílico, pode reagir muito rapidamente com a água, levando novamente a uma solução idêntica àquela de que se partiu.

Um aerogel resulta de um processo de secagem supercrítico. O passo de secagem é realizado dentro de uma autoclave que permite que se passe o ponto crítico (pressão crítica, temperatura crítica) do solvente. Existem diferentes formas de atingir o ponto crítico do solvente, por exemplo o próprio solvente pode ser escolhido tendo em conta a natureza da parte sólida. Sólidos inorgânicos fortes são comumente secos usando álcool ou acetona como solvente. Sólidos orgânicos, que se podem decompor a temperaturas abaixo dos 100 °C são secos usando dióxido de carbono como solvente.

Exceptuando os dois processos referidos anteriormente, os outros processos de secagem levam à formação de xerogéis. Xerogéis referem-se a géis secos à temperatura ambiente e sob a pressão atmosférica. Geralmente, o xerogel é o resultado de uma secagem lenta de forma a evitar fendas associadas a uma permeabilidade muito baixa da rede sólida.

- Densificação²²

O efeito de tratamento por calor depende das características do material no final do processo de secagem a baixas temperaturas.

O processo de densificação pode ser compreendido através da relação entre o encolhimento linear e a perda de massa em função da temperatura, para amostras aquecidas a velocidade constante. O processo de densificação é bastante favorecido termodinamicamente devido à elevada redução da área de superfície do material. São observadas três regiões:

- Abaixo dos 200 °C, baixas temperaturas, ocorre perda de massa à medida que a água ou álcool é evaporado mas o encolhimento é pequeno e em alguns casos é observada uma expansão da rede;
- Entre os 150-200 °C a 500-700 °C, temperaturas intermédias, as amostras apresentam perda de massa e a contracção é simultânea. Nesta gama de temperaturas ocorrem também varias alterações, tais como a perda de compostos orgânicos e posteriormente condensação ou relaxamento estrutural;
- Quando a temperatura é superior a 700 °C, temperaturas elevadas, observa-se um aumento abrupto da velocidade de contracção acompanhado de uma diminuição mínima ou nula de perda de massa.

1.2.4 Elementos fundamentais para a produção de MIPs

Como já foi mencionado, para preparar um Polímero de Impressão Molecular é necessário: a molécula molde (que pode ser a molécula alvo ou um análogo), um ou mais monómeros funcionais para formar o complexo MF-molécula molde, agentes de entrelaçamento, e um solvente.

○ A molécula molde

A molécula molde é fundamental na Impressão Molecular, pois é em função desta que os monómeros funcionais são escolhidos para formar as cavidades selectivas do polímero.

Infelizmente, e por diversas razões, nem todos os analitos podem ser impressos directamente.²⁹

Nas condições de polimerização em que o MIP será produzido, a molécula molde deve ser quimicamente inerte de forma a evitar a ocorrência de reacções laterais e/ou apresentar condições instáveis à polimerização.^{5,29}

○ Os monómeros funcionais

Na Impressão Molecular podem ser empregues todos os tipos de polimerização (por intermédio de radicais iniciadores, aniónica, catiónica, etc). Contudo a polimerização tem que ocorrer em condições em que todos os componentes (molécula molde, agentes de entrelaçamento, complexo não-covalente, entre outros) permaneçam intactos.⁵

A razão entre MF e a molécula molde é um parâmetro importante na mistura de polimerização. Quando a quantidade de MF se encontra em excesso, leva à formação de ligações não específicas das moléculas, enquanto em quantidades baixas de MF leva a uma desajustada formação do complexo MF-molécula molde e conseqüentemente a um fraco desempenho das cavidades específicas formadas.⁵

Quando se usam dois ou mais MF em simultâneo na mistura de polimerização, é importante ter em conta a taxa de reactividade dos monómeros para garantir que a copolimerização seja viável.²⁹

○ Os agentes de entrelaçamento

Estes compostos são utilizados para fixar as cavidades específicas formadas na rede polimérica e impor a estabilidade mecânica na matriz polimérica. Pela escolha adequada dos agentes de entrelaçamento pode-se controlar a estrutura das cavidades específicas e o ambiente químico no seu redor.^{5,29}

Para que a impressão seja eficiente, a reactividade do agente de entrelaçamento deve ser semelhante à do monómero funcional a utilizar, caso contrário pode ocorrer uma polimerização indesejada, existindo maior polimerização ou do MF ou do agente de entrelaçamento, o que leva à formação de um número de cavidades específicas insuficiente e a uma distribuição não uniforme destas pela rede polimérica.⁵

Outro factor importante é a razão molar entre agente de entrelaçamento e monómero funcional. Se a razão for muito baixa, as cavidades ficam situadas muito próximas umas das outras e não conseguem funcionar independentemente, podendo até uma cavidade inibir por completo o funcionamento das que lhe estão mais próximas. No caso das razões molares serem muito elevadas, a Impressão Molecular fica dificultada, especialmente se o agente de entrelaçamento demonstrar interacções não-covalentes com o monómero funcional e/ou molécula molde.⁵

No processo de polimerização de SG, os agentes de entrelaçamento são também os silanos. O próprio monómero funcional pode funcionar também como agente de entrelaçamento.⁵

○ O solvente⁵

As funções do solvente são: dissolver todos os reagentes para a polimerização e tornar a estrutura dos polímeros impressos o mais porosa possível, de modo a facilitar a remoção das moléculas impressas e aumentar o número de cavidades disponíveis para receber as moléculas molde. As moléculas de solvente são incorporadas na estrutura do polímero e posteriormente removidas num pós-tratamento. Durante essa operação, o espaço inicialmente ocupado pelas moléculas de solvente fica desocupado, conferindo porosidade ao polímero sintetizado. Por esta razão também se utiliza o termo “solvente porogénico”.

Outra das funções do solvente é diminuir o calor da reacção gerado na polimerização, pois caso contrário a temperatura da mistura reaccional torna-se elevada, ocorrendo reacções laterais indesejadas.

A escolha do solvente varia consoante o tipo de impressão pretendida e a técnica de polimerização utilizada, existindo uma variada gama de solventes a utilizar.

1.3 Testes de Eficiência da Impressão Molecular

A teoria da Impressão Molecular proporciona a obtenção de materiais selectivos a um analito, contudo é preciso comprovar a sua eficiência. É necessário realizar estudos para comprovar se as cavidades selectivas foram produzidas e se a molécula alvo forma com a cavidade uma ligação específica.

O desempenho dos MIPs pode ser obtido em comparação com os NIPs (*Non Imprinted Polymers*). Os NIPs são polímeros produzidos da mesma forma que os MIPs contudo sem nunca terem estado na presença da molécula molde, pelo que não possuem cavidades impressas. Comparando o desempenho do polímero impresso com o correspondente Polímero Não Impresso (NIP), a grandeza da impressão é avaliada.

Neste trabalho científico utilizou-se a técnica de Extracção em Fase Sólida para avaliar os Polímeros de Impressão Molecular produzidos.

1.3.1 Extracção em Fase Sólida (SPE)

A preparação de amostras é geralmente considerada como um passo fundamental em procedimentos analíticos, porque ajuda não apenas a alcançar limites de detecção tão baixo quanto os valores legislados mas também proporciona a limpeza da matriz da amostra.³⁰

A mais popular técnica de preparação de amostras para amostras líquidas é a Extracção em Fase Sólida (SPE), a qual já substituiu a Extracção Líquido-Líquido. A SPE tem sido extensivamente usada na purificação e concentração de diversos analitos de matrizes complexas.³⁰

A utilização de uma coluna de extracção em fase sólida engloba 4 passos básicos:³¹

- **Condicionamento da coluna:** passagem de um volume de solvente de polaridade semelhante da fase estacionária da coluna, e posteriormente, passagem de igual volume de uma solução similar em natureza ao solvente da amostra. O primeiro solvente a passar tem por objectivo limpar a coluna de eventuais impurezas que esta possa conter e ainda homogeneizar a fase estacionária para a passagem da amostra. O segundo solvente, ao passar pela coluna, tem por principal objectivo eliminar vestígios do solvente anterior, cuja presença condicionaria o processo de extracção;

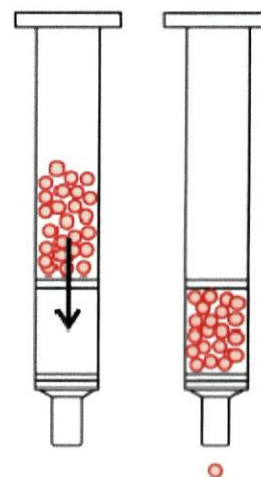


Figura 1.12 – Esquema do condicionamento da coluna

- **Retenção:** passagem da amostra pela coluna. Independentemente da estratégia utilizada para a purificação da amostra (retenção da espécie a analisar ou retenção dos interferentes), o passo de passagem da amostra deve ser realizado de forma lenta, para que toda a fase estacionária seja uniformemente utilizada e ainda para garantir a extracção total das espécies da amostra a extrair;

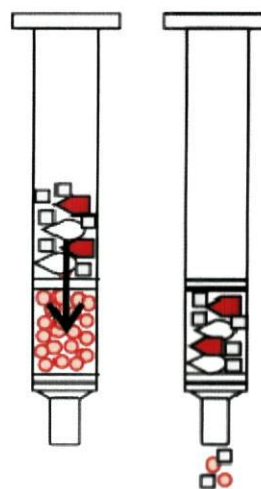


Figura 1.13 – Esquema da etapa de retenção

- **Lavagem da coluna:** após a passagem da amostra faz-se atravessar pela coluna uma nova porção de solução similar ao solvente da amostra, ou outra solução que não remova os compostos de interesse. Esta etapa tem por objectivo efectuar uma eliminação mais eficiente das espécies interferentes contidas na fase estacionária;

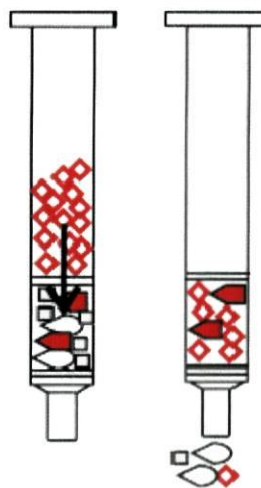


Figura 1.14 – Esquema da lavagem da coluna

- **Eluição:** é o último passo na utilização de uma coluna de SPE para a purificação de um componente de uma amostra. A recolha da espécie a analisar é feita mediante a passagem de um solvente capaz de romper a interacção existente entre a fase estacionária e a espécie. A eluição deve ser feita com precaução para garantir uma recolha quantitativa do analito retido, deixando no sorvente qualquer impureza que não tenha saído no passo anterior.

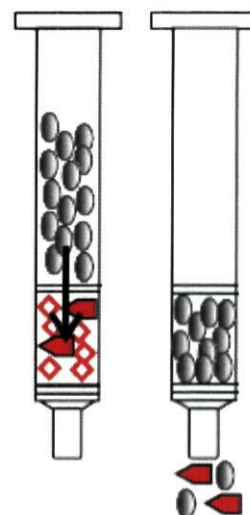


Figura 1.15 – Esquema da etapa de eluição

1.3.2 Polímeros de Impressão Molecular como sorventes de SPE

Os MIPs como sorventes de SPE, os *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction* (MISPE), podem ser considerados como a nova geração da Extracção em Fase Sólida. Uma técnica mais selectiva para a análise simples e rápida de resíduos de analitos em matrizes complexas.

Os MISPEs apresentam diversas vantagens em relação aos convencionais SPEs:

- Sorventes altamente selectivos;
- Obtenção de extractos mais limpos e assim permite um limite de detecção mais baixo;
- Métodos mais fáceis, robustos e rápidos, diminuindo o tempo de manuseamento da amostra;
- Permitem aumentar o tempo de vida de colunas de HPLC;
- Custos mais reduzidos.³²

Os MISPE produzidos pela técnica de polimerização com base em poliacrilatos encontram-se extensamente desenvolvidos na literatura, com diversos artigos de revisão publicados como é o caso dos trabalhos de Olsen *et al.*³³, Martin-Esteban³⁴, Lanza e Sellergren³⁵, Baggiani *et al.*³⁶, e Tamayo *et al.*³⁷.

Sellergren³⁸ em 1994 foi o primeiro a demonstrar o potencial de MIPs como sorventes de SPE. No entanto, só vários anos depois surgem novas aplicações de MIPs para SPE, como foi o caso do trabalho apresentado por Martin *et al.*³⁹ em 1997, sendo que o último trabalho apresentado, até a data, foi o de Pilau *et al.*⁴⁰.

Em Dezembro de 2006, a Supelco e a MIP Technologies AB (Lund, Sweden) entraram em colaboração, e a Supelco passou a exclusivo distribuidor dos MISPE produzidos e patenteados pela

MIP Technologies, surgindo, assim, os SupelMIPs. Existem SupelMIPs para os seguintes analitos: cloranfenicol, anfetaminas, clenbuterol, bloqueadores beta, antagonistas beta, todos receptores beta (bloqueadores beta e antagonistas beta), NNAL (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol), TSNAs (4 diferentes nitrosaminas específicas do tabaco), triazinas e riboflavina (vitamina B2).³²

Na figura 1.16 encontra-se representada a evolução da selectividade que os SupelMIPs apresentam em relação a técnicas anteriores.

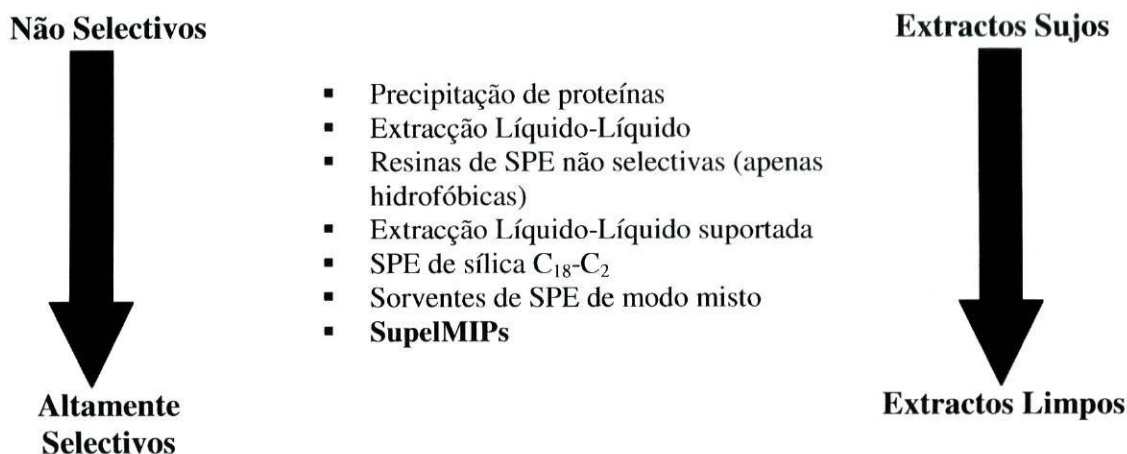


Figura 1.16 – Esquema da selectividade relativa de diferentes meios em comparação com os SupelMIPs apresentado pela Supelco³²

Como foi demonstrado anteriormente, a aplicação da Impressão Molecular como um novo meio de obtenção de sorventes de SPE já se encontra bem desenvolvido. Contudo MIPs obtidos pela técnica de polimerização de SG e aplicados como sorvente de SPE são uma técnica ainda muito por explorar. As vantagens que a técnica de SG têm para oferecer proporcionam uma área de grande interesse e que actualmente está a ganhar terreno na investigação científica. No apêndice 1 apresenta-se uma tabela com dados sobre artigos científicos produzidos sobre MISPE de SG.

1.4 O Cloranfenicol (CAP)

O cloranfenicol (CAP), representado na figura 1.17, inicialmente chamado cloromicetina, foi isolado pela primeira vez de *Streptomyces Venezuelae*, em 1947, por Burkholde. Dois anos mais tarde foi obtido por síntese e produzido em escala industrial e, em 1949, foi introduzido na terapêutica. Este composto foi o primeiro antibiótico de largo espectro apresentando actividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e também contra outros microrganismos. Exerce a sua acção através de inibição da síntese proteica e é eficaz no tratamento de várias doenças infecciosas.⁴¹

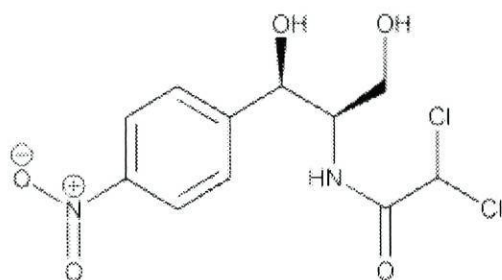


Figura 1.17 – Estrutura molecular do Cloranfenicol⁴²

O antibiótico tornou-se muito usado no tratamento de infecções graves como a febre tifóide e outras formas de salmonelose, nas infecções por *Haemophilus Influenza*, particularmente na meningite e outras infecções graves do sistema nervoso central e tracto respiratório. O cloranfenicol ainda é muito utilizado em alguns locais no mundo dado o seu amplo espectro de acção e o seu baixo custo. No entanto, em indivíduos susceptíveis, está associado a efeitos tóxicos graves nomeadamente depressão da medula óssea, particularmente grave na forma de anemia aplástica fatal. A anemia aplástica ocorre quando a medula óssea produz em quantidade insuficiente os três diferentes tipos de células sanguíneas existentes: glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas.⁴¹

Com o aparecimento de agentes mais seguros, o cloranfenicol é frequentemente considerado um antibiótico de interesse puramente histórico. Todavia é útil em algumas situações, como em pessoas gravemente doentes nas quais as alternativas mais seguras se revelam menos eficazes ou quando as alternativas não estão disponíveis. Continua, no entanto, a ser muito utilizado nos países de Terceiro Mundo, pelo facto de ser barato e eficaz em muitas infecções graves.⁴¹

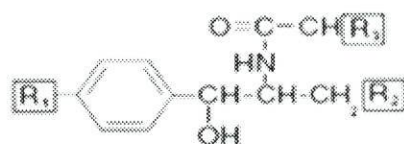
○ Algumas propriedades Físico-Químicas do Cloranfenicol⁴¹

Tabela 1.2 – Algumas propriedades Físico-Químicas do Cloranfenicol

Propriedades	Informação
Nome	D(-)-treo-1-(p-nitrofenil)-2,2-dicloroacetamido-1,3-propanodiol
Fórmula Química	$C_{11}H_{11}Cl_2N_2O_5$
Massa Molecular	323,132 g/mol
Cor	Branca, acinzentada ou amarelada
Sabor	Amargo
Estado Físico	Cristais, pó cristalino, agulhas ou placas alongadas
Ponto de Fusão (°C)	150,5 – 151,5
pH	Neutro
Pressão de Vapor (mmHg)	$1,73 \times 10^{-12}$
Estabilidade	Muito estável, pode ser armazenado por longos períodos á temperatura ambiente
Solubilidade	
Na água a 25°C	Ligeiramente solúvel (2,5 mg/mL)
Clorofórmio	Solúvel
Metanol	Muito solúvel
Etanol	Muito solúvel
Butanol	Muito solúvel
Acetato de etilo	Muito solúvel
Acetona	Muito solúvel
Benzeno	Insolúvel

○ Os derivados do Cloranfenicol⁴¹

O cloranfenicol, tianfenicol, florfenicol e azidanfenicol (figura 1.18) são antibióticos de largo espectro.



	R_1	R_2	R_3
Cloranfenicol	-NO ₂	-OH	= Cl ₂
Azidanfenicol	-NO ₂	-OH	$\begin{matrix} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \\ \diagup \\ \text{N} \end{matrix}$
Tianfenicol	-SO ₂ CH ₃	-OH	= Cl ₂
Florfenicol	-SO ₂ CH ₃	-F	= Cl ₂

Figura 1.18 – Estrutura do Cloranfenicol e os seus derivados

O tianfenicol é estruturalmente semelhante ao cloranfenicol mas difere deste pela presença de um grupo sulfometilo em vez do grupo nitro na posição *para*. Como antibiótico consegue ser cerca de 2,5 a 5 vezes mais forte e apresenta a vantagem de nunca ter sido associado a anemia aplástica.

O florfenicol é um análogo do tianfenicol e contém um átomo de flúor em vez de um grupo hidroxilo no carbono 3. A substituição nesta posição reduz o número de locais disponíveis para acetilação bacteriana, possivelmente tornando o antibiótico mais resistente à inactivação bacteriana.

O uso de tianfenicol e o de florfenicol está aprovado na União Europeia, para utilização em gado bovino, ovino, suíno e aves. Em aviários é prática comum administrar estes antibióticos através da água consumida pelos animais.

O cloranfenicol e alguns dos seus derivados, como o tianfenicol e azidanfenicol, têm sido utilizados ao longo dos anos na medicina humana. Alguns ésteres do cloranfenicol como o palmitato ou succinato de cloranfenicol têm sido produzidos para aplicações terapêuticas.

O azidanfenicol só é utilizado em medicamentos oftalmológicos.

1.4.1 O uso ilícito do Cloranfenicol

Como já foi referido, para garantir a segurança alimentar o uso de cloranfenicol foi proibido na União Europeia em 1994 em animais de consumo humano, uma vez que se provou ser nocivo para os seres humanos. Contudo, o cloranfenicol é um antibiótico barato e de fácil acesso, pelo que ainda é muito usado em países como a China, Vietname, Índia, Indonésia, Tailândia, Bangladeche e México. Devido à globalização comercial e económica, é fácil encontrar alimentos provenientes desses países nos nossos mercados, pelo que se justifica um controlo e monitorização adequado pelas entidades responsáveis.

Em Junho de 2002, a U.S. FDA (*United States Food and Drug Administration*) anunciou que tem vindo a aumentar a colheita de amostras de produtos importados, como camarões, lagostas, mel, geleia real, alimentos para animais e de produtos lácteos, para a detecção de cloranfenicol. A U.S. FDA tomou essa resolução porque foram detectados resíduos de cloranfenicol no camarão, lagosta, mel e outros alimentos importados, em alguns países e diversos estados dos Estados Unidos da América.⁴³

A Associação de Defesa do Consumidor (Deco) portuguesa tem demonstrado que, num passado recente, foram encontrados diversos casos de alimentos com resíduos de cloranfenicol. A Deco apresenta, desde 2003 a 2007, 14 notificações sendo 5 comunicados de imprensa (tabela 1.3) e 9 artigos publicados na página da internet e revista Deco Proteste (tabela 1.4).⁴⁴

Tabela 1.3 – Comunicados de imprensa realizados pela Deco entre 2003 e 2007 sobre a presença de Cloranfenicol em alimento⁴⁴

- Medicamentos à mesa - 28/01/2003
- Misturas de marisco congelado: pouca variedade e pouco sabor - 30/01/2003
- Peru a granel e embalado: 20 amostras analisadas, 17 com nitrofuranos! – 18/03/2003
- Geleia real com antibiótico proibido - 17/08/2005
- Mel e geleia real com resíduos de medicamentos - 13/12/2005

Tabela 1.4 – Artigos realizados pela Deco entre 2003 e 2007 sobre a presença de Cloranfenicol em alimentos⁴⁴

- Medicamentos à mesa - Teste Saúde - 01/03/2003
- Misturas de marisco congelado - Pro Teste - 01/03/2003
- Peru com nitrofuranos - Pro Teste - 01/05/2003
- Breves - Pro Teste - 01/10/2004
- Medicamentos no mel e geleia real - Pro Teste - 01/01/2006
- Segurança alimentar - Pro Teste - 01/02/2007
- Espetadas de peru - Pro Teste - 01/03/2007
- Truta, salmão e camarão de aquicultura - Pro Teste - 01/04/2007
- Falta de segurança alimentar - 30/05/2007

1.4.2 Determinação Analítica do Cloranfenicol

Após a proibição do uso de cloranfenicol em animais para consumo humano surge uma diversidade de métodos de determinação de CAP que possuem um limite de detecção extremamente baixo para monitorizar os níveis de cloranfenicol em alimentos.

Algumas das técnicas utilizadas são: ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), RISA (*Radioimmunosorbent Assay*), Biossensores, Cromatografia Gasosa com Derivatização e Cromatografia Líquida com Espectroscopia de Massa (LC/MS).⁴⁵⁻⁴⁸

A técnica de Cromatografia Líquida demonstrou ser eficaz nas análises de matrizes complexas e particularmente na análise de resíduos de antibióticos em alimentos como o mel, camarões e caranguejos. Diversos métodos de detecção com Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência encontram-se desenvolvidos numa extensa bibliografia. A título de exemplo apresentam-se os trabalhos de Nagata *et al.*⁴⁹, Iosifidou *et al.*⁵⁰, di Pietra *et al.*⁵¹ e Luckas *et al.*⁵².

Actualmente a Cromatografia Líquida com Espectroscopia de Massa (LC/MS) é o melhor método de monitorização de resíduos de CAP, como foi demonstrado por Pan e colaboradores, entre outros.⁵³⁻⁵⁸ O centro para a segurança alimentar e nutrição aplicada da U.S. FDA apresenta também procedimentos de confirmação de CAP em resíduos alimentares utilizando a Cromatografia Líquida - Espectroscopia de Massa - Espectroscopia de Massa (LC/MS/MS).⁵⁹

A análise de resíduos de CAP é efectuada sobretudo em amostras alimentares, mas também na urina, plasma, soro, águas residuais, entre outras.

Em 2005, Shen *et al.* apresentaram um conjunto de procedimentos, esquematizado na figura 1.19, para a preparação de amostras como camarão, caranguejo, carne, porco, fígado e mel.⁴⁵

No tratamento de amostras de águas residuais é necessário realizar sedimentação, filtração, lamas activadas e cloração. Posteriormente são colocadas em garrafas de vidro com ácido clorídrico e azida de sódio (NaN₃) e colocadas no frigorífico (< 4°C) para serem analisadas até dois dias.⁶⁰

A preparação de amostras com resíduos de CAP é laboriosa, demorada, envolvendo diversas etapas até que a amostra possa ser analisada.

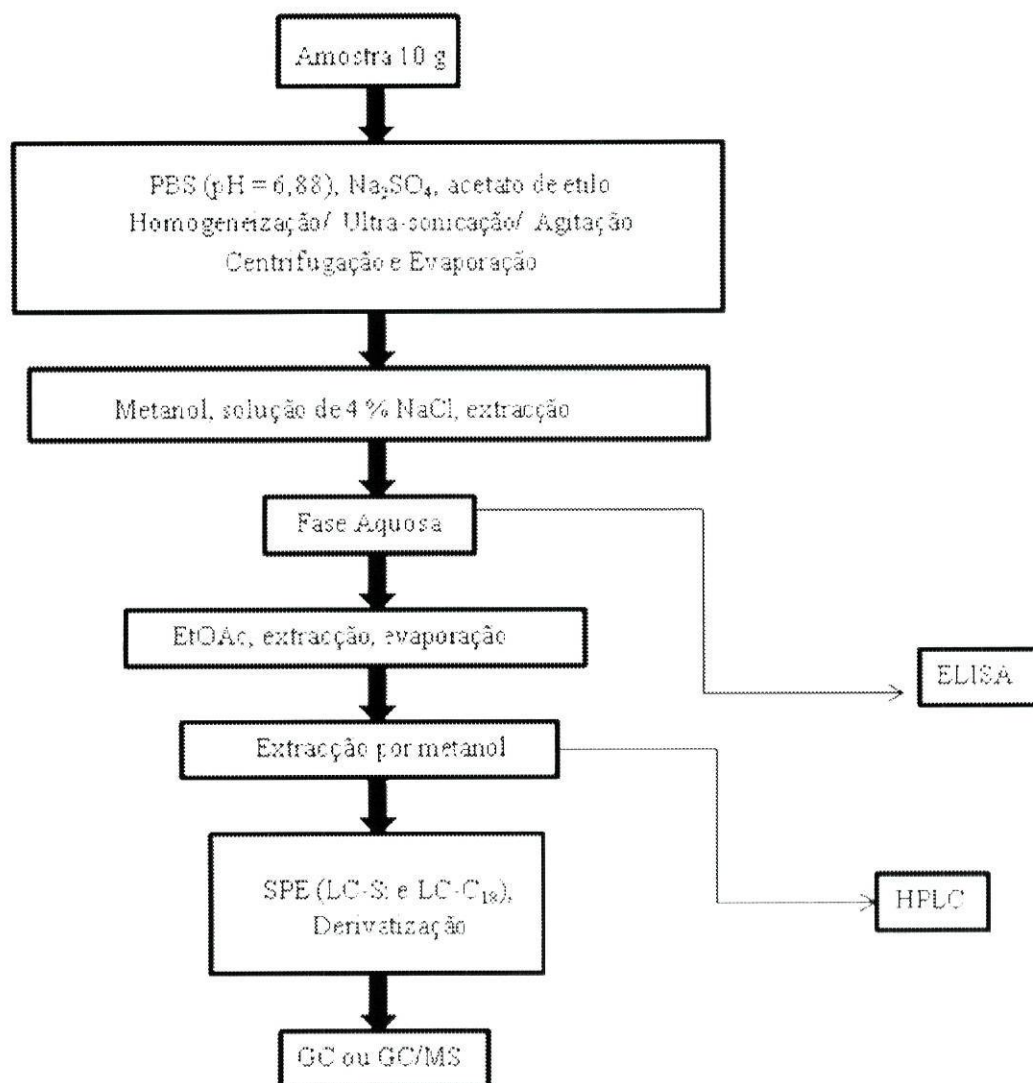


Figura 1.19 – Esquema apresentado por Shen *et al.*⁴⁵ do conjunto de procedimentos a realizar na preparação de amostras para determinar resíduos de CAP

Legenda: PBS – solução tampão fosfato; Na₂SO₄ – sulfato de sódio; NaCl – cloreto de sódio; EtOAc – acetato de etilo; GC – Cromatografia Gasosa; GC/MS – Cromatografia Gasosa-Espectroscopia de Massa

1.5 O estado da arte em relação à determinação do Cloranfenicol

A determinação de resíduos de cloranfenicol em matrizes alimentares representa um desafio analítico. Devido aos efeitos tóxicos que o CAP apresenta nos humanos, como foi apresentado no capítulo anterior, e como não é possível estabelecer um Nível Máximo de Resíduos em alimentos derivados de animais, em 2002, a União Europeia, no sentido de alcançar uma harmonia no desempenho dos métodos analíticos para a monitorização de CAP, definiu um limite mínimo de desempenho requerido em 0,3 µg/kg. Este limite corresponde à quantidade mínima de analito numa amostra, que tem de ser detectada e confirmada. Assim, são necessários métodos cada vez mais eficientes e selectivos.⁶¹

Quando Sellergren, em 1994, apresentou a primeira aplicação de MIPs como sorventes de SPE (MISPE) para a extracção selectiva de pentamidina em fluidos biológicos, os MIPs provaram ser úteis na pré-concentração de analitos para posteriores análises.³⁸

Em 1997, Levi e colaboradores apresentaram um trabalho no qual desenvolveram um sensor óptico para a determinação de CAP, utilizando MIPs e HPLC como técnica analítica. O método é baseado num deslocamento competitivo do corante conjugado de vermelho de metil-cloranfenicol a partir de ligações específicas em cavidades num polímero de impressão pelo analito. Este sistema de detecção mostrou uma resposta linear na gama de 3-1000 µg/mL e eficiente na detecção do CAP extraído de um soro de bovinos.⁶²

McNiven *et al.*⁶³ expuseram um artigo científico no qual desenvolveram uma coluna cromatográfica como sensor do CAP através da Impressão Molecular. O sensor apresentou-se imune a interferências de derivados de CAP e apenas cerca de 60% selectivo ao análogo tianfenicol.⁶³

No trabalho publicado em 2003, Mena *et al.*⁶⁴ descrevem o desempenho de um MISPE para CAP, cuja detecção ocorre por voltametria de onda quadrada em micro-eléctrodos de fibra de carbono activada electroquimicamente. A aplicação do MIP tanto na purificação como na pré-concentração foi demonstrada pela determinação de CAP em soluções oftálmicas e em leite fortificado com diferentes concentrações. Em amostras de 250 mL, com uma concentração em CAP de 9,7 µg/L obteve-se uma recuperação de 96±4%.⁶⁴

Schimmer *et al.*^{65a}, em 2006, apresentaram um MISPE, em que a molécula molde era o CAP, para a purificação de amostras de mel e HPLC como técnica analítica, o qual apresentou percentagens de recuperação das soluções padrão de CAP a rondar os 100% e de 94% em amostras de leite fortificado. Num artigo^{65b} publicado em 2008, com o sentido de melhorar a utilidade do MISPE como uma técnica de extracção, estes investigadores estudaram vários MIPs que produziram com diferentes monómeros funcionais e diferentes solventes de eluição, incluindo solventes aquosos e não polares, verificando que solventes não polares são de interesse especial.

A preparação de Microesferas de Polímeros de Impressão Molecular (MIPM) para CAP por polimerização de suspensão aquosa é apresentada por Shi e colaboradores em 2007. Os MIPM resultantes têm a capacidade de adsorver especificamente o CAP e o MISPE baseado no MIPM mostrou-se eficiente na purificação e pré-concentração de resíduos de CAP em amostras como o leite e camarões, com recuperações de 92,7% e 84,9%, respectivamente.⁶⁶

Em Setembro de 2007 surge um trabalho de Boyd *et al.* onde é apresentado um método confirmatório da determinação de CAP através de um MIP chamado de SupelMIP (sintetizado pela MIP Technologies, Sweden). A novidade deste MIP produzido é que tal foi obtido utilizando como molécula molde um análogo do CAP. Utilizando um composto análogo ao CAP como molécula molde do analito evita-se o maior problema associado ao desenvolvimento de MIPs, isto é, evita-se a libertação de quantidades residuais da molécula molde. O MIP descrito foi usado como SPE para a extracção de CAP de várias matrizes como o mel, urina, leite e plasma. A determinação analítica foi efectuada por Cromatografia Líquida - Espectroscopia de Massa - Espectroscopia de Massa. Os resultados experimentais usando o SupelMIP de cloranfenicol em amostras de mel (0,38 µg/Kg) encontram-se de acordo com o resultado esperado (0,4 µg/Kg), que foram obtidos por um laboratório independente que utilizou um método analítico validado.⁶⁷

Como já foi dito, o processo de polimerização pode ter como base dois tipos de monómeros funcionais: de base orgânica e de base inorgânica. Todos os trabalhos apresentados anteriormente produziram Polímeros de Impressão Molecular para cloranfenicol com base em monómeros funcionais orgânicos. Até à data, não se conhece qualquer trabalho no qual seja desenvolvido MIPs para cloranfenicol de base inorgânica (silanos) com base na técnica de polimerização de Sol-Gel, como é o caso do trabalho aqui apresentado.

Capítulo 2

Parte Experimental

Capítulo 2 – Parte Experimental

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

Tabela 2.1 – Descrição dos reagentes utilizados

Nome	Fórmula Molecular	Pureza (%)	Massa Molar (g/mol)	Marca	Número CAS	Perigo
Amoníaco	NH ₃	25	17,03	Pronalab	7664-41-7	Irritante
Ácido clorídrico	HCl	37	36,46	Pronalab	7647-01-0	Tóxico; Corrosivo; Comburente
Ácido trifluoroacético (TFA)	C ₂ HF ₃ O ₂	≥ 98	114,02	Sigma-Aldrich	76-05-1	Corrosivo
Cloranfenicol (CAP)	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	98	323,13	Aldrich	56-75-7	Tóxico; Cancerígeno
Hidróxido de sódio	NaOH	≥ 99	40,00	Merck	1310-73-2	Corrosivo
Metanol (MeOH)	CH ₄ O	≥ 99,8	32,04	Fluka	67-56-1	Inflamável; Tóxico
Metoxitrimetilsilano (MOTMS)	C ₄ H ₁₂ OSi	≥ 97	104,22	Fluka	1825-61-2	Altamente inflamável
Polietilenglicol (PEG)	HO(CH ₂ CH ₂ O) _n H	não aplicável	35000 e 6000 e 1000	Fluka	25322-68-3	Irritante
Tetrametoxisilano (TMOS)	C ₄ H ₁₂ O ₄ Si	≥ 98	152,22	Fluka	681-84-5	Tóxico
Tianfenicol (TAP)	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO ₅ S	99	356,20	Sigma	15318-45-3	Irritante
Tetrahidrofurano (THF)	C ₄ H ₈ O	≥ 99,5	77,11	Fluka	109-99-9	Irritante; Altamente inflamável
Ureidopropiltrimetoxisilano (UPTMOS)	C ₇ H ₁₈ N ₂ O ₄ Si	97	222,32	ABCR	23843-64-3	Irritante

2.2 Produção dos Xerogéis estudados

O esquema apresentado em baixo pretende ilustrar de uma forma generalizada o processo de preparação dos sorventes produzidos e testados durante o trabalho experimental.

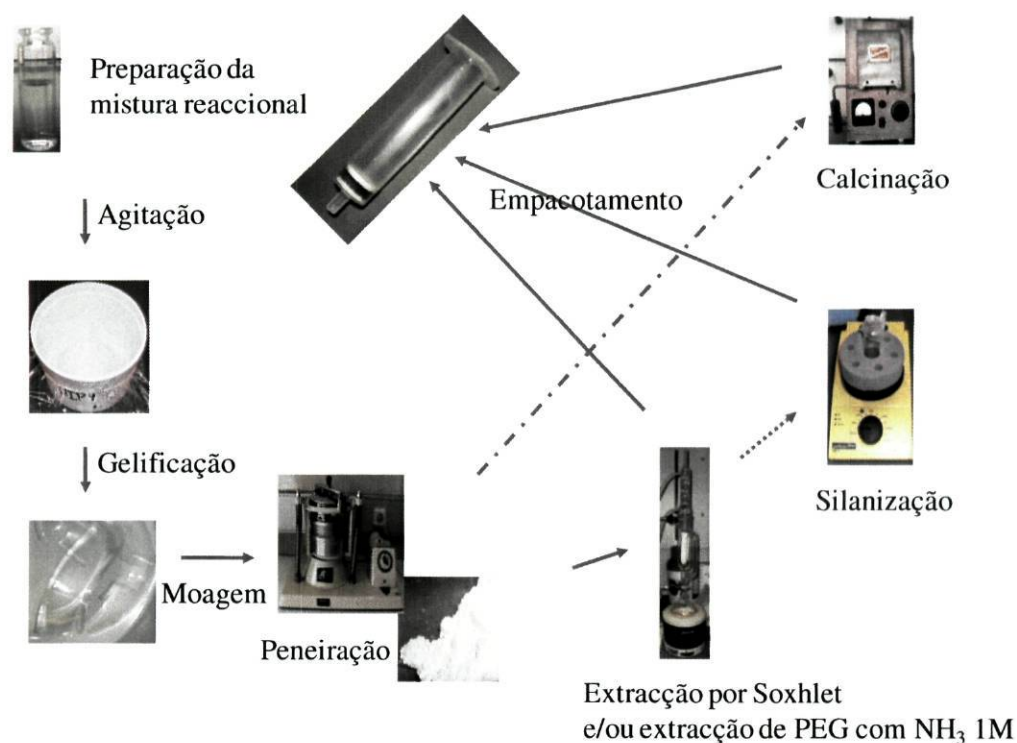


Figura 2.1 – Esquema ilustrativo do processo de preparação dos sorventes testados

As etapas apresentadas no esquema anterior encontram-se devidamente detalhadas nos pontos apresentados de seguida. Após a obtenção dos xerogéis moídos e peneirados, estes sofreram três tipos de tratamentos, nomeadamente a calcinação (---), a extracção por Soxhlet e/ou extracção de polietilenoglicol (___), e a extracção por Soxhlet e/ou extracção de polietilenoglicol seguido de silanização (----). Findo estes tratamentos, os xerogéis foram devidamente empacotados e testados.

2.2.1 Descrição das misturas reaccionais preparadas

As misturas reaccionais testadas possuíam como monómero funcional o ureidopropiltrimetoxisilano (UPTMOS), o tetrametoxisilano (TMOS) como precursor da rede polimérica, o metanol (MeOH) como co-solvente, o ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador e água. A molécula molde, para preparar os MIPs, foi o tianfenicol (TAP). Com o desenvolvimento do trabalho experimental e consecutivamente com os resultados alcançados, surgiu a necessidade de alterar a solução SG primária.

Os NIPs foram preparados de igual modo aos correspondente MIPs, contudo não incluíram a molécula molde, o TAP, na sua solução. Assim serviram como controlo da capacidade de Impressão Molecular dos MIPs correspondentes.

Na tabela 2.2 apresentam-se as quantidades molares dos principais reagentes das misturas reaccionais dos conjuntos MIP/NIP preparados. Para preparar a mistura reaccional primeiro adicionava-se o TAP (caso fosse um MIP), seguido do UPTMOS, MeOH, TMOS, TFA e H₂O.

Tabela 2.2 – Apresentação das quantidades molares dos principais reagentes das misturas reaccionais

Conjunto	Reagentes (nº de moles / mol)					
	UPTMOS	MeOH	TMOS	TFA	H ₂ O	TAP
MIP / NIP 1	0,0045	0,1500	0,0300	0,0042	0,1500	0,0006
MIP / NIP 2	----	0,1500	0,0345	0,0042	0,1500	0,0006
MIP / NIP 3	0,0045	0,1500	0,0300	0,0042	0,1500	0,0006
MIP / NIP 4	0,0045	0,1500	0,0300	0,0042	----	0,0006
MIP / NIP 5	0,0045	0,1500	0,0300	----	0,0900	0,0006
MIP / NIP 6	0,0045	0,1500	0,0300	0,0042	0,0345	0,0006
MIP / NIP 7	0,0045	0,1500	0,0300	0,0042	0,0345	0,0006

A proporção molar H₂O:Si, para preparar os Polímeros de Impressão Molecular descritos na tabela 2.2, foi de 5:1 para os conjuntos MIP/NIP 1, 2 e 3 e de 1:1 para os conjuntos MIP/NIP 6 e 7. O conjunto MIP/NIP 5 possui a proporção molar H₂O:Si de 3:1. O volume de NaOH adicionado à solução reaccional era o necessário para que esta se encontrasse com uma concentração de 1,00E-05 mol/L de catalisador. Nos conjuntos MIP/NIP 4 não foi adicionada água, contudo existiam quantidades vestigiais de água provenientes do TFA e de vapor de água.

Nos conjuntos MIP/NIP 2 e 3 utilizou-se o polietilenoglicol (PEG) de massa molar de 35000 (adicionado na mistura reaccional após o TAP), pesando-se 0,400 g do composto, pelo que a proporção molar MF:PEG foi de aproximadamente 1:1000. Devido ao menor volume de água, no conjunto MIP/NIP 7 não foi possível dissolver a mesma massa de PEG de 35000 mol/g, pelo que se optou por manter o valor de massa a pesar (0,400 g) e utilizar um PEG com uma massa molar de 6000.

As soluções de SG correspondentes de cada conjunto MIP/NIP apresentados na tabela 2.2 foram preparados em frascos de vidro de 20 mL e colocados no agitador de vórtice a cerca de 500 rotações por minuto (agitador de vórtice de modelo Yellow Line TTS2 da IKA com capacidade de 200 a 2500 rpm (rotações por minuto)).

Os frascos de vidro com as soluções apresentadas na tabela referida estiveram em agitação durante 24 horas, excepto o conjunto MIP/NIP 5, pois este gelifica antes das 24 horas de agitação, pelo que se passou a deixar em agitação por 6 horas.

O UPTMOS é um composto extremamente viscoso, pelo que a medição foi efectuada por pesagem.

2.2.2 Obtenção dos Xerogéis finais

Após o período de agitação já mencionado, as misturas foram vertidas em caixas de plástico (11,5 cm de diâmetro), as quais foram devidamente tapadas com película aderente que se perfuraram, com o objectivo de controlar a evaporação do solvente (de forma a que a evaporação fosse lenta).

Os xerogéis obtidos tinham o aspecto transparente e vítreo, como é evidenciado na figura 2.2. O xerogel era transferido para um gobelé e pesado.



Figura 2.2 – Exemplo de um MIP/NIP gelificado

Com os MIX/NIX (*Molecularly Imprinted Xerogel/Non Imprinted Xerogel*) em estado sólido passou-se para a etapa de moagem, macerando os xerogéis obtidos num almofariz. O pó obtido era então peneirado de forma a recolher a fracção entre os 25 e 45 μm e devidamente pesado.

Em seguida, foi utilizada uma montagem de extracção por Soxhlet (figura 2.3) para retirar a molécula tianfenicol dos MIXs. Assim, utilizou-se: manta de aquecimento, balão de fundo redondo de 500 mL, thimbles de celulose – 33 mm x 80 mm - (da Whatman), condensador de refluxo e extractor de Soxhlet.

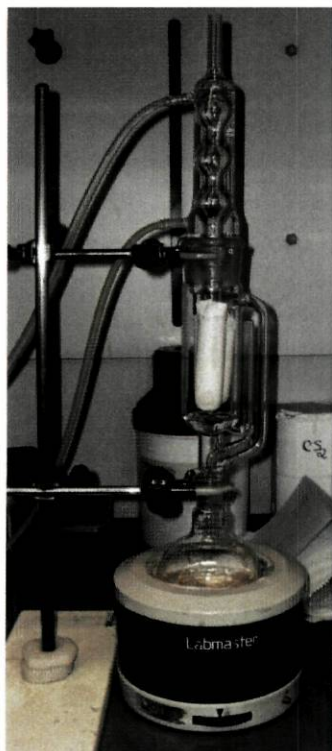


Figura 2.3 – Montagem do extractor de Soxhlet utilizado

A quantidade de cada xerogel obtido na fase da peneiração era colocada sobre 2 papéis de filtro, dobrados em pregas, sobrepostos (papéis de filtro de 125 mm de diâmetro, com 8 μm de porosidade, da Whatman).

Os NIXs, apesar de não possuírem a molécula molde, sofreram também o tratamento de extração por Soxhlet, para que passassem pelas mesmas etapas que os correspondentes MIXs.

Utilizou-se como solvente o metanol. O metanol era mudado aproximadamente de 12 em 12 horas. A limpeza dos xerogéis era controlada por análise de cromatogramas de amostras retiradas do solvente aproximadamente de 7 em 7 horas de extração. Os MIXs eram considerados “limpos” quando as áreas obtidas, no cromatograma correspondente ao TAP, apresentavam uma tendência para um valor, como é demonstrado na figura 2.4.

Representação gráfica da área cromatográfica correspondente ao TAP extraído vs tempo extracção por Soxhlet

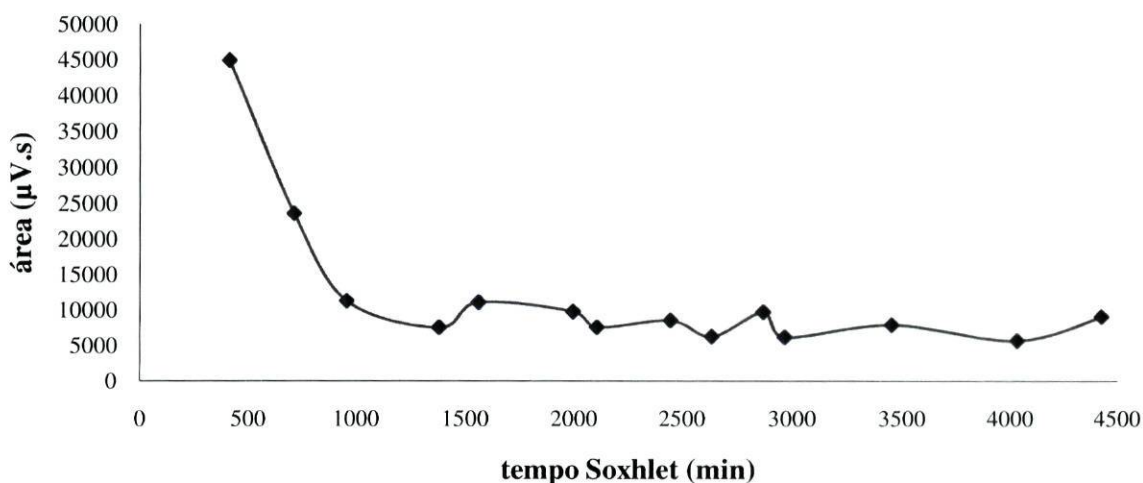


Figura 2.4 – Representação gráfica exemplificativa da área cromatográfica correspondente ao TAP extraído até à altura que se considerou o MIX “limpo”

Após a limpeza, os xerogéis nos papéis de filtro eram colocados a secar por 2 horas na estufa a 60°C. O pó obtido era colocado em frascos de vidro e pesado.

○ Extracção do PEG dos Xerogéis

Os conjuntos MIX/NIX, que continham o PEG, como agente porogénico, sofreram mais um tratamento: a extracção do polietilenoglicol.

Após a extracção do TAP por Soxhlet, os xerogéis nos papéis de filtro secos eram colocados em tubos de plástico com uma solução de amoníaco 1,00 mol/L a cobri-los totalmente. Estes tubos colocavam-se num banho termostático a uma temperatura de 60°C (cabeça de aquecimento GRANT, Tipo KM) durante 6 horas. Contudo, a solução de amoníaco era trocada após 3 horas de banho.⁶⁸

No final do banho, os papéis de filtro com os xerogéis eram colocados a secar numa estufa a 60°C durante 2 horas. O pó obtido era colocado em frascos de vidro e devidamente pesado.

○ Tratamento de Calcinação e Silanização

Os conjuntos MIX/NIX 4 a 7 foram submetidos a três tipos diferentes de tratamento. Além de um grupo produzido pelos procedimentos descritos anteriormente, produziram-se dois novos grupos que sofreram o tratamento de Calcinação e de Silanização.

→ Tratamento de Calcinação

O pó, obtido por maceração, era colocado em cadinhos de porcelana e levado para uma mufla. Esta era colocada a 100°C durante 1 hora e depois a temperatura era aumentada para os 400°C, onde permanecia por 5 horas.⁶⁹⁻⁷³

Todos os pós calcinados sofreram uma alteração na cor. A sua cor branca passou para cinza-acastanhado.

O pó obtido era, então, pesado e colocado em frascos de vidro.

→ Tratamento de Silanização

A massa de pó seco obtido, após a extracção por Soxhlet e/ou extracção de PEG, devidamente pesada em frasco de vidro era colocada em agitação com um determinado volume de metoxitrimetilsilano (MOTMS), no agitador de vórtice a 400 rpm durante 24 horas. Para cada 0,100 g de pó de xerogel misturaram-se 0,550 mL de MOTMS.⁷³

O pó era recuperado por filtração, lavando-se com metanol. Colocava-se na estufa a 60°C durante 3 horas. Posteriormente era pesado e colocado em frascos de vidro.

Todos os pós obtidos mantiveram a sua aparência inicial, a cor branca.

2.2.3 Preparação dos cartuchos de SPE com os Xerogéis produzidos

Em cartuchos de SPE de 6 mL da Supelco foi empacotada uma massa de 0,500 g para todos os conjuntos MIX/NIX, excepto os conjuntos MIX/NIX 4 a 7 obtidos pelos tratamentos de calcinação e silanização, em que se empacotaram 0,400 g.

No fundo do cartucho colocava-se um *frit* (*frits* de polietileno de cartuchos de 6 mL da Supelco com uma porosidade de 20 µm) e de seguida a massa de xerogel determinada. Por cima do xerogel era então colocado outro *frit* e, com um pequeno volume de metanol e com a ajuda de um instrumento de inserção de *frits* de SPE (da Supelco), garantia-se um bom empacotamento da massa de xerogel.

Na figura 2.5 apresenta-se um exemplo de um cartucho de SPE com um xerogel empacotado tendo em conta as etapas descritas anteriormente.

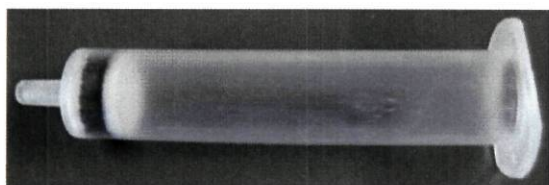


Figura 2.5 – Exemplo de um cartucho de SPE empacotado com uma determinada massa de xerogel (no caso xerogel calcinado)

2.2.4 Preparação de filmes das soluções de MIP/NIP em superfícies de titânio

○ Preparação dos substratos para a realização do *Spin-Coating*

Para realizar o *Spin-Coating* adaptou-se um eléctrodo rotativo, da Radiometer Analytical e modelo CTV 101 Speed Control Unit, com capacidade de 0 a 5000 rpm.

No Apêndice 2 encontram-se algumas considerações sobre a técnica de *Spin-Coating*.

O titânio (folha de titânio de 0,127 mm de espessura, com uma pureza de 99,7% da Aldrich) era recortado num disco de diâmetro idêntico ao eléctrodo de aço e, antes da sua utilização, sofria o seguinte tratamento:

- lavagem durante 15 minutos em água ultrapura em ultra-sons;
- imersão numa solução de NaOH 1,00 mol/L durante 1 hora;
- lavagem com água ultrapura, seguido de uma solução de HCl 0,100 mol/L, novamente lavado com água, e finalmente com etanol;
- secagem à temperatura ambiente.

As superfícies de titânio, após sofrerem o tratamento descrito, foram colocadas na cabeça do eléctrodo com cuidado evitando o mínimo contacto com a superfície onde se iria depositar o filme. De forma a realizar o *Spin-Coating* foi usada uma pasta aderente entre o aço e a superfície de titânio (figura 2.6), para garantir que a superfície de titânio não saltasse ou se virasse ao contrário destruindo o filme.

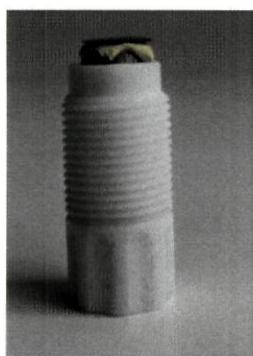


Figura 2.6 – Cabeça do eléctrodo com a superfície de titânio e a pasta aderente para a realização do *Spin-Coating*

○ Realização do processo de *Spin-Coating*

Obtiveram-se filmes por *Spin-Coating* das soluções de SG correspondentes a todos os conjuntos MIP/NIP.

O procedimento consistiu em colocar 14 μL da solução de SG respectiva no centro da superfície de titânio e permitir a rotação durante 1 minuto a 5000 rpm. Os filmes obtidos eram finos, regulares e bem espalhados.

○ Tratamento com MeOH quente e extracção de PEG

As superfícies de titânio foram colocadas em tubos PCR com MeOH e colocadas num banho a uma temperatura de 60°C durante 3 horas. No caso das superfícies de titânio com a solução de SG correspondente ao MIP/NIP 2, 3 e 7 (com PEG) foram ainda colocadas num novo tubo de PCR com a solução de NH_3 durante 15 minutos.

As superfícies de titânio eram deixadas a secar à temperatura ambiente (protegidas do pó).

○ Tratamento de Silanização

As superfícies de titânio com os filmes das soluções de SG correspondentes aos conjuntos MIP/NIP 4 a 7 foram colocadas em tubos PCR com 1,00 mL de MOTMS durante 2 horas em agitação no agitador de vórtice a 400 rpm. Finalmente, as superfícies de titânio eram lavadas com metanol e deixadas a secar à temperatura ambiente (protegidas do pó).

○ Tratamento de Calcinação

As superfícies de titânio com os filmes das soluções de SG correspondentes aos conjuntos MIP/NIP 4 a 7 foram colocadas na mufla a 100°C durante 10 minutos e, posteriormente, durante 1 hora a uma temperatura de 400°C.

2.3 Avaliação dos MIX/NIX produzidos como sorventes de SPE

2.3.1 Procedimento de SPE realizado nos cartuxos produzidos

Os cartuchos de SPE com os sorventes MIXs e NIXs produzidos sofreram um tratamento muito semelhante ao tratamento convencional dos 4 passos básicos de SPE apresentado anteriormente (subcapítulo 1.3.1). Uma vez que todos os estudos realizados foram com soluções padrão de CAP, após a retenção passou-se directamente para a eluição, seguido de uma limpeza do enchimento, para o caso de existir CAP retido que não tivesse sido eficientemente eluído. Não foi efectuado o passo de lavagem da coluna uma vez que não existiam espécies interferentes nas soluções utilizadas.

A avaliação de eficiência dos cartuchos produzidos com todos os MIXs e NIXs foi realizada imediatamente após a sua manufacturação.

Assim, o procedimento padrão para avaliar os xerogéis produzidos foi:

- **Condicionamento do enchimento:** fez-se passar 1,00 mL metanol e, sem deixar secar, passou-se 1,00 mL de solvente da solução carga;
- **Retenção:** sem deixar secar o enchimento, passou-se 1,00 mL da solução carga a um fluxo de aproximadamente 0,500 mL/min;
- Deixou-se secar por 5 minutos em vácuo;
- **Eluição:** passou-se 1,00 mL de metanol, e após um ligeiro vácuo, fez-se passar mais 1,00 mL de metanol;
- **Limpeza do enchimento:** fez-se passar 5,00 mL de metanol lentamente, seguido de um pouco de vácuo.

É de referir que, antes de realizar o procedimento de SPE descrito, fez-se passar, por todos os cartuchos de SPE manufacturados, 1,00 mL de metanol recolhido e analisado, com o intuito de verificar se existia libertação de TAP. Caso tal se verificasse o MIX em questão era lavado com metanol até que a área do pico cromatográfico correspondente ao TAP fosse não quantificável.

Uma solução padrão de CAP 1000 µg/mL, diluída em metanol, era preparada mensalmente e guardada no frigorífico. As diluições dessa solução eram efectuadas apenas aquando do seu uso.⁴⁵ Essas soluções, as soluções carga de SPE, tinham a concentração de 1,00 µg/mL.

Utilizaram-se três soluções carga diferentes:

1. solução de CAP diluída em água ultrapura (100% H₂O);
2. solução de CAP diluída numa proporção volúmica 50:50 em água ultrapura e MeOH (50% H₂O:50% MeOH);
3. solução de CAP diluída numa proporção volúmica 10:90 em água ultrapura e MeOH (10% H₂O:90% MeOH).

Todos os volumes passados pelos cartuchos foram devidamente recolhidos. O procedimento de SPE descrito anteriormente foi realizado com a ajuda de um sistema de SPE em vácuo (Lichrolut Solid Phase Extraction Vacuum Manifold da Merck e bomba de vácuo da VWR).

2.3.2 Detecção e quantificação do CAP por HPLC-UV

Todas as fracções recolhidas anteriormente foram analisadas por Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência com detecção espectrofotométrica.

A solução carga, solução de CAP, possuía uma concentração de 1,00 µg/mL pois foi a menor concentração para a qual se obtinha um pico cromatográfico bem definido, apesar das condições cromatográficas utilizadas permitirem a detecção do CAP a concentrações menores.

○ Condições Cromatográficas

O eluente utilizado foi uma mistura de H₂O:MeOH, na proporção volúmica (%) de 60:40.^{45,49,50,74} Antes da sua utilização este era devidamente desgaseificado em ultra-sons.

Todas as análises cromatográficas foram realizadas a um fluxo de 0,800 mL/min no modo isocrático.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna de fase reversa Alltima HP C₈ da Alltech (150 x 4,6 mm, 3 µm de diâmetro das partículas e tamanho do poro de 190 Å), a pré-coluna cromatográfica foi Alltima HP C₈ da Alltech (modelo Guard 7,5 x 4,6 mm, e 5 µm de diâmetro das partículas) e a seringa de injeção utilizada era da Hamilton 710 NR com 100 µL de capacidade.

Utilizaram-se dois comprimentos de onda de detecção, 270 e 224 nm, que são os comprimentos de onda em que o cloranfenicol e o tianfenicol apresentam uma absorção máxima, respectivamente.

O HPLC-UV utilizado foi da Perkin Elmer, figura 2.7, cujas características se encontram apresentadas na tabela 2.3.



Figura 2.7 – HPLC-UV utilizado

Tabela 2.3 – Características do HPLC-UV utilizado

Bomba	Series 200 Pump da Perkin Elmer
Detector	Series 200 UV/Vis Detector da Perkin Elmer
Interface	Data Handling System dot Link da Perkin Elmer
Injector	Modelo 7125, com um <i>loop</i> de 20 μ L, da Rheodyne
Software	TotalChrom Navigator

2.4 Medição dos ângulos de contacto das superfícies de titânio preparadas

Os ângulos de contacto foram obtidos em diferentes etapas, nomeadamente:

- após a obtenção do filme;
- após o tratamento com MeOH quente e extracção de PEG quando necessário;
- após o tratamento de silanização;
- após o tratamento da calcinação.

O aparelho utilizado possuía uma lente Olympus DF Plan 1X e uma câmara Panasonic CCTV, modelo WV-BL200/B.

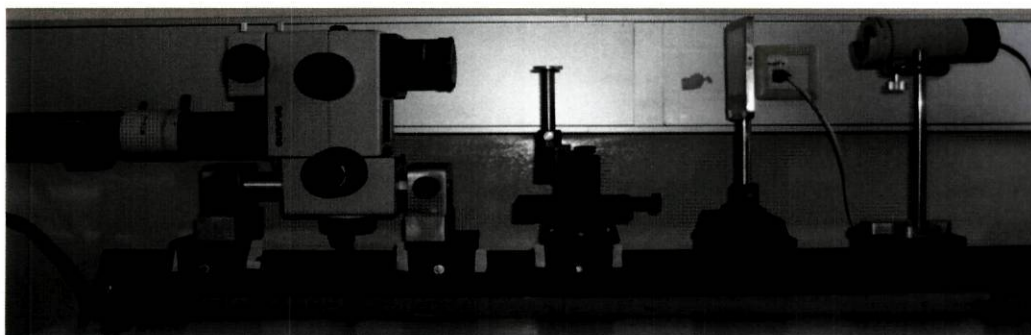


Figura 2.8 – Aparelho utilizado na medição dos ângulos de contacto

O programa utilizado para capturar a imagem da gota de água na superfície de titânio foi o Optimas v.4.01. O ângulo de contacto foi obtido através do programa Image J. Para tal utilizou-se o transferidor do programa, e mediu-se o ângulo que a gota adquiriu em contacto com a superfície de titânio.

2.5 Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com Refletância Total Atenuada (ATR) dos Xerogéis produzidos

Os espectros de FTIR-ATR foram obtidos entre $1400-600\text{ cm}^{-1}$, com o espectrofotômetro Bruker Tensor 27, com uma resolução de $2,00\text{ cm}^{-2}$ e com a colecção de 100 *scans*.

Foram realizados espectros para os MIPs 4 a 7, 2 meses após a produção e 2 meses após terem sido calcinados e silanizados.

2.6 Análise por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) dos Xerogéis produzidos

Foi seleccionado um conjunto de xerogéis que foram analisadas no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) utilizando a Microscopia Electrónica de Varrimento Ambiental em alto vácuo, de alta resolução, com Microanálise por Raios X. O microscópio utilizado foi o FEI Quanta 400FEG / EDAX Genesis X4M, com uma resolução de 1,20 nm.

Esses xerogéis foram colados num suporte de amostra para SEM com uma fita dupla face (figura 2.9). Na análise das amostras utilizou-se o processo de pulverização a revestir as amostras, para criar um fino filme de ouro, tornando as amostras condutoras.

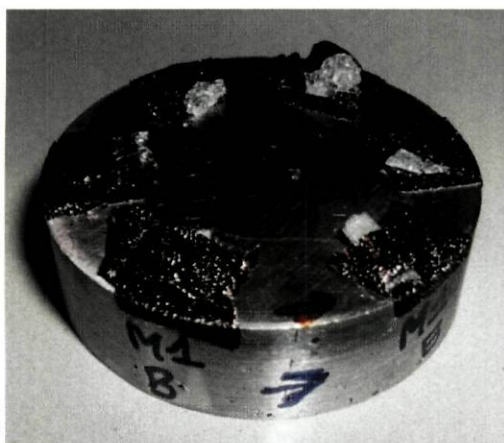


Figura 2.9 – Suporte da amostra para o SEM após tratamento da amostra.

Capítulo 3

Apresentação de

Resultados e Discussão

Capítulo 3 – Apresentação de Resultados e Discussão

3.1 Obtenção da mistura reaccional inicial de SG

O objectivo do trabalho experimental era desenvolver um MIP selectivo a cloranfenicol, que utilizasse a técnica de polimerização de SG. Era necessário encontrar o MF que criasse com o CAP o complexo MF-CAP mais estável, através de uma Impressão não-covalente.

O UPTMOS foi o monómero funcional escolhido através de um estudo computacional, que contemplou os seguintes monómeros: carboxietiltrimetilsilano, [3-(fenilamino)propil]trimetoxisilano, (pentafluorofenil)trietoxisilano, aminotrimetoxisilano, ácido 3-(triidroxixisil)-1-propanesulfónico, tetrametoxisilano, e o ureidopropiltrimetoxisilano (UPTMOS). Esse estudo de modelação molecular aplicou cálculos *ab-initio* Hartree-Fock com correcção BSSE (*Basis Set Superposition Error*), visando a determinação do complexo mais estável entre a molécula alvo e o monómero funcional. Um estudo computacional com o mesmo propósito havia sido já realizado no grupo de investigação, tendo-se verificado que a escolha do MF adequado tem uma grande influência na capacidade de impressão dos xerogéis produzidos. Mais detalhes sobre o método encontram-se no trabalho de Azenha *et al.*⁷⁵.

As ligações não-covalentes que acontecem entre o MF e o CAP são, essencialmente, pontes de hidrogénio, podendo ocorrer eventualmente interacções de van der Waals (dipolo-dipolo induzido). Presume-se que as ligações por pontes de hidrogénio ocorram como demonstrado na figura 3.1, uma vez que esta é a disposição encontrada como a mais estável para o complexo UPTMOS-CAP. Contudo a disposição das moléculas (MF e CAP) na rede polimérica não é conhecida podendo ocorrer outras interacções.

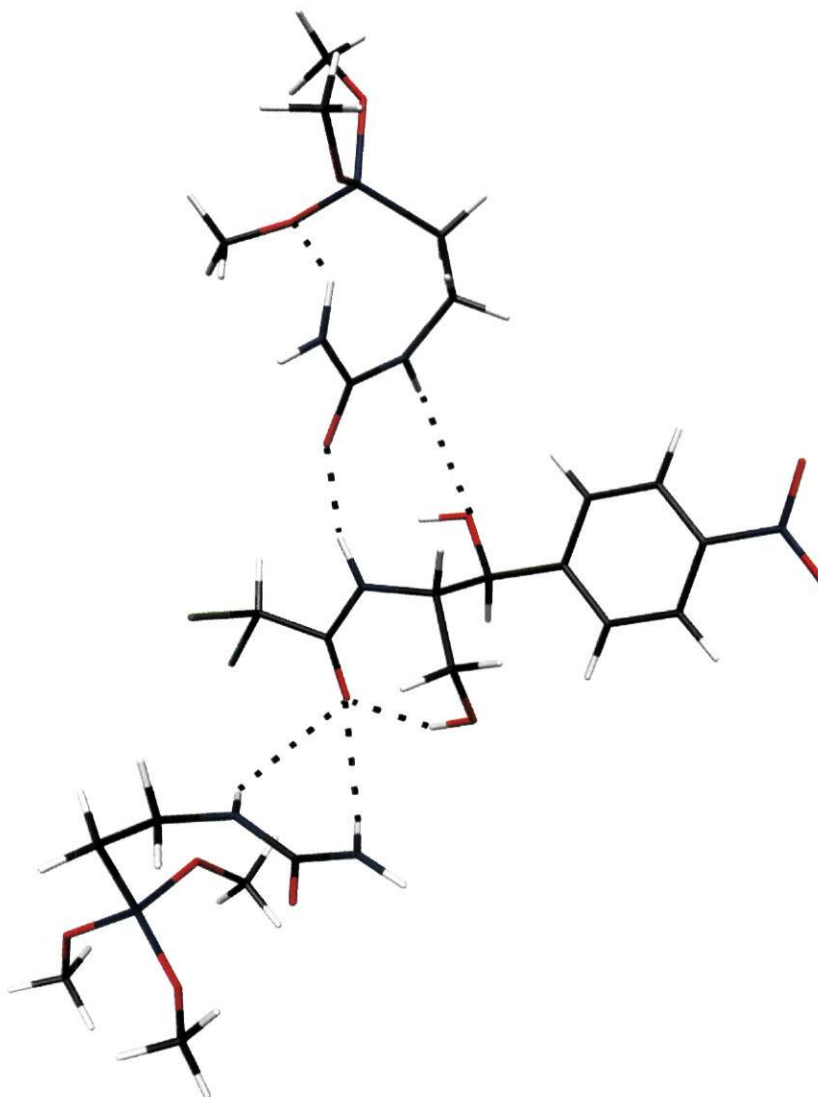


Figura 3.1 – Esquema da possibilidade de ligação de uma molécula de CAP com duas moléculas de UPTMOS
Legenda: Carbono – cinzento; Cloro – verde; Hidrogénio – branco; Oxigénio – vermelho; Silício – azul claro; Azoto – azul-escuro.

A escolha dos restantes reagentes, nomeadamente o tetrametoxisilano, metanol, ácido trifluoroacético, teve como base trabalhos laboratoriais semelhantes (Azenha *et al.*⁷⁵), ou seja, cujo objectivo principal era a obtenção de Polímeros de Impressão Molecular como sorventes de SPE. O TMOS é um dos silanos mais utilizados como agente de entrelaçamento. O metanol também é um dos co-solventes mais utilizados nas misturas de SG. O TFA é um ácido carboxílico reactivo, funcionando como um bom catalisador em reacções de polimerização e condensação. Sob catálise ácida a hidrólise acontece mais rapidamente e a condensação ocorre preferencialmente entre os grupos silanol (Si-OH) localizados nos monómeros e no final dos polímeros.⁷⁶ A proporção molar H₂O:Si inicial foi de 5:1 com o intuito de permitir uma hidrólise mais rápida e completa, assim como a dissolução do polietilenoglicol (PEG) na mistura reaccional.

O tamanho dos poros e as propriedades mecânicas dos géis podem ser variados com a adição de PEG (H-[O-CH₂-CH₂]_n-O-H) ao sol. Além de macroporos, os xerogéis preparados com PEG também exibem porosidade texturada originada dos vazios entre as partículas primárias de sílica que formam a fase de sílica gel.⁶⁸

Os poros podem ser divididos em microporos, com tamanho inferior a 2 nm, mesoporos, com tamanho entre 2 – 50 nm, e macroporos, com tamanho superior a 50 nm. Aplicações práticas requerem materiais mesoporosos contendo estruturas de poros hierárquicos a diferentes comprimentos de escala com o intuito de atingir funções altamente organizadas, uma vez que a limitada difusão de substratos confinados a nanocanais pode ser um problema. Do ponto de vista de aplicações, os locais activos geralmente estão localizados em micro e mesoporos, enquanto os macroporos favorecem a transferência de massa e reduzem as limitações de transporte. Tal é particularmente importante para moléculas largas e em sistemas viscosos, onde a taxa de difusão é baixa. De forma a melhorar o comportamento dessas aplicações, tais materiais devem possuir macroporos ajustáveis e bem definidos, tipos de mesoporos de diferentes tamanhos interconectados nas paredes dos macroporos. Em todo o polímero, os poros largos devem ser ligados por poros mais pequenos. Assim, existe o desafio de fabricar materiais hierárquicos com controlo individual do tamanho e estrutura dos poros.⁷⁷

Outra função do PEG é servir como agente de *molecular crowding*, ou seja, ocupar uma grande parte do volume da mistura, podendo alterar a difusão, hidratação e outras propriedades das restantes moléculas em solução. Estudos recentes demonstraram que *molecular crowding* em células biológicas afecta a estabilidade de estruturas ordenadas de biopolímeros e promove a associação de biomoléculas.⁷⁸ Matsui *et al.*⁷⁸ consideraram que *molecular crowding* pode contribuir para a formação do complexo MF-molécula molde ao ajudar na aproximação dos dois compostos, promovendo assim uma Impressão Molecular mais eficiente.

Um problema comum nos MISPE é o facto da molécula molde ficar fortemente ligada ao xerogel após extração. Usualmente mais do que 1% da quantidade da molécula molde fica retida e continua ligada mesmo após uma lavagem cuidadosa do xerogel. Tal pode não constituir um problema quando o xerogel é usado em catálise, mas quando o material é para ser usado na preparação de amostras para a quantificação analítica de baixas concentrações de analito, o facto de se libertarem resíduos da molécula molde que ficou retida poderá provocar falsos resultados. Uma forma de contornar este problema é aquando da preparação do polímero, utilizando como molécula molde, na impressão, não o analito/molécula alvo em questão mas uma molécula análoga.³⁵ No caso em questão a molécula molde utilizada foi o tianfenicol (TAP). Esta abordagem foi já utilizada para a preparação de MIPs acrilatos comerciais para determinação de CAP.⁷⁹

3.2 Apresentação dos resultados da avaliação de eficiência dos conjuntos MIX/NIX produzidos como sorventes de SPE

3.2.1 Resultados preliminares (conjuntos MIX/NIX 1 a 3)

Após a obtenção dos cartuchos de SPE com os conjuntos MIX/NIX 1 a 3 avaliou-se a sua eficiência ao fazer passar uma solução carga de CAP de 1,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 100% H_2O . O procedimento de SPE referido foi realizado consecutivamente 3 vezes ($n=3$) para todos os conjuntos MIX/NIX produzidos no trabalho experimental.

Os resultados obtidos com os cartuchos de SPE MIX/NIX 1 encontram-se exemplificados na figura 3.2.

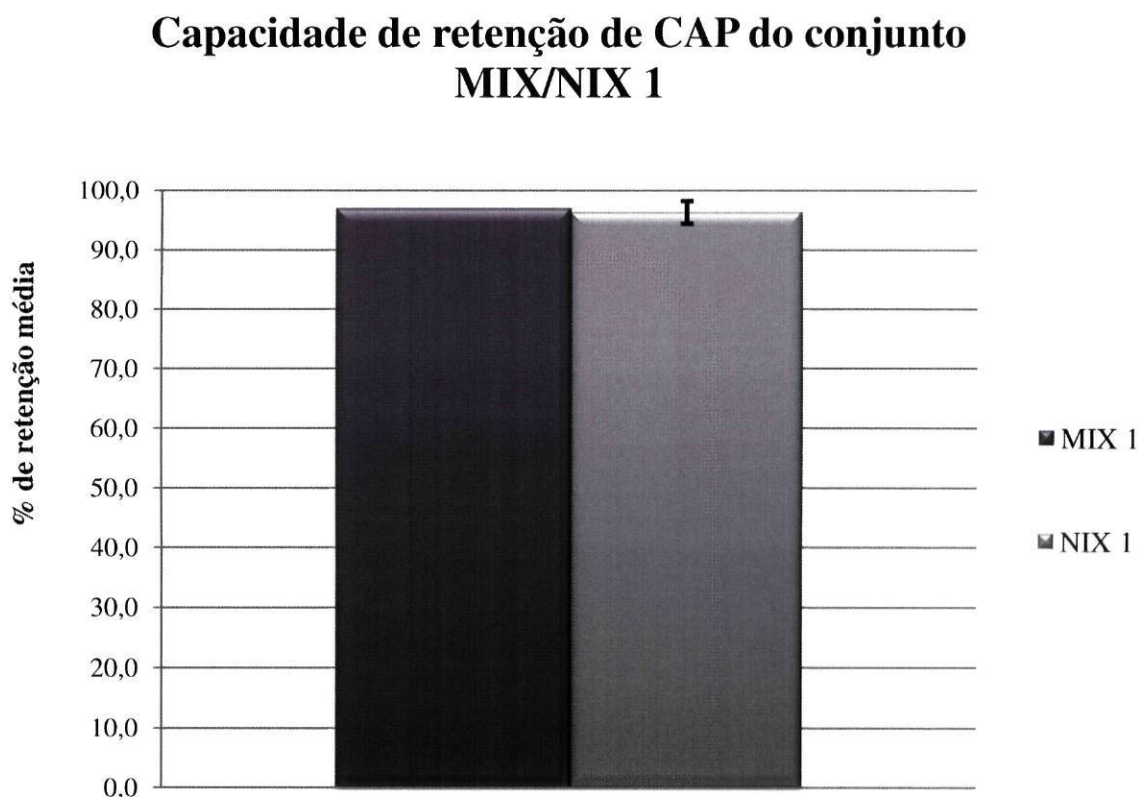


Figura 3.2 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 1 para $n=3$
*solução SG 1 com $\text{H}_2\text{O}:\text{Si}$ 5:1, UPTMOS, TMOS, TFA e MeOH

Os resultados foram obtidos por análise do cromatograma da solução carga de CAP de 1,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e do cromatograma do volume recolhido após a etapa de retenção. Assim, a área do pico cromatográfico do cromatograma do volume recolhido após a etapa de retenção corresponde à área de CAP não retido (% de não retenção). A diferença de valores é a % retida de CAP no xerogel produzido. Na figura 3.3 encontram-se os cromatogramas exemplificativos obtidos para a solução carga e para o eluato de um cartucho de SPE com um MIX produzido neste trabalho.

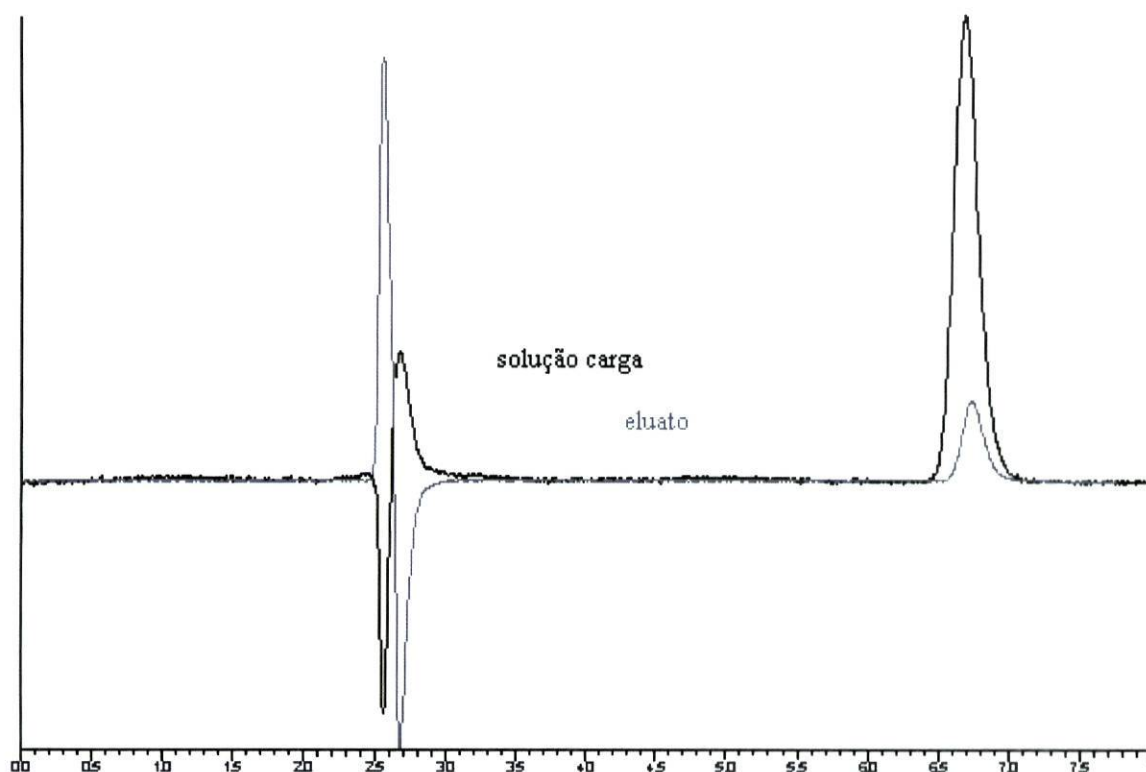


Figura 3.3 – Cromatogramas exemplificativos obtidos para a solução carga e para o eluato de um cartucho de SPE de um MIX produzido neste trabalho (Eixo X = tempo de retenção/minutos)

Analisando os resultados apresentados (figura 3.2) verifica-se que não existe diferença significativa na capacidade de reter o CAP para os cartuchos de SPE MIX e NIX 1, sendo que os dois foram capazes de o reter praticamente na totalidade. O facto de o MIX 1 e NIX 1 possuírem ambos grande afinidade ao CAP pode dever-se a ligações por pontes de hidrogénio, e/ou interacções dipolo-dipolo existentes entre a molécula de CAP e a rede polimérica com grupos silanol residuais, não salientando qualquer efeito de impressão. O facto de os xerogéis apresentarem a mesma capacidade de retenção também pode dever-se a uma elevada compatibilidade entre as moléculas de CAP e o sistema poroso que os géis apresentavam, pelo que o CAP pode ter ficado retido na malha porosa dos xerogéis.

Xerogéis dos MIP e NIP 1 foram analisados por SEM (Microscopia Electrónica de Varrimento), cujos resultados estão apresentados nas figuras 3.4 e 3.5.

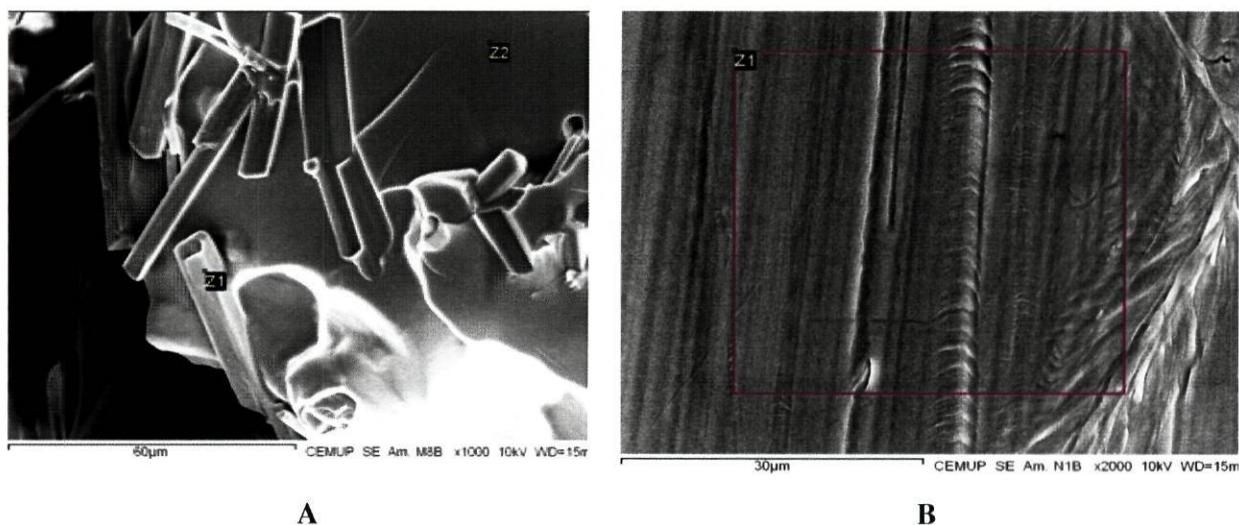


Figura 3.4 – Imagens obtidas por SEM. A – superfície do xerogel MIP 1; B – superfície do xerogel NIP 1

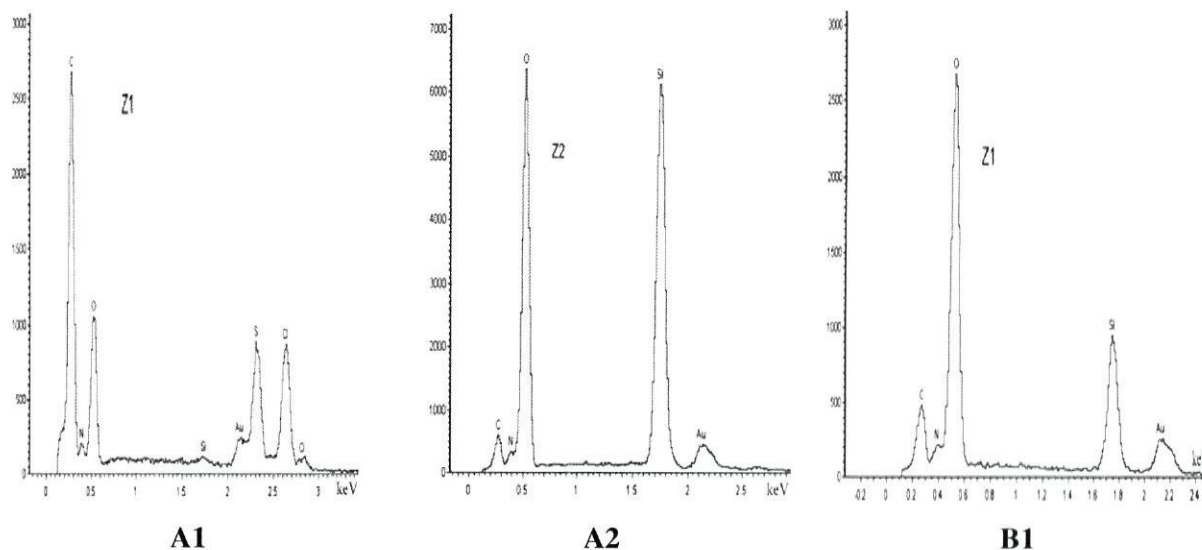


Figura 3.5 – Espectros EDXS obtidos das imagens SEM anteriores. A1 – espectro EDXS da zona marcada como Z1 na figura 3.3A; A2 – espectro EDXS da zona marcada como Z2 na figura 3.3A; B1 – espectro EDXS da zona marcada como Z1 na figura 3.3B (EDXS – Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios X – técnica que permite a identificação dos elementos químicos à superfície de uma amostra)

Na figura 3.4 é possível observar na superfície do xerogel MIP 1 aglomerações de forma geométrica regular com aspecto de cristal. Pelo espectro EDXS A1, da figura 3.5, devido à presença de átomos de enxofre e cloro, pode dizer-se que é o tianfenicol, uma vez que foi a única espécie da mistura reaccional que continha estes átomos. A imagem obtida mostra que o TAP foi forçado a deslocar-se para a superfície da rede polimérica separando-se da fase de gel, não podendo ter ocorrido a Impressão Molecular em extensão apreciável.

Várias características das estruturas da molécula molde determinam a força e a selectividade de um local de impressão. Em certos casos, estes factores são interdependentes e a sua importância pode variar dependendo de outros factores, tais como o meio onde ocorre a ligação e a temperatura.⁸⁰

Zhang *et al.*⁸¹ demonstraram que a contribuição mais significativa para o reconhecimento molecular na impressão polimérica se encontra baseada na força da pré-polimerização na formação do complexo MF-molécula molde. Quando realizaram a impressão de uma série de ácidos hidroxibenzóicos estruturalmente relacionados, descobriram que a capacidade do MIP realizar reconhecimento molecular baseado em pontes de hidrogénio diminuía com moléculas alvo capazes de formar pontes de hidrogénio intramoleculares. Aliás, em certos casos não é observada a produção de qualquer efeito de impressão.

Shin e Kim⁸² apresentaram um trabalho sobre tianfenicol no qual obtiveram cristais prismáticos e transparentes de tianfenicol de forma ortorômbica, através da evaporação lenta de TAP numa solução de etanol à temperatura ambiente. Os cristais de TAP não formavam pontes de hidrogénio intramoleculares e o grupo propanediol encontrava-se completamente estendido na molécula de TAP. Contudo, os cristais eram formados devido às moléculas de TAP estarem ligadas por uma rede tridimensional de pontes de hidrogénio.

Observando a figura 3.4 e considerando o trabalho de Shin e Kim pode-se dizer que a mistura reaccional SG 1 não possuía o ambiente químico necessário com o qual o TAP tivesse afinidade e realizasse ligações não-covalentes com o MF, levando a uma agregação e migração do TAP (separação da fase de gel) para a superfície do xerogel, criando os cristais visíveis.

O espectro da zona A2 da figura 3.5 é muito semelhante ao espectro da zona B1 do xerogel NIP 1. Se considerar que a maior parte da quantidade de TAP incluído na mistura reaccional foi para a superfície do xerogel, após a extracção por Soxhlet, os MIX e NIX obtidos seriam praticamente iguais.

Tendo em conta a mistura reaccional SG 1 prepararam-se outros conjuntos MIP/NIP que incluíam na mistura um agente porogénico de elevada massa molecular, o polietilenoglicol. O PEG utilizado nestes conjuntos possuía uma massa molar de 35000. O porogénico a utilizar teria que ser hidrofílico e solúvel em água, características do PEG.

A massa molecular do PEG e a sua quantidade em solução afecta a capacidade de adsorção alterando a estrutura dos poros, pelo que inicialmente se prepararam outros conjuntos de polímeros no qual se variaram a massa molar e a massa colocada na mistura reaccional. As variações referidas foram efectuadas na solução de SG 1, na qual em vez de PEG 35000, se colocaram 1,20 g de PEG 6000, 0,400 g de PEG 6000 e 0,400 g de PEG 1000. O objectivo seria encontrar a massa molar e a proporção molar correcta que permitisse a melhor difusão das moléculas de CAP pelos poros do xerogel produzido e que, consecutivamente, permitiria a passagem por uma maior área superficial do xerogel contribuindo para maiores probabilidades de re-ligações não-covalentes.

A extração de PEG utilizando uma solução quente de amoníaco (pela quebra das pontes de hidrogénio) foi a opção tomada, pois permite uma reorganização estrutural da rede de polisiloxanos fornecendo estabilidade química e mecânica à estrutura do poro.^{83,84}

A figura 3.6 demonstra os resultados obtidos na avaliação da eficiência dos cartuchos de SPE produzidos com o MIX e NIX 2 e 3.

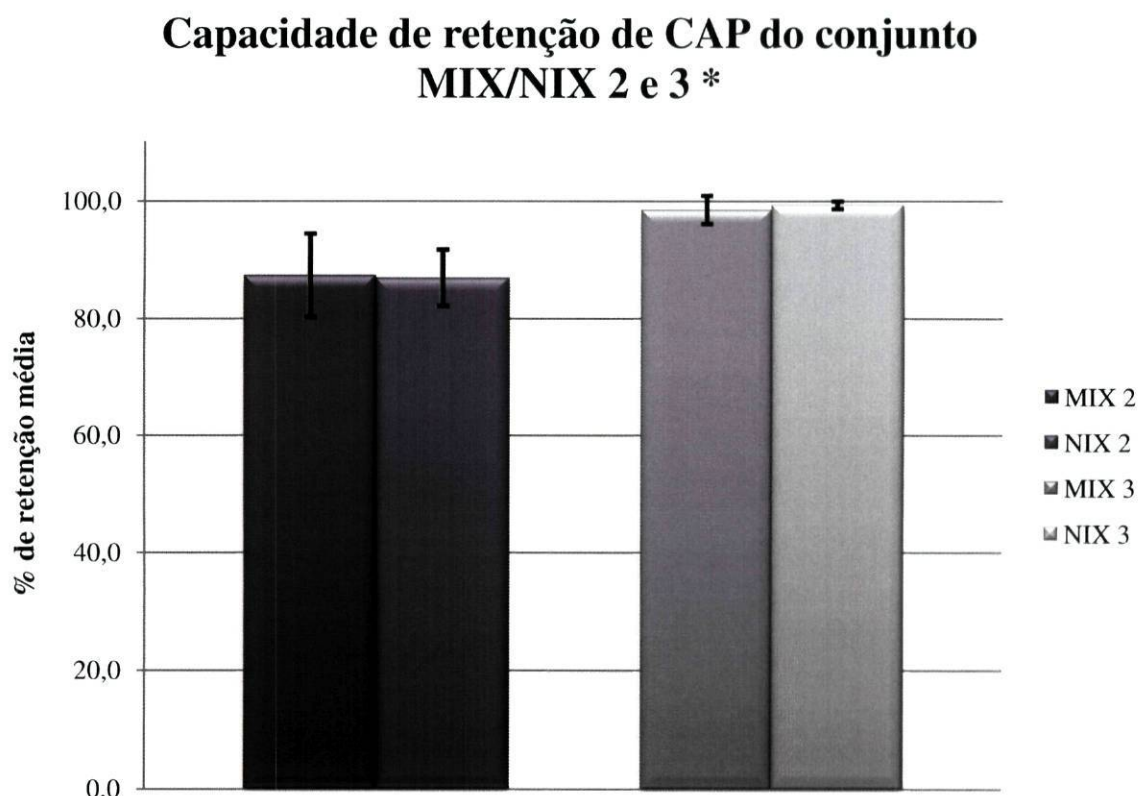


Figura 3.6 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 2 e 3 para n=3
*solução SG 2 com H₂O:Si 5:1, PEG 35000, TMOS, TFA e MeOH; solução SG 3 com H₂O:Si 5:1, PEG 35000, UPTMOS, TMOS, TFA e MeOH

Na avaliação de eficiência destes conjuntos de MIX e NIX, no passo de retenção só foi utilizada a solução 100% H₂O. Também com estes conjuntos não existem diferenças expressivas nas capacidades de retenção entre o MIX e o NIX correspondente.

Relembrando, a diferença entre o MIX/NIX 1 e o MIX/NIX 3 é a inclusão do PEG 35000. Contudo, ao contrário do esperado não se observou diferença nas % de retenções. No MIX/NIX 2 não foi incluído o monómero funcional UPTMOS, observando-se uma diminuição na % de retenção do CAP. Atendendo a estes resultados pode-se entender que o UPTMOS contribui no número de ligações entre o CAP e o xerogel. A disposição do MF na rede polimérica, que não é conhecida e pode ocorrer de forma aleatória, pode levar a uma microestrutura polimérica que favorece a formação de um maior número de locais de adsorção não específicos.

Os xerogéis dos MIP/NIP 2 e 3 foram analisados por SEM e os resultados obtidos foram em tudo semelhantes aos apresentados nas figuras 3.4 e 3.5. Ou seja, observou-se a formação de cristais de TAP nas superfícies dos xerogéis MIPs.

Além dos xerogéis MIP/NIP 1 a 3, foram também analisados por SEM os conjuntos MIX/NIX produzidos com diferentes quantidades e massa molar de PEG mencionados anteriormente. Contudo, os resultados obtidos foram os mesmos, pelo que o resto do processo de fabricação destes xerogéis, como enchimentos de cartuchos de SPE, foi abandonado.

Matsui *et al.*⁷⁸ demonstraram no seu trabalho que *molecular crowding* pode ser utilizado na síntese de sorventes de Polímeros de Impressão Molecular conferindo-lhes maior selectividade. Contudo, também afirmaram que é difícil prever quais as macromoléculas que podem ser mais adequadas para contribuir neste tipo de impressão porque a influência de cada característica dos polímeros como agentes de *molecular crowding* ainda são pouco conhecidas e percebida. Além disso *molecular crowding* em solventes orgânicos deve ser significativamente diferente de solventes aquosos.⁷⁸

Os MIXs e NIXs 2 e 3 foram produzidos sob condição de *molecular crowding*. Na presença do PEG, a mistura reaccional não mostrou um ambiente químico favorável à formação do complexo MF-TAP, pelo que o TAP continuou a interligar-se e a formar cristais na superfície dos xerogéis.

A capacidade de reconhecimento do material de Impressão Molecular é crucialmente dependente na natureza do polímero anfitrião. A maior parte dos MIPs descritos na literatura contêm locais de ligação que possuem uma grande variedade de afinidades, o que influencia fortemente os seus desempenhos. Contudo, segundo Guardia *et al.*⁸⁵, a natureza exacta do processo de reconhecimento foi mal interpretado na maioria dos casos. Guardia e colaboradores afirmaram que nenhuns dos estudos publicados na área da Impressão Molecular com matrizes híbridas orgânico-inorgânicas (SG) forneceram provas conclusivas do processo de reconhecimento.⁸⁵

Pinel *et al.*⁸⁶ utilizaram a química de SG para produzir um gel com (-)-mentol como molécula molde, mas descobriram que a adsorção não mostrava qualquer diferença entre o MIP e o NIP.

Hunnius *et al.*⁶⁹ apresentaram um trabalho em 1999 que teve como grande incentivo os diversos problemas encontrados na reprodução de resultados obtidos para a adsorção competitiva entre o (-)-borneol e o (+)-fencol. O trabalho desenvolvido consistiu numa solução reaccional primária com tretaetiletoxisilano, metiltrimetoxisilano, (-)-borniloxisilano e/ou (+)-fencilloxitrietoxisilano, ácido clorídrico e etanol, cujos polímeros produzidos não apresentaram diferenças de adsorção entre o (-)-borneol e/ou (+)-fencol, respectivamente, comparativamente com o (-)-camfor. Ao alternar factores

como a quantidade de ácido e água adicionada verificaram que a adsorção não se correlacionava com a molécula molde utilizada, mas as diferentes condições de preparação da mistura reaccional é que conduziam a diferentes selectividades, que podem ter levado a diferenças nas superfícies do gel. No referido estudo, testaram também diferentes formas de extracção da molécula molde, a calcinação, a extracção por Soxhlet e a extracção oxidativa, contudo não existiu indicação de uma correcta obtenção de adsorção selectiva.⁶⁹

3.2.2 Resultados da segunda fase do trabalho experimental (conjuntos MIX/NIX 4 a 7)

Tendo em conta os resultados obtidos surgiu a necessidade de procurar novas soluções de SG em que não ocorresse a separação de fases anteriormente verificada, pelo que se prepararam 9 novas experiências tendo como ponto de partida a mistura SG 1. Neste conjunto de experiências fez-se uma das seguintes alterações: não foi adicionada água mantendo a mesma quantidade inicial de alcóxidos de silício, alterou-se a proporção molar $H_2O:Si$ para 1:1, retirou-se o co-solvente metanol, experimentou-se o tetrahydrofurano como co-solvente e substituiu-se o TFA por NaOH.

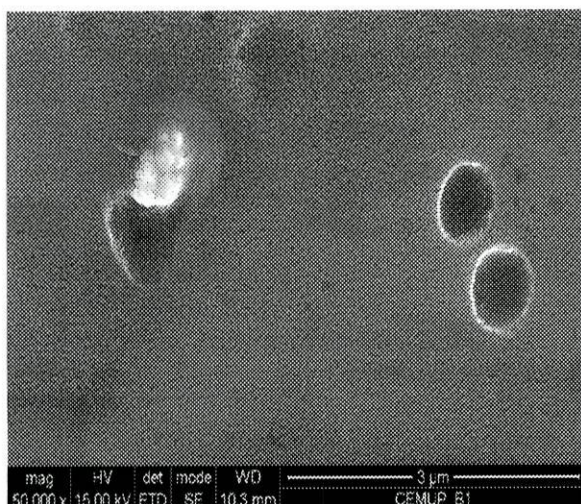
Após gelificação, os xerogéis de cada mistura foram observados no Microscópio de Polarização. Sendo uma técnica mais fácil e rápida do que o SEM, que também permite a visualização da formação de cristais na superfície do xerogel com qualidade, foi a opção para procurar novas misturas reaccionais mais promissoras. O principal factor a ter em conta para a exclusão da experiência foi a observação de cristais à superfície do xerogel. No Apêndice 3 encontra-se a descrição das experiências realizadas e excluídas na segunda fase do trabalho experimental.

Ao observar as imagens dos xerogéis obtidas por Microscopia de Polarização das experiências realizadas pode-se constatar que a quantidade molar de água foi um factor muito importante na preparação de xerogéis, ou seja, a utilização de menor quantidade água, torna o meio menos polar e consequentemente evita a separação de fases.

Desse conjunto de experiências produziu-se os conjuntos MIP/NIP designados de 4 (solução de SG igual a SG 1 mas sem adição de H_2O), 5 (solução de SG com NaOH como catalisador com proporção molar $H_2O:Si$ de 3:1), 6 (solução de SG com proporção molar $H_2O:Si$ de 1:1) e 7 (solução de SG igual a SG 6 mas com adição de PEG 6000).

Nestes conjuntos de MIP/NIP realizaram-se outros tratamentos pós-produção dos géis: a silanização e a calcinação. Experimentou-se, também, variar a constituição da solução carga utilizada na etapa de retenção.

Os xerogéis dos NIP 4, NIP 5, MIP 6 e MIP 7 foram analisados por SEM. As imagens obtidas encontram-se nas figuras seguintes.

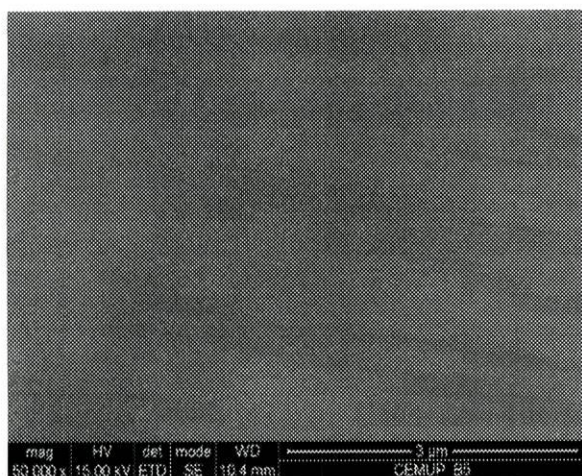


Xerogel NIP 4

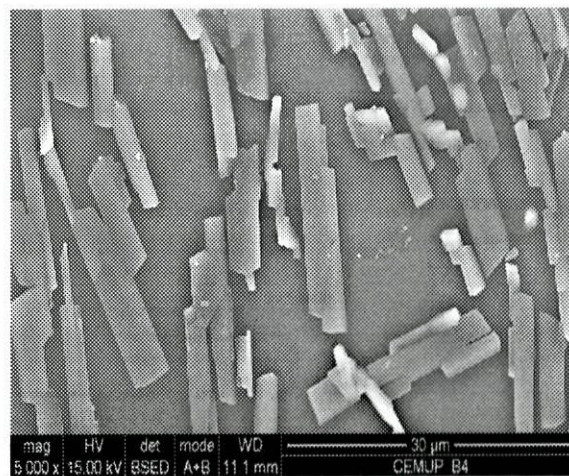


Xerogel NIP 5

Figura 3.7 – Imagens obtidas por SEM das superfícies dos xerogéis NIP 4 e NIP 5



Xerogel MIP 6



Xerogel MIP 7

Figura 3.8 – Imagens obtidas por SEM das superfícies dos xerogéis MIP 6 e MIP 7

Observando as figuras 3.7 e 3.8 o xerogel NIP 4 apresentou poros maiores na sua superfície, o que não significa que o seu interior seja mais poroso. O xerogel NIP 5 e MIP 6 apresentam superfícies mais densas. A imagem SEM do xerogel MIP 7 foi idêntica às obtidas para o grupo de xerogéis MIP 1 a 3, isto é, observou-se a presença de cristais de TAP na superfície do xerogel. Tendo em conta as observações realizadas anteriormente, pode dizer-se que a mistura reaccional com o PEG, formou um meio não favorável à realização de ligações não-covalentes do TAP com o gel, pelo que o TAP sentiu maior afinidade por ele próprio cristalizando na superfície do xerogel.

3.2.2.1 Resultados dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 com extracção da molécula molde por Soxhlet

Um dos maiores problemas da Impressão não-covalente é o facto de vários MF se encontrarem espalhados pela rede polimérica, fora das cavidades receptoras. Isto leva a muitas interacções não específicas num local entre a molécula alvo e o polímero, o que é indesejado na aplicação prática do polímero.⁸ Com este conjunto de MIXs e NIXs (excepto MIX 7 onde se observou cristais de TAP) seria de esperar que a Impressão Molecular se evidenciasse, contudo as interacções não específicas predominaram.

Para obter informações acerca do carácter hidrofílico/hidrofóbico dos xerogéis produzidos, obtiveram-se os ângulos de contacto (Apêndice 4) de superfícies revestidas com filmes de SG correspondente a cada MIP e NIP e nas diversas situações de produção dos respectivos enchimentos de SPE.

As superfícies de titânio revestidas com as misturas reaccionais testadas foram obtidas pela técnica de revestimento de *Spin-Coating*. As características microestruturais de filmes finos relativamente aos xerogéis podem ser consideravelmente diferentes mesmo quando são preparados com o mesmo sol porque na formação do filme por *Spin-Coating* a gelificação ocorre simultaneamente com a evaporação. Em geral, filmes finos são considerados menos porosos do que os xerogéis.⁷⁶ Assim a caracterização da hidrofiliicidade/hidrofobicidade por esta técnica permite obter informações sobre a tendência de molhabilidade dos xerogéis com os diversos tratamentos a que são sujeitos, mas não se pode assumir que os valores dos ângulos de contacto obtidos são os reais.

A tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos nas condições em que foram obtidos os diversos ângulos de contacto dos filmes das soluções de SG MIP/NIP 4 a 7. Os valores apresentados de ângulos de contacto correspondem à média de dois ensaios.

Tabela 3.1 – Resultados obtidos nas medições dos ângulos de contacto com filmes de SG MIP/NIP 4 a 7 em diferentes etapas de produção (n = 2)

	Após <i>Spin-Coating</i> (°)	Após a extracção por MeOH quente (°)	Após a extracção por MeOH quente/NH ₃ (°)
MIP 4	49 – 56	72	----
NIP 4	44 – 48	47 – 53	----
MIP 5	34 – 39	56 – 57	----
NIP 5	36 – 38	47 – 48	----
MIP 6	41 – 43	45 – 46	----
NIP 6	39 – 40	42 – 44	----
MIP 7	35 – 39	----	42
NIP 7	38 – 41	----	54

Ao considerar que ângulos superiores a 90° são substâncias hidrofóbicas, e ângulos de valores inferiores a 30° são hidrofílicos, estes polímeros encontram-se no meio, contudo há que ressaltar que a

extracção por Soxhlet e/ou tratamento com NH_3 tornou os polímeros menos hidrofílicos. Excepto com o conjunto MIX/MIX 7 em que o ângulo de contacto do NIX é maior, os ângulos de contacto dos MIXs apresentam sempre valores superiores ao NIX correspondente.

Os resultados obtidos para a avaliação dos sorventes de SPE produzidos com os xerogéis MIP/NIP 4 a 7 apresentam-se na figura 3.9. Numa análise geral observa-se que a capacidade de retenção do MIX foi muito semelhante ao seu respectivo NIX, sendo que na maior parte dos casos foram estatisticamente iguais. Deve-se ressaltar os casos em que a diferença entre o MIX e o seu NIX foi superior a 13%, como foi o caso do MIX 4 com a solução carga de 100% H_2O , do MIX 6 com a solução carga de 50% H_2O :50% MeOH, e do MIX 5 com a solução carga de 10% H_2O :90% MeOH. Apesar da diferença não ser muito grande foi uma indicação que pode ter existido algum efeito de impressão. O tempo de duração da etapa de retenção pode não ter sido o mais adequado para se aferir das diferenças MIX/NIX, uma vez que poderá ser muito curto para permitir uma completa difusão e adsorção nos locais de reconhecimento.

A constituição da solução carga foi alterada com o objectivo de verificar a influência da composição da solução na capacidade de retenção de CAP nos xerogéis. As alterações poderiam evidenciar o efeito de impressão e/ou diminuir as interacções não selectivas que possam ter contribuído para a retenção do CAP na matriz do polímero. Ao aumentar a % de metanol na solução carga, também se estava a alterar a polaridade da solução, tornando-a ligeiramente menos polar.

Capacidade de retenção de CAP dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 *

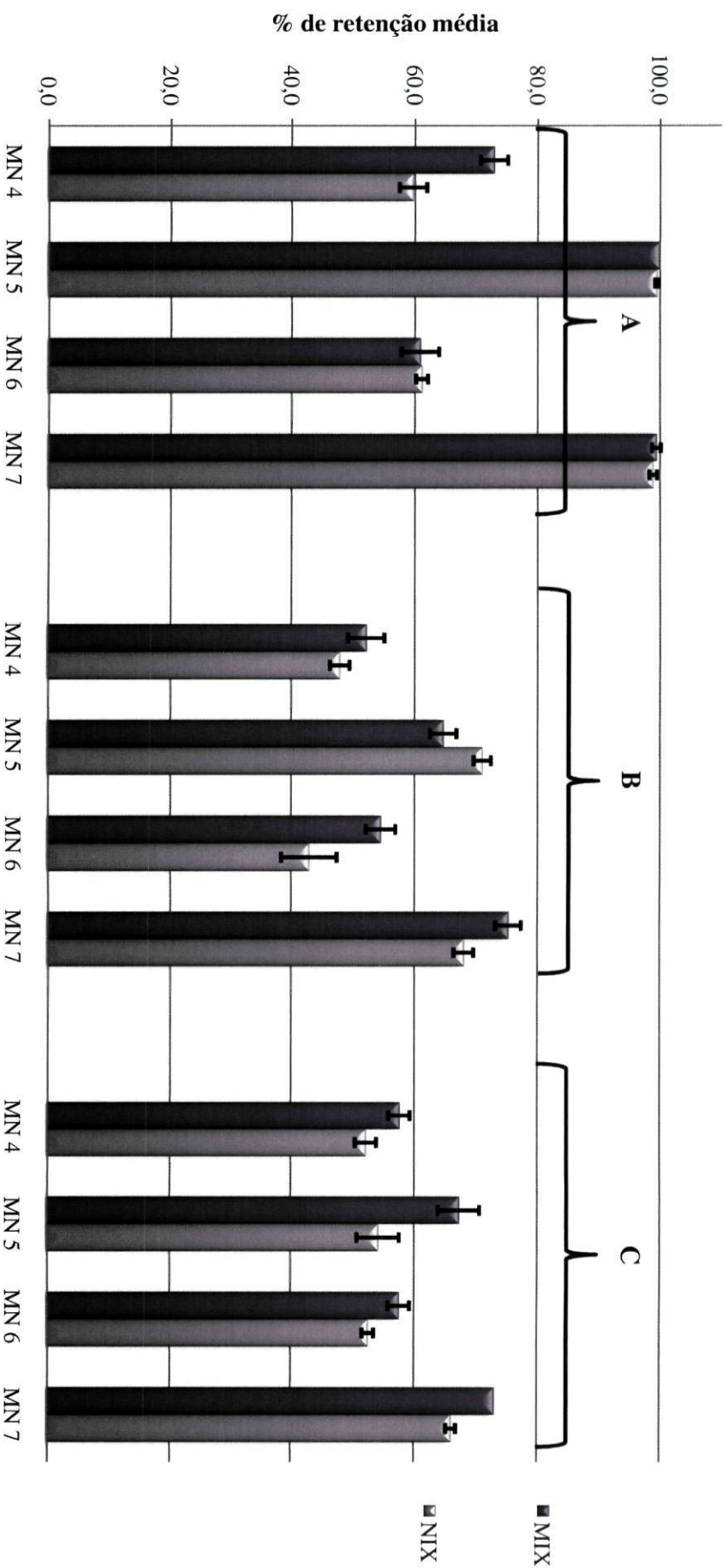


Figura 3.9 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 4 a 7, com as diferentes soluções carga (n=3)

*solução SG 4 com UPTMOS, TMOS, TFA e MeOH; solução SG 5 com H₂O:Si 3:1, UPTMOS, TMOS, MeOH e NaOH; solução SG 6 com H₂O:Si 1:1, UPTMOS, TMOS, MeOH e TFA; solução SG 7 com H₂O:Si 1:1, UPTMOS, TMOS, MeOH, TFA e PEG 6000

Legenda: A – solução carga 100% H₂O; B – solução carga 50% H₂O:50% MeOH; C – solução carga 10% H₂O:90% MeOH;

Durante a retenção, a capacidade de molhabilidade dos polímeros é favorecida com a solução carga de 100% H₂O e a possibilidade de realização de pontes de hidrogénio é favorecida por um meio menos polar. Tendo em conta estes factores, torna-se difícil prever o comportamento em termos de capacidade de retenção dos xerogéis produzidos.

Tendo em conta a tabela 3.1, como já foi referido, à medida que se aumenta a proporção molar de água na mistura reaccional dos xerogéis diminui ligeiramente a hidrofobicidade destes (excepto com o xerogel NIP 7). Contudo, os xerogéis produzidos possuem características intermédias, pelo que a capacidade de molhabilidade dos xerogéis pode ser favorecida pela água. O CAP é uma molécula pouco polar, possui aproximadamente um $\log K_{ow} = 1,15$ (coeficiente octanol-água)^{87,88}, pelo que apesar de possuir alguma característica hidrofílica, é melhor solvatado por solventes como o metanol, sendo mais retido em soluções pouco polares.

Na generalidade, verificou-se uma tendência na diminuição da capacidade de retenção não específica dos xerogéis produzidos à medida que a solução carga se torna menos polar. Esse efeito foi mais evidenciado para o MIX 5 e 7, pelo que com a solução carga menos polar conseguiram apresentar maiores diferenças entre o MIX e o seu NIX. O MIX 4 demonstrou algum efeito de impressão com a solução carga 100% H₂O. Ao alterar a solução carga deixou de se verificar o efeito de impressão, pelo que o meio polar favoreceu a retenção, onde deve ter ocorrido uma maior difusão de CAP pelo xerogel.

3.2.2.2 Resultados dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 produzidos com o tratamento de silanização

As interacções iónicas e não específicas são consideradas como as maiores desvantagens em Polímeros de Impressão Molecular, que podem ser prevenidas até uma extensão considerável pelo tratamento de silanização dos grupos silanol residuais. Considera-se que o processo de silanização utilizado fez com que grupos residuais Si-OH fossem substituídos por Si-O-Si(CH₃)₃.

Este tratamento aumenta a hidrofobicidade do polímero, mas também previne a adsorção não específica da molécula alvo, podendo assim resultar num maior factor de impressão. Os agentes de silanização mais utilizados são o clorotrimetilsilano e hexametildisilazano, cujas utilizações se encontram bem documentadas.^{73,89,90}

Na tabela 3.2 encontram-se os resultados obtidos dos ângulos de contacto dos filmes das soluções reaccionais SG MIP/NIP 4 a 7 após o tratamento de silanização. Tendo em conta a tabela 3.1 verificou-se que houve um ligeiro aumento no valor de ângulo, o que se traduz por um pequeno aumento de hidrofobicidade.

Tabela 3.2 – Resultados obtidos nas medições dos ângulos de contacto com filmes de SG MIP/NIP 4 a 7 após a silanização (n = 2)

	Após a silanização (°)
MIP 4	65 – 66
NIP 4	48 – 55
MIP 5	57 – 59
NIP 5	49 – 51
MIP 6	50
NIP 6	43 – 46
MIP 7	51 – 52
NIP 7	57 – 59

A Espectroscopia de FTIR-ATR (Apêndice 5) foi aplicada para estudar possíveis alterações nos xerogéis correspondente aos tratamentos a que foram sujeitos. Estudou-se a gama de número de onda do espectro de Infravermelho entre $1400 - 600 \text{ cm}^{-1}$, pois é onde se espera que se evidencie as alterações na rede polimérica devido a esses tratamentos.

Nas figuras 3.10 e 3.11 encontram-se os espectros de FTIR-ATR dos MIXs 4 a 6, dois meses após serem silanizados e dois meses após a preparação da mistura reaccional. A gelificação destes xerogéis ocorreu em cerca de dez dias, excepto a do MIX/NIX 5 que ocorreu em cerca de cinco dias, isto é, os espectros foram obtidos após 5 e 10 vezes o tempo de gelificação, respectivamente. Assim na gama seleccionada considera-se que apenas devem surgir bandas relacionadas com a rede polimérica de sílica.

O espectro de FTIR-ATR do MIX 7, dois meses após a preparação da mistura reaccional, não foi possível obter. Contudo o espectro obtido para o MIX 7 silanizado era idêntico ao espectro obtido com o MIX 4 silanizado.

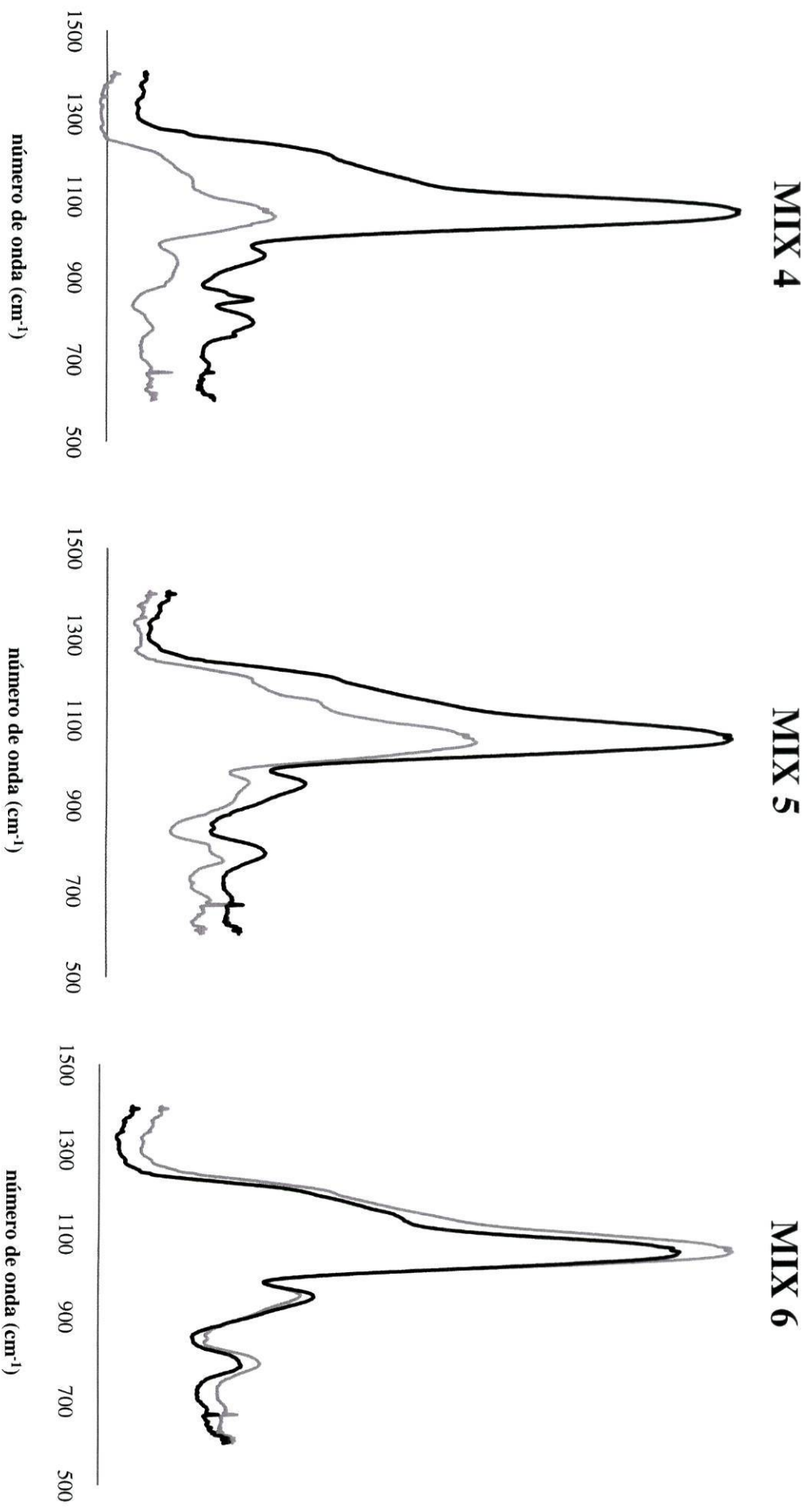


Figura 3.10 – Representação dos espectros de FTIR-ATR dos MIXs 4 a 6 retirados 2 meses após a preparação (cor lilás claro) e 2 meses após a silanização (cor preto)

Nos espectros apresentados anteriormente observa-se uma banda de intensidade significativa entre 1300 e 980 cm^{-1} relacionada com as vibrações da rede polimérica ν -(Si-O-Si), semelhante para todos os MIXs silanizados. Os MIXs não silanizados apresentaram ligeiros deslocamentos nessa banda. O aumento da frequência/nº de onda da banda referida aumenta com a diminuição da proporção água:alcóxidos de silício, correspondendo a um aumento no entrelaçamento da rede polimérica.

Seria de esperar uma diminuição na intensidade da banda entre 995 e 860 cm^{-1} atribuída às vibrações ν -(Si-OH). Tal acontece, mas em pequena dimensão, o que pode ser uma indicação que a silanização não ocorreu na extensão desejada.

No espectro obtido dois meses após a silanização do MIX 4 surge uma pequena banda ~850 cm^{-1} atribuída às vibrações ν -(Si-O-CH₃). A banda ~800 cm^{-1} atribui-se a vibrações de alongamento simétrico ν -(Si-O).⁹¹⁻⁹³

Foram produzidos sorventes de SPE dos conjuntos MIX/NIX 4 a 6 silanizados, cuja eficiência foi avaliada ao fazer passar as soluções carga 100% H₂O, 50% H₂O:50% MeOH e 10% H₂O:90% MeOH. Os resultados obtidos na avaliação da capacidade de retenção destes MIXs e NIXs encontram-se apresentados na figura 3.11.

Capacidade de retenção de CAP dos conjuntos MIX/NIX 4 a 6 silanizados *

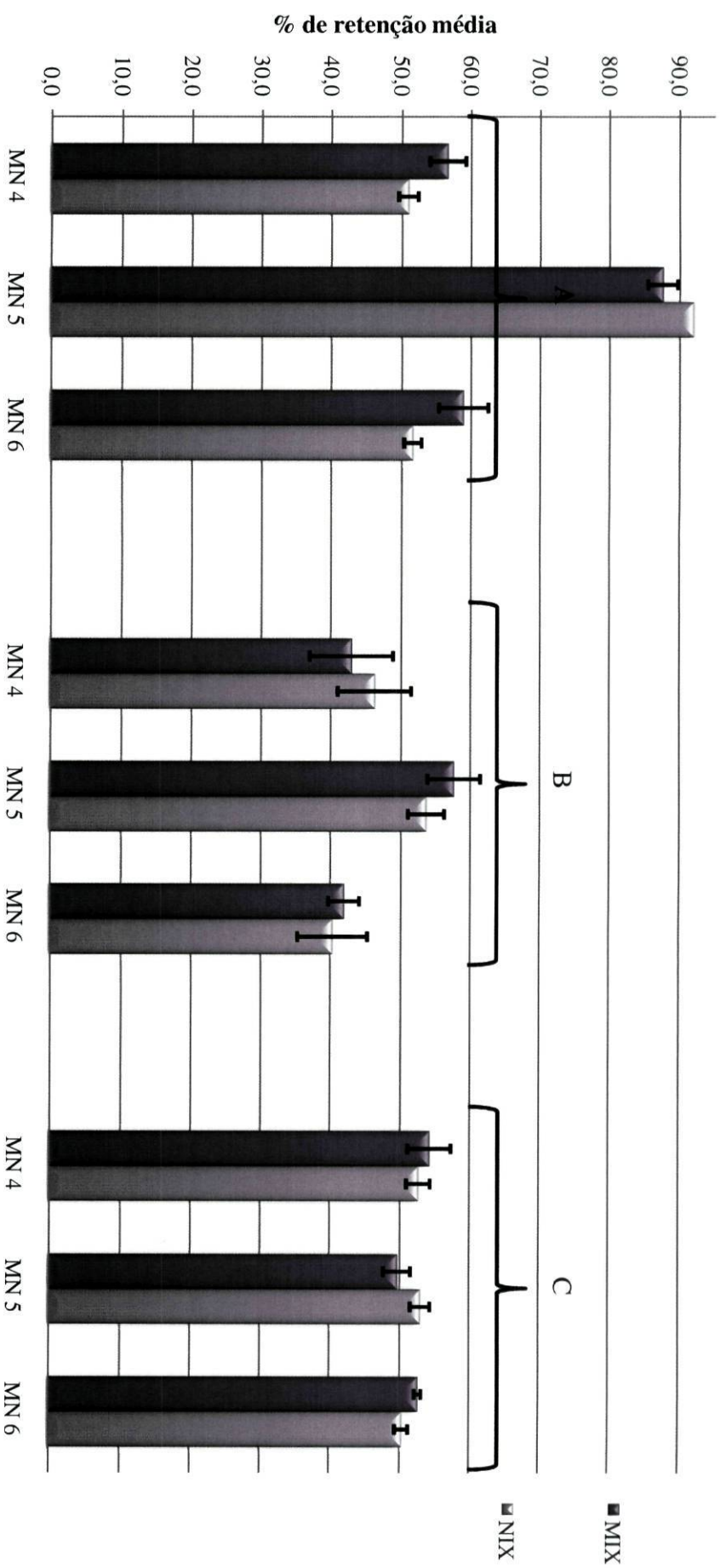


Figura 3.11 – Representação da capacidade de retenção de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 4 a 6 silanizados, com as diferentes soluções carga (n=3)

*solução SG 4 com UPTMOS, TMOS, TFA e MeOH; solução SG 5 com H₂O:Si 3:1, UPTMOS, TMOS, MeOH e NaOH; solução SG 6 com H₂O:Si 1:1, UPTMOS, TMOS, MeOH e TFA

Legenda: A – solução carga 100% H₂O; B – solução carga 50% H₂O:50% MeOH; C – solução carga 10% H₂O:90% MeOH

Observando os resultados obtidos verificou-se que a silanização não produziu os efeitos esperados. Praticamente todos os conjuntos MIXs/NIXs foram capazes de reter o CAP, no tempo de contacto utilizado, de uma forma estatisticamente igual ou muito próxima, desaparecendo as situações referidas anteriormente onde era visível algum efeito de impressão. De acordo com os resultados da caracterização de hidrofiliidade/hidrofobicidade das superfícies revestidas (tabela 3.2), a silanização promove uma ligeira tendência hidrofóbica dos xerogéis, contudo continuam a apresentar características intermédias.

Apesar de não se observar diferenças evidentes entre o MIX e o respectivo NIX houve, na generalidade, uma diminuição da % de retenção de CAP em comparação com os resultados anteriores, provavelmente devido à diminuição do número de grupos silanol residuais disponíveis. Este facto também pode ser influenciado pela quantidade de massa empacotada dos cartuchos de SPE ser menor do que nos polímeros anteriores. É de salientar que como nos resultados anteriores (3.2.3.1) o conjunto MIX/NIX 5 (com solução de NaOH) apresentou uma maior capacidade de retenção não selectiva, que diminui com a utilização de soluções cargas menos polares.

Na figura 3.12 apresentam-se os resultados obtidos na avaliação de eficiência do MIX e NIX 7 silanizado. A apresentação dos resultados deste conjunto foi separada dos outros para realçar os resultados obtidos. Ao observar a figura 3.8 seria de esperar que não se evidenciasse algum efeito de impressão pois observaram-se cristais na superfície do Xerogel MIP 7, contudo tal não foi constatado para o MIX silanizado.

Capacidade de retenção do CAP do conjunto MIX/NIX 7 silanizados *

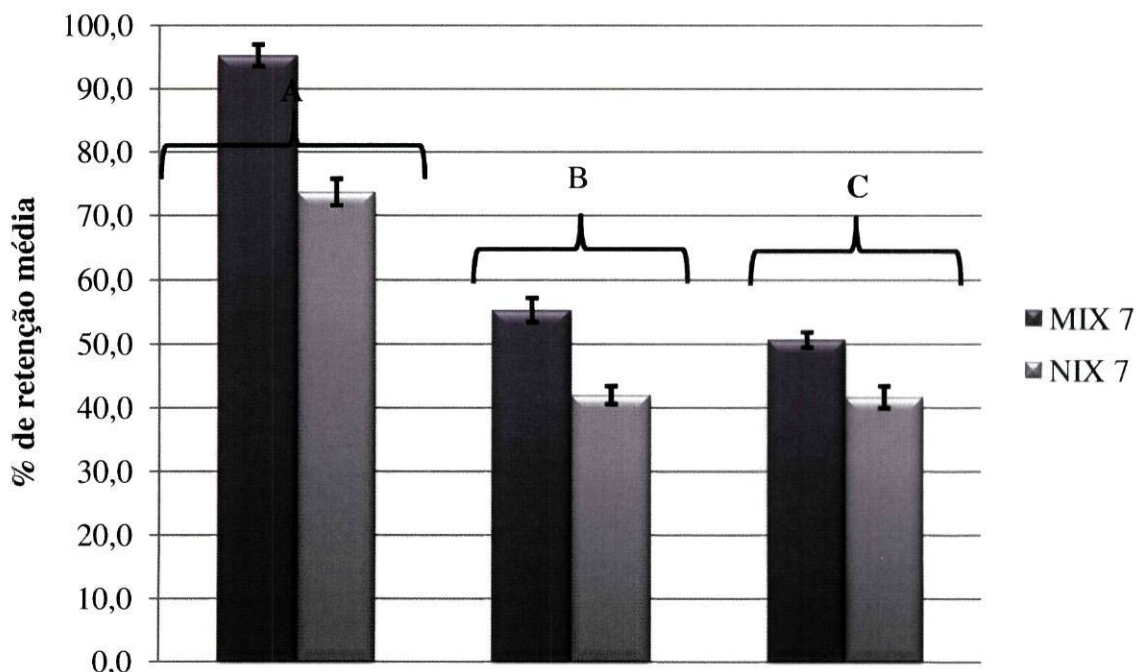


Figura 3.12 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 7 silanizados, com as diferentes soluções carga (n=3)

*solução SG 7 com H₂O:Si 1:1, UPTMOS, TMOS, MeOH, TFA e PEG 6000

Legenda: A – solução carga 100% H₂O; B – solução carga 50% H₂O:50% MeOH; C – solução carga 10% H₂O:90% MeOH

Apesar de a diferença entre MIX e NIX não ser muito grande, foram valores que levaram a considerar que existe alguma diferença entre o MIX e o respectivo NIX, nomeadamente que se verificou alguma impressão no MIX que a silanização conseguiu evidenciar. A maior diferença verificou-se com a solução carga de 100% H₂O, cerca de 22%, e diminui à medida que o meio da solução se torna menos polar (13% e 9%, respectivamente).

Esta evidência de impressão observada com este MIX pode dever-se ao facto de na sua mistura reaccional ter o PEG como agente de *molecular crowding*, pois este pode ter contribuído para uma alteração na mistura reaccional, impedindo que algum TAP não tenha cristalizado e realizasse alguma impressão que a silanização tornou identificável.

3.2.2.3 Resultados dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 produzidos com o tratamento de calcinação

A calcinação utilizada neste contexto experimental é o processo de aquecer o polímero a altas temperaturas, sem contudo atingir o ponto de fusão da rede polimérica, de forma a conseguir a decomposição química da molécula molde e consequente eliminação dos produtos voláteis.

A remoção da molécula molde por calcinação é eficaz, permitindo maior adsorção ao polímero, pois permite melhor difusão devido à porosidade obtida, isto é, uma ampla distribuição de

diferentes tamanhos de poros (micro e mesoporos). Outro ponto a favor da calcinação é que esta leva a uma diminuição no número de grupos silanol residuais.^{68,72,94}

Assim como a extração da molécula molde por Soxhlet, a calcinação é um tratamento largamente utilizado em trabalhos experimentais. Contudo, a calcinação é utilizada quando os precursores da SG são inorgânicos, isto é, quando os alcóxidos não possuem grupos orgânicos pois estes são decompostos quando sujeitos a elevadas temperaturas. No presente trabalho, o MF, UPTMOS, possui grupo funcional orgânico, pelo que não seria um tratamento a prosseguir, contudo foi realizado para estudar o efeito que poderia provocar nas ligações não específicas.

Os resultados obtidos dos ângulos de contacto dos filmes das soluções reaccionais SG MIP/NIP 4 a 7 após o tratamento de calcinação encontram-se na tabela 3.3. Com o tratamento de calcinação as superfícies de SG calcinadas tornaram-se altamente hidrofílicas.

Tabela 3.3 – Resultados obtidos nas medições dos ângulos de contacto com filmes de SG MIP/NIP 4 a 7 após a calcinação (n = 2)

	Após a calcinação (°)
MIP 4	12 – 18
NIP 4	9 – 13
MIP 5	12 – 17
NIP 5	12 – 14
MIP 6	8 – 10
NIP 6	23 – 30
MIP 7	15 – 18
NIP 7	13

Ao contrário dos resultados obtidos anteriormente para os ângulos de contacto, nas superfícies revestidas calcinadas foi a superfície MIX 6 que apresentou um valor de ângulo inferior ao seu NIX, em vez da superfície MIX 7. Estes valores são apenas indicativos, contudo, pode-se dizer que a calcinação tornou os xerogéis mais hidrofílicos.

Os espectros de FTIR-ATR dos MIXs 4 a 6 dois meses após serem calcinados encontram-se na figura 3.13, juntamente com os obtidos 2 meses após a preparação. O espectro do MIX 7 calcinado é semelhante aos restantes espectros dos MIXs calcinados obtidos, que são semelhantes entre si.

Assim como na silanização, verifica-se um aumento de intensidade da banda entre 1300 e 980 cm^{-1} relacionada com as vibrações da rede polimérica $\nu(\text{Si-O-Si})$, que como já foi referido se deve ao engrandecimento do entrelaçamento da rede polimérica. A banda entre 995 e 885 cm^{-1} , atribuída às vibrações $\nu(\text{Si-OH})$ deixou de ser perceptível, pelo que a calcinação foi eficaz na diminuição de grupos OH residuais. Observa-se também a acentuação de uma banda entre 885 e 760 cm^{-1} atribuída a vibrações de alongamento simétrico $\nu(\text{Si-O-Si})$.⁹¹⁻⁹³

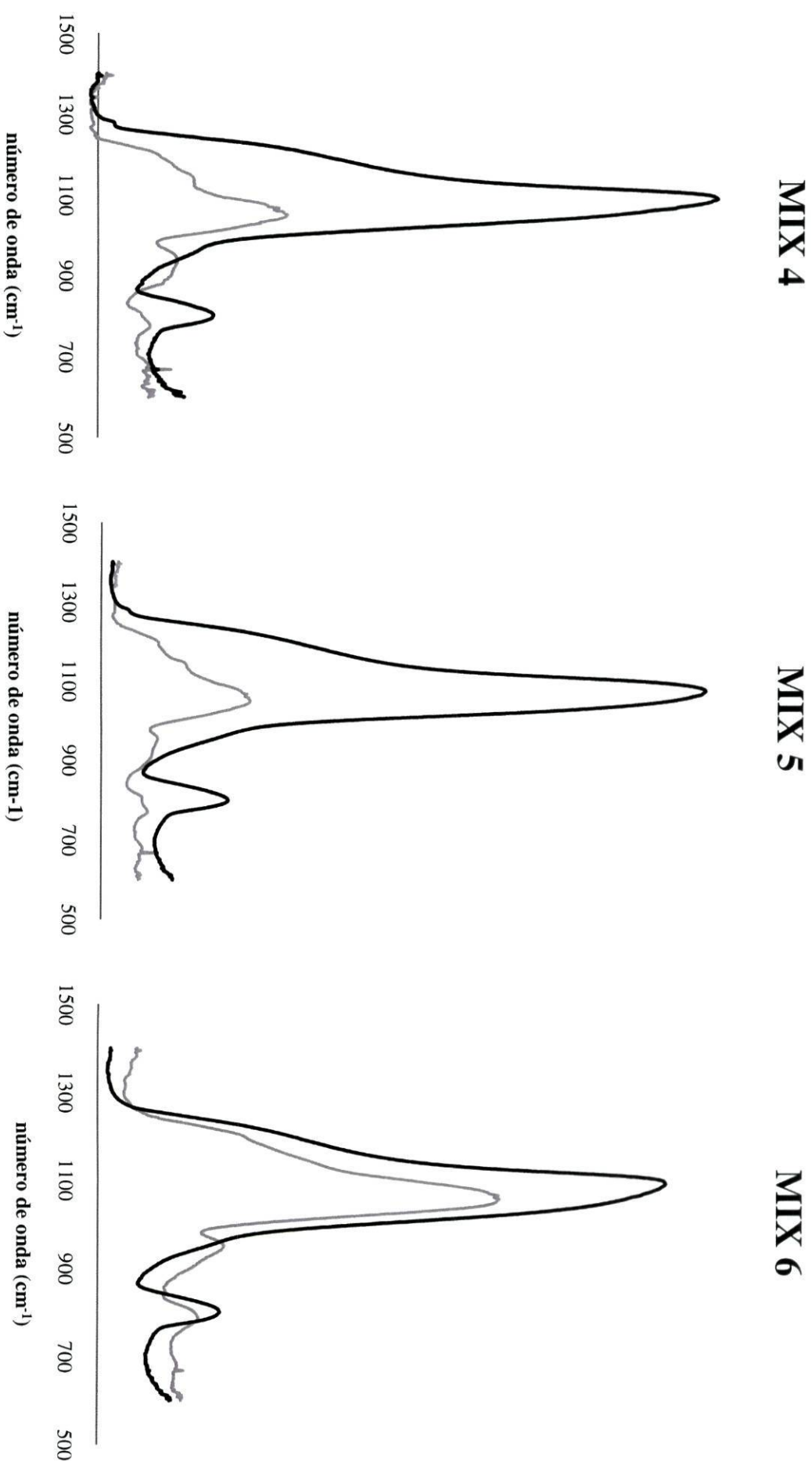


Figura 3.13 – Representação dos espectros de FTIR-ATR dos MIXs 4 a 6 retirados 2 meses após a preparação (cor lilás claro) e 2 meses após a calcinação (cor preto)

Na figura seguinte encontram-se representados os resultados obtidos com os xerogéis calcinados.

Capacidade de retenção de CAP dos conjuntos MIX/NIX 4 a 7 calcinados *

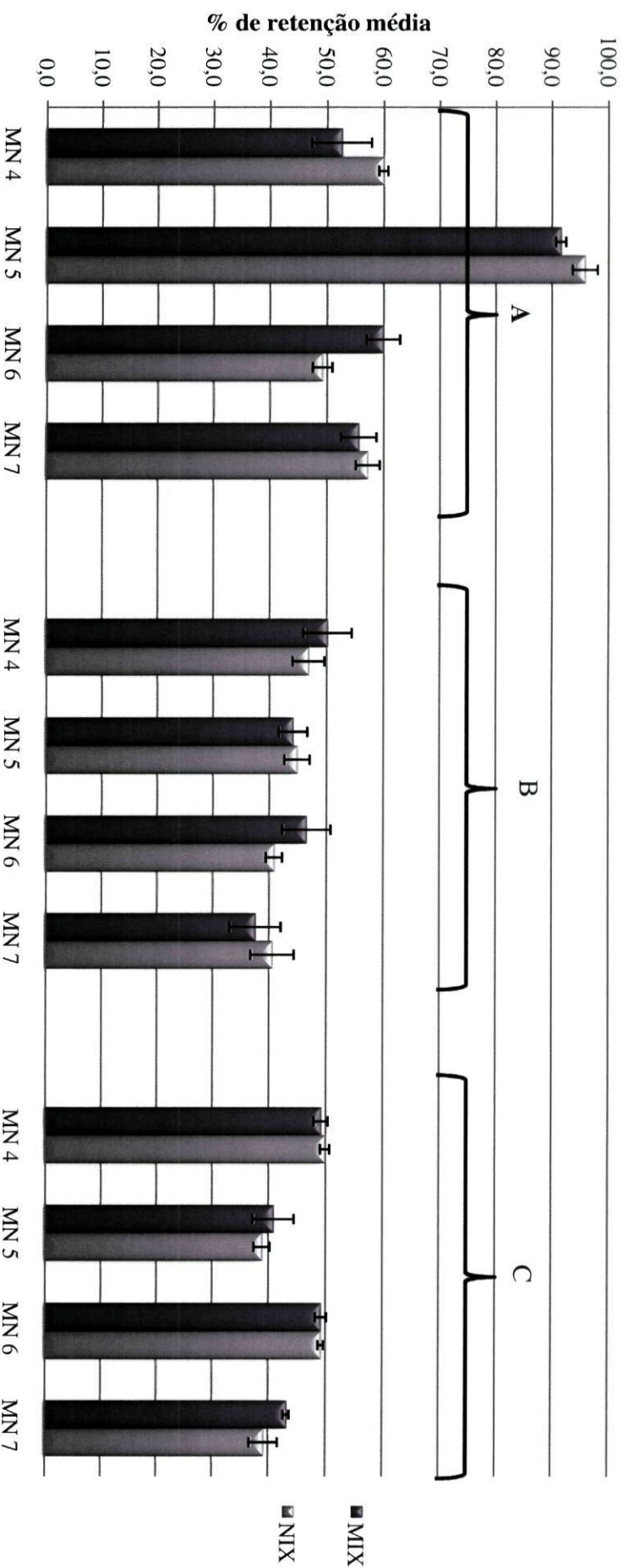


Figura 3.14 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE MIX/NIX 4 a 7 calcinados, com as diferentes soluções carga (n=3)

*solução SG 4 com UPTMOS, TMOS, TFA e MeOH; solução SG 5 com H₂O:Si 3:1, UPTMOS, TMOS, MeOH e NaOH; solução SG 6 com H₂O:Si 1:1, UPTMOS, TMOS, MeOH e TFA; solução SG 7 com H₂O:Si 1:1, UPTMOS, TMOS, MeOH, TFA e PEG 6000

Legenda: A – solução carga 100% H₂O; B – solução carga 50% H₂O:50% MeOH; C – solução carga 10% H₂O:90% MeOH

Uma vez que as superfícies de titânio revestidas e calcinadas (tabela 3.3) se apresentaram altamente hidrofílicas, seria de esperar que houvesse variações no comportamento dos MIXs e NIXs ao alterar a composição da solução carga, nomeadamente que houvesse evidência de uma diminuição da capacidade de retenção com a solução carga 10% H₂O:90% MeOH, pois diminui a capacidade de molhabilidade da solução carga e consecutivamente diminui a difusão de massa do composto.

Os resultados obtidos com estes MIXs e NIXs foram semelhantes aos resultados obtidos em 3.2.3.2, isto é, verificou-se uma diminuição geral na % de retenção média quando comparado com os resultados obtidos em 3.2.3.1. Este facto pode estar também relacionado com o facto dos cartuchos de SPE produzidos com os xerogéis calcinados possuírem menor quantidade de enchimento. O conjunto MIX/NIX 5 foi o que apresentou uma diminuição significativa na capacidade de adsorção não selectiva com a segunda solução carga. Contudo, com a solução menos polar a diferença não foi apreciável. Com os restantes xerogéis também existiu uma diminuição das ligações não específicas entre o primeiro conjunto (solução carga 100% H₂O) e o segundo conjunto (solução carga 50% H₂O:50% MeOH). Contudo, com o terceiro conjunto (solução carga 10% H₂O:90% MeOH) as diferenças não foram significativas.

No tempo de contacto utilizado, não se verificaram diferenças estatísticas, pois os valores percentuais encontram-se muito próximos, entre o MIX e o NIX correspondente. O MIX 6 foi o único que apresentou alguma evidência de impressão em relação ao seu NIX, uma vez que apresentou uma diferença de cerca de 11%, com a solução carga 100% H₂O.

Como já foi referido, o tratamento a altas temperaturas também decompõe grupos orgânicos funcionais existentes, como é o caso do grupo ureído. É muito provável que o grupo ureído se tenha decomposto, dando a cor cinzento-acastanhado aos xerogéis (cor típica proveniente da decomposição térmica entre os 380°C e 450°C⁹⁵). Assim, ocorreu uma mudança estrutural na rede polimérica, deixando de haver os grupos orgânicos que realizariam as ligações não-covalentes entre o MF-molécula alvo, favorecendo as ligações não específicas.

3.2.2.4 Resultados do conjunto MIX/NIX 7 obtidos um mês após a sua preparação

Avaliou-se o comportamento dos MIXs/NIXs 7 obtidos pelos três métodos de preparação após um mês de terem sido utilizados/preparados (resultados na figura 3.15), com o intuito de verificar se os resultados iniciais tinham sido modificados. Os MIX e NIX 7 silanizados mantiveram o seu comportamento, contudo nos outros grupos verificou-se uma diminuição ligeira, sem significado estatístico, da capacidade de adsorção não específica, que pode dever-se a uma alteração na constituição da rede polimérica.

Mesmo após a gelificação, os géis continuam a reagir até à sua capacidade máxima de entrelaçamento (hidrólises e condensações que ainda podem ocorrer), pelo que quando foi realizado o primeiro estudo de avaliação dos xerogéis as redes poliméricas ainda se encontravam em evolução.

Capacidade de retenção do MIX/NIX 7 após a preparação vs 1 mês da sua utilização

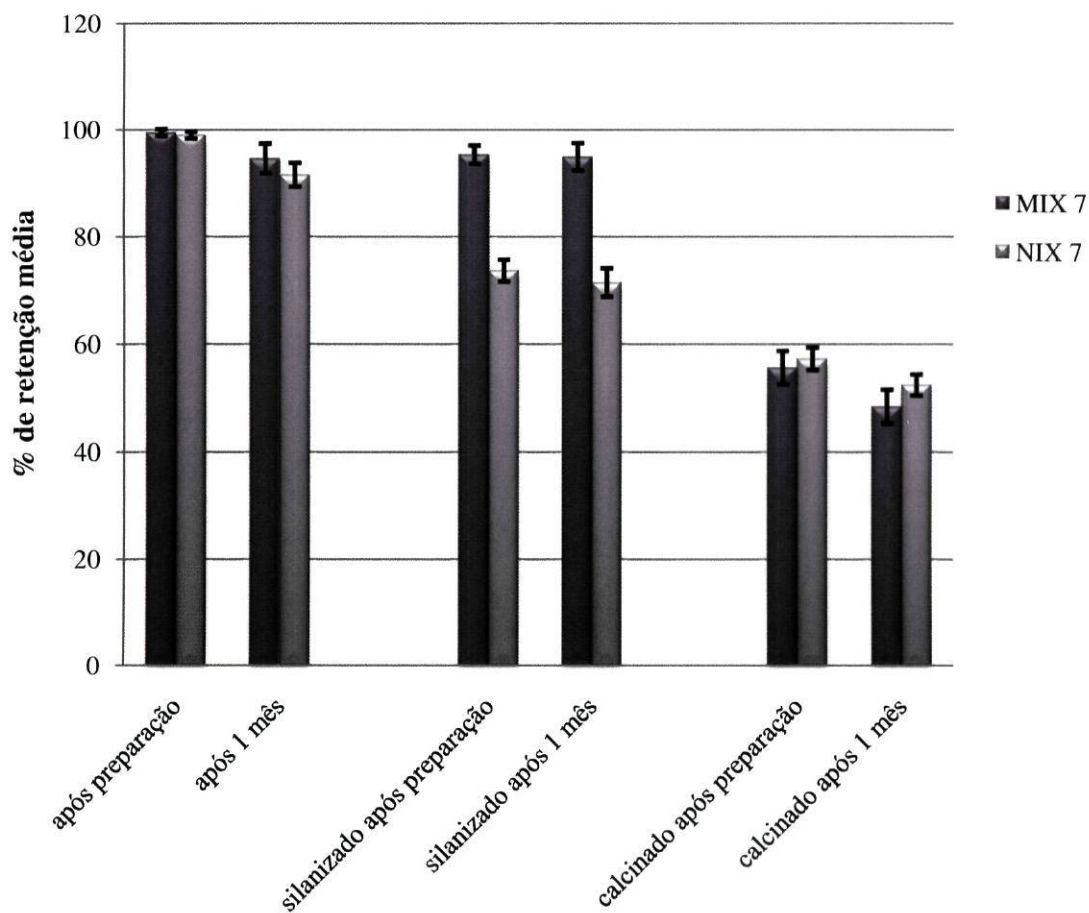


Figura 3.15 – Representação da capacidade de retenção dos cartuchos de SPE dos MIX/NIX 7, nos diferentes métodos de preparação, com a solução carga 100% H₂O (n=3), após preparação vs um mês da sua utilização *solução SG 7 com H₂O:Si 1:1, UPTMOS, TMOS, MeOH, TFA e PEG 6000

Capítulo 4

Conclusões

Capítulo 4 – Conclusões

O trabalho experimental desenvolvido começou pela procura de uma mistura reaccional que permitisse a Impressão Molecular do Cloranfenicol (CAP) com o monómero funcional (MF) e que tal correspondesse a uma elevada retenção do CAP no sorvente de SPE (Extracção em Fase Sólida) resultante. Até se obter um MISPE (*Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*) selectivo a CAP utilizando a técnica de polimerização de Sol-Gel (SG) que possa ser utilizado no lugar dos métodos de referência, existe um longo caminho a percorrer.

Na primeira parte do trabalho experimental, as misturas reaccionais produzidas não possuíam um ambiente químico favorável à impressão do tianfenicol (TAP), pelo que este cristalizava nas superfícies dos xerogéis. Assim, foi necessário modificar parâmetros da solução de SG inicial no sentido de encontrar misturas reaccionais que conseguissem produzir xerogéis sem cristais de TAP na sua superfície e que providenciassem um ambiente químico propício às ligações não covalentes MF-molécula molde pretendidas. Após a obtenção destes xerogéis iniciou-se a segunda parte do trabalho experimental. No entanto, a presença de interações não específicas não permitiu identificar um efeito de impressão significativo e qualitativo, limitando o uso dos xerogéis, obtidos na segunda parte, de acordo com o objectivo pretendido.

Na avaliação da eficiência dos xerogéis produzidos na segunda parte do trabalho, verificou-se que as capacidades de retenção dos cartuchos de SPE com o MIX (Xerogel de Impressão Molecular) e o respectivo NIX (Xerogel Não Impresso) encontravam-se estatisticamente iguais ou muito próximas. Surgiram apenas alguns casos em que foi verificada alguma capacidade de impressão. Nomeadamente com o MIX 4 com a solução carga de 100% H₂O, MIX 6 com a solução carga de 50% H₂O:50% MeOH (metanol), MIX 5 com a solução carga de 10% H₂O:90% MeOH, que apresentaram uma diferença superior a 13% em relação ao seu NIX, na condição em que a molécula molde foi extraída no extractor de Soxhlet. Com o tratamento de silanização foi verificado algum efeito de impressão para o MIX 7 que apresentou cerca de 22% de diferença em relação ao seu NIX, com a solução carga 100% H₂O. Na calcinação o MIX 6 apresentou alguma evidência de impressão em relação ao seu NIX, uma vez que apresentam uma diferença de cerca de 11%, com a solução carga 100% H₂O.

Considera-se este trabalho experimental como o início do desenvolvimento de uma futura investigação. Esta passa por estudar o meio reaccional do qual se parte.

Um possível caminho a seguir seria substituir o co-solvente, metanol, por um solvente orgânico como o clorofórmio (ou o tetrahydrofurano, experiência F no Apêndice 4), isto é, por um solvente que não interfira / compita com as ligações de hidrogénio entre o monómero funcional e a

molécula molde o que é desejável na Impressão não-covalente. Pode-se ainda seguir a via não hidrolítica proposta por Fujiwara *et al.*^{96,97}, em que se utiliza o anidrido acético como reagente de condensação do alcóxido de silício na técnica de Sol-Gel, que ocorre em meio orgânico hidrofóbico.

Além da utilização do polietilenoglicol como agente porogénico pode-se optar por outras vias como as apresentadas a seguir:

- Sen *et al.* sintetizaram uma série de compostos de sílica porosa ordenada hierarquicamente com três diferentes escalas de tamanhos de poros usando esferas de látex e blocos de copolímeros (“*Pluronic F127 e P123*”) como moléculas molde na presença de co-surfactantes (n-álcoois) em meio ácido.^{98,99}
- Recentemente, os líquidos iónicos têm sido adoptados como moléculas molde na síntese de sílicas mesoestruturadas. Por esta via, materiais de sílica com micro e macroporos foram sintetizados utilizando como moléculas molde o poliestireno e líquidos iónicos anfifílicos, em que a arquitectura da parede da estrutura cúbica ordenada dos macroporos é feita praticamente por microporos bem ordenados. Também já foi preparada uma sílica trimodal meso-macroporosa utilizando o poliestireno para a formação de macroporos, bloco de copolímero *KLE* para largos mesoporos e o líquido iónico, cloreto 1-hexadecil-3-metilimidazolium, para pequenos mesoporos.¹⁰⁰⁻¹⁰⁵

Apêndices

Apêndice 1

- Artigos científicos publicados sobre MISPE de SG

Na tabela A1 apresentam-se artigos científicos publicados sobre MISPE baseados na técnica de Polimerização de SG, conhecidos até à data.

Tabela A1.1 – Apresentação de dados de artigos científicos publicados sobre MISPE baseados na técnica de SG

Titulo	Autor	Fonte	Data publicação
An imprinted organic-inorganic hybrid sorbent for selective separation of cadmium from aqueous solution	Lu Y.K., Yan X.P.	Analytical Chemistry	15-Jan-04
The use of molecularly imprinted sol-gels in pharmaceutical separations	Olwill A., Hughes H., O'Riordain M., <i>et al.</i>	Biosensors & Bioelectronics	15-Dez-04
An ion-imprinted functionalized silica gel sorbent prepared by a surface imprinting technique combined with a sol-gel process for selective solid-phase extraction of cadmium (II)	Fang G.Z., Tan J., Yan X.P.	Analytical Chemistry	14-Mar-05
Preparation and evaluation of a molecularly imprinted sol-gel material for on-line solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of trace pentachlorophenol in water samples	Han D.M., Fang G.Z., Yan X.P.	Journal of Chromatography A	30-Dez-05
Preconcentration of copper using double-imprinted polymer via solid phase extraction	Birlik E., Ersoz A., Denizli A., <i>et al.</i>	Analytica Chimica Acta	21-Abr-06
Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines	Silva R.G.D., Augusto F.	Journal of Chromatography	12-Mai-06
Synthesis and characterization of a molecularly imprinted silica gel sorbent for the on-line determination of trace Sudan I in Chilli powder through high-performance liquid chromatography	Wang S., Xu Z.X., Fang G.Z., <i>et al.</i>	Journal of Agricultural and Food Chemistry	16-Mai-07
A novel sol-gel-material prepared by a surface imprinting technique for the selective solid-phase extraction of bisphenol A	Jiang X.M., Tian W., Zhao C.D., <i>et al.</i>	Talanta	15-Abr-07
Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer for the analysis of diethylstilbestrol	Jiang X.M., Zhao C.D., Jiang N., <i>et al.</i>	Food chemistry	01-Jun-08
Separation and determination of estrone in environmental and drinking water using molecularly imprinted solid phase extraction coupled with HPLC	Wang S., Xu Z.X., Fang G.Z., <i>et al.</i>	Journal of Separation Science	Abr-08

Continuação Tabela A1.1 – Apresentação de dados de artigos científicos publicados sobre MISPE baseados na técnica de SG

Título	Autor	Fonte	Data publicação
Molecularly imprinted polymer online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-UV for the determination of three Sulfonamides in pork and chicken	He J.X., Wang S., Fang G.Z., <i>et al.</i>	Journal of Agricultural and Food Chemistry	14-Mai-08
The requisite level of theory for the computational design of molecularly imprinted silica xerogels	Azenha M., Kathirvel P., Nogueira P., <i>et al.</i>	Biosensors & Bioelectronics	15-Jul-08
Preparation and Application of a Novel Silica-Supported Organic-Inorganic Hybrid Molecular Imprinting Polymer	Jin G., Tang Y., Liu., <i>et al.</i>	Analytical Letters	Jul-08
Molecularly imprinted sol-gel silica for solid phase extraction of penobarbital	Pilau E.J., Silva R.G.C., <i>et al.</i>	Journal of the Brazilian Chemical Society	Ago-08

Apêndice 2

○ O Spin-Coating

As técnicas de revestimento de superfícies com SG mais utilizadas são: *Dip-Coating*, *Spin-Coating* e *Flow-Coating*. A técnica de preparação dos filmes utilizada varia com o tipo de substrato e com a finalidade do material a preparar. Para obter filmes mais espessos aumenta-se o tempo de deposição ou efectuam-se vários revestimentos no substrato.

A técnica de *Spin-Coating* resume-se em depositar gotas da solução inicial do sol sobre um substrato que apresenta um movimento de rotação, permitindo a obtenção de um revestimento uniforme do substrato.¹⁰⁶ A figura A2.1 representa a realização do método de uma forma esquemática.

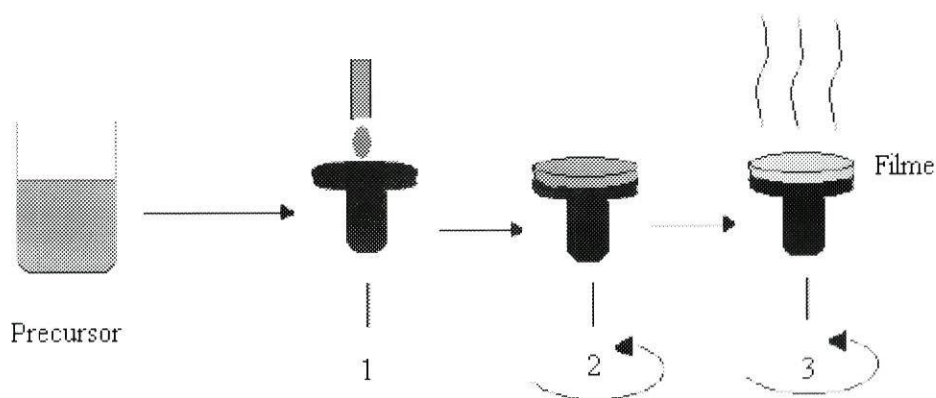


Figura A2.1 – Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por *Spin-Coating*, em que 1 é a deposição, 2 a rotação, e 3 é a rotação e evaporação¹⁰⁶

Pode-se dividir o processo de *Spin-Coating* em 4 fases, representados na figura A2.2: deposição, *spin-up*, *spin-off* e evaporação, contudo a evaporação pode acompanhar os outros estados.

Um excesso de líquido é colocado na superfície durante o estado de deposição. No estado de *spin-up* o líquido flui de forma radial para fora induzido pela força centrífuga. No estado de *spin-off*, o excesso de líquido flui para o perímetro e deixa gotas. À medida que o filme fica fino, a taxa de remoção de excesso do líquido por *spin-off* fica mais baixa, porque, quanto mais fino é o filme, maior é a resistência para fluir e porque quando a concentração de componentes não voláteis aumenta, aumenta também a viscosidade. No 4º estado, a evaporação é o principal mecanismo de diminuição de espessura.²³

Uma vantagem do *Spin-Coating* é que o filme do líquido tende a ficar uniforme em espessura durante o *spin-off* e, uma vez uniforme, tende a permanecer assim. Esta tendência acontece devido ao equilíbrio entre as duas principais forças: força centrífuga, a qual leva a fluir radialmente para fora, e a força de viscosidade (fricção), a qual age radialmente para dentro. Durante o *spin-up*, a força centrífuga supera a força de gravidade e a rápida diminuição da espessura rapidamente se sobrepõem a todas as forças de inércia excepto a força centrífuga.²³

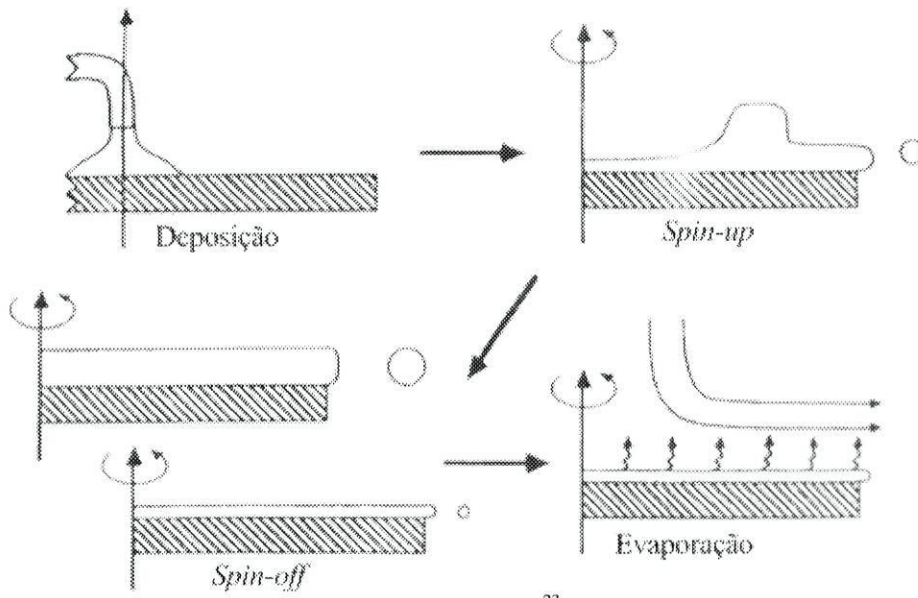


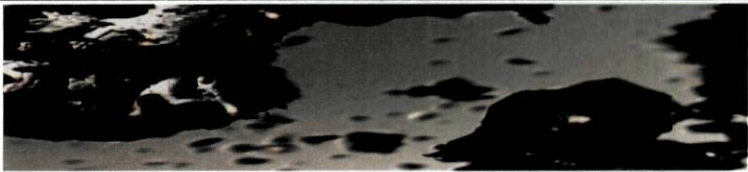
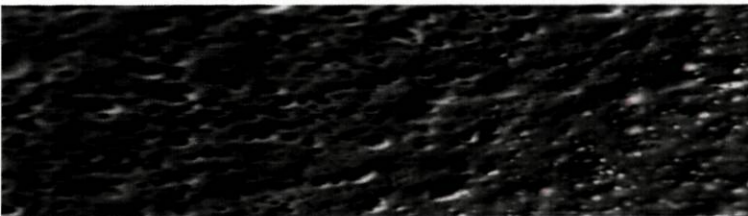


Figura A2.2 – Fases do processo de *Spin-Coating*²³

Apêndice 3



- Experiências de misturas reaccionais de SG realizadas e excluídas na segunda fase do trabalho experimental

Na tabela A3.1 apresentam-se as misturas reaccionais realizadas na 2ª fase do trabalho experimental, com os reagentes colocados pela ordem de adição, que foram analisadas por Microscopia de Polarização e a respectiva imagem obtida. As imagens obtidas, e apresentadas, das superfícies dos xerogéis testados foram analisadas por especialistas na técnica utilizada. O método de exclusão das experiências foi a apresentação de cristais na superfície analisada, como tal, exclui-se as experiências A, C e E. As experiências B e D diferenciam-se dos conjuntos MIP/NIP 4 e 6, respectivamente, pela quantidade molar de TAP incluído nas misturas, isto é, nestas experiências colocou-se metade do número de moles dos conjuntos MIP/NIP referidos, pelo que estas experiências não foram realizadas. A experiência F não foi realizada por opção.

Tabela A3.1 - Experiências realizadas e excluídas na 2ª fase do trabalho experimental

Experiência	Reagentes	Imagem
A	TAP	
	TMOS	
	MeOH	
	TFA	
B	TAP/2	
	UPTMOS	
	MeOH	
	TMOS	
	TFA	
C	TAP	
	TMOS	
	TFA	
	H ₂ O	
D (proporção H ₂ O:MF = 3:1)	TAP/2	
	UPTMOS	
	MeOH	
	TMOS	
	H ₂ O	
	NaOH	

Continuação Tabela A3.1 - Experiências realizadas e excluídas na 2ª fase do trabalho experimental

Experiência	Reagentes	Imagem
<p>E (proporção H₂O:MF = 1:1)</p>	TAP	
	TMOS	
	MeOH	
	TFA	
	H ₂ O	
<p>F</p>	TAP	
	TMOS	
	THF	
	TFA	
	H ₂ O	

Apêndice 4

○ Os ângulos de contacto¹⁰⁷

A molhabilidade pode ser definida como a tendência para que um líquido se espalhe num substrato sólido. Descreve a extensão do contacto íntimo entre um líquido e um sólido. Existem dois parâmetros importantes para caracterizar a molhabilidade de um líquido num sólido, que são: o grau ou a extensão e taxa de molhabilidade. O grau de molhabilidade é geralmente indicado pelo ângulo do contacto formado na interface entre o sólido e o líquido. No caso de equilíbrio, é governado pelas leis da termodinâmica. O grau de molhabilidade é dependente da superfície e das energias interfaciais envolvidas na interface sólida/líquida. A taxa de molhabilidade indica com que rapidez o líquido molha a superfície e se espalha sobre a mesma. É guiada por um número de factores tais como as condições térmicas do sistema, as forças capilares, a viscosidade do líquido e as reacções químicas que ocorrem na interface, entre outras.

Quando um líquido está numa superfície sólida, vai-se espalhar a uma determinada extensão na superfície, fazendo um ângulo com a superfície como mostra a figura A3.1, o ângulo de contacto (θ_c). Sob circunstâncias de equilíbrio este ângulo é obtido pelas energias de superfície e interfaciais. O ângulo de contacto é extensamente usado para caracterizar os fenómenos interfaciais, a molhabilidade de superfícies sólidas, a penetração capilar em meios porosos, revestimentos e outros.

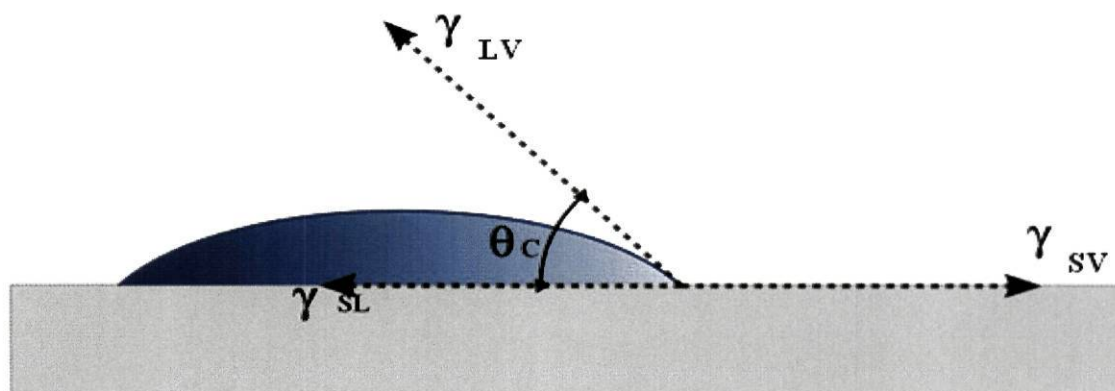


Figura A4.1 – Ilustração de um ângulo de contacto de uma amostra líquida

Considerando um líquido puro molhando e espalhando-se numa superfície ideal, isto é, uma superfície lisa de um sólido inerte, a força dinâmica que comanda a molhabilidade ($F_d(t)$) é dada por:

$$F_d(t) = \gamma_{SV} - (\gamma_{SL} + \gamma_{LV}\cos\theta_c(t)) \quad (1)$$

onde γ_{ab} é a tensão interfacial entre as fases a e b e os índices S, L, V indicam as fases sólida, líquida e de vapor respectivamente.

No equilíbrio as forças anulam-se ou $F_d = 0$. Nesta circunstância a equação (1) resulta na equação de Young:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV}\cos\theta_c \quad (2)$$

Dupre definiu o trabalho de adesão entre sólido e líquido da seguinte forma:

$$W_{SL} = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \quad (3)$$

A inserção da equação (3) na equação (1) forma a famosa Equação de Young-Dupre:

$$W_{SL} = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta_c) \quad (4)$$

Para um dado valor de γ_{LV} , o ângulo de contacto aumenta à medida que a adesão entre o líquido e o sólido diminui. Um ângulo de 180° indica zero de adesão entre o líquido e a superfície e portanto representa uma condição de não molhabilidade total. Para finalidades práticas, considera-se que o líquido molha a superfície do sólido quando o ângulo do contacto é menor do que 90° . Por outro lado, se o ângulo de contacto for maior do que 90° , o líquido é considerado como hidrofóbico. Nesses casos, as gotas do líquido tendem a mover-se facilmente na superfície do substrato e não têm nenhuma tendência para entrar em poros ou buracos pela acção capilar. Aceita-se geralmente que quanto menor o ângulo de contacto, melhor a molhabilidade (hidrofilicidade). Considera-se que o líquido molhou completamente o sólido somente quando o ângulo de contacto é zero, pelo que a gota tende a espalhar-se completamente no sólido.

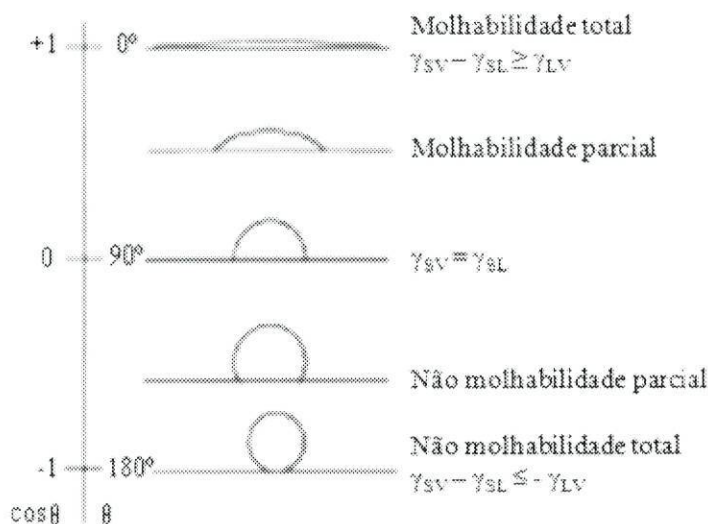


Figura A4.2 – Deposição de uma gota de um líquido num substrato sólido em diversas circunstâncias

A figura A4.2 mostra esquematicamente uma gota de um líquido num substrato sólido sob várias circunstâncias diferentes: molhabilidade completa ($\theta_c=0^\circ$) à condição de não molhabilidade total ($\theta_c=180^\circ$). O trabalho da adesão pode ser considerado como o trabalho que deve ser executado por a unidade de área da interface para separar as duas fases. É uma medida da força de ligação entre as fases. Um valor mais baixo do ângulo de contacto indica uma adesão melhor (maior hidrofilicidade).

Os desvios das equações Young e de Dupre -Young são feitas sob a suposição do espalhamento de líquidos não reactivos num sólido ideal (física e quimicamente inerte, liso, homogéneo e rígido). Tal condição raramente é encontrada nas situações práticas. Contudo, a equação de Young é o ponto de início fundamental para a compreensão do campo complexo da molhabilidade.

Apêndice 5

○ Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier¹⁰⁸

→ Espectroscopia no Infravermelho (IV)

A Espectroscopia de Infravermelho (IV) pertence ao grupo da espectroscopia molecular vibracional. A espectroscopia vibracional é universal, permitindo a obtenção de informações de sólidos, líquidos e gases, de superfícies, interfaces entre sólidos e líquidos ou gases, amostras volumosas e estruturas em camadas e providenciar informações sobre grupos funcionais presentes na amostra, incluindo o seu tipo, interações e orientações.

A maior parte dos espectros de IV são obtidos ao medir a absorção da radiação incidente monocromática na gama de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ de amostras sólidas, líquidas ou gasosas. O espectro de IV é aquele em que a atenuação da radiação de IV transmitida pode ser apresentada como uma função do comprimento de onda.

As fontes de IV emitem radiação policromática. Para espectroscopia, é necessária tanto a radiação monocromática (sistemas dispersivos), como um sistema complexo de codificação (sistemas múltiplos). No primeiro caso, os prismas monocromáticos são aplicados para abranger todo o espectro. No segundo caso, um interferómetro de Michelson é tipicamente usado para modular a radiação IV. Quando são necessárias apenas áreas espectrais estreitas, filtros ópticos ou fontes laser de IV são suficientes (sistemas não-dispersivos).

→ Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Sistemas múltiplos baseados no algoritmo da Transformada de Fourier usam normalmente os interferómetros de Michelson para codificar o espectro policromático da fonte do espectrofotómetro de IV. Tal dispositivo consiste essencialmente num separador de feixes, um espelho fixo, um espelho móvel e um mecanismo de movimentação e posicionação. A radiação da fonte é dividida no separador de feixes e dirigida igualmente para o espelho fixo e móvel. Normalmente o espelho móvel é varrido a uma velocidade constante resultando numa mudança nos caminhos ópticos dos dois feixes em função do tempo. O feixe reflectido interfere no separador de feixes, de onde 50% da radiação retorna à fonte e a outra chega ao detector. No detector a intensidade da radiação é medida como uma função de diferentes caminhos ópticos do feixe em ambos os braços do interferómetro. Este sinal é chamado de interferograma. O espectro tradicional, com a energia como função da frequência, pode ser obtido do interferograma pelo processamento matemático via Transformada de Fourier.

→ Reflectância Total Atenuada (ATR)

Nem todas as amostras sólidas (por exemplo, polímeros) podem ser finamente moídas para produzir pastilhas homogêneas de KBr para a espectroscopia de transmissão de IV. Na técnica de ATR, a amostra é colocada em contacto próximo com a superfície de um prisma feito de um material com elevado índice refractivo n , como TlBrI ($n = 2,4$) ou Ge ($n = 4,0$). Um feixe de luz que se aproxima da interface de um meio opticamente denso, com um ângulo de incidência grande o suficiente, é totalmente reflectido. Apesar disso ela consegue penetrar uma distância curta na amostra.

Se a amostra absorve no IV (atenuador), e a unidade de ATR está devidamente montada no compartimento para a amostra no espectrofotómetro de IV, uma transmissão tipo espectro de IV pode ser observado. A profundidade da penetração depende do comprimento de onda da radiação, dos índices refractivos da amostra, do material do prisma e do ângulo de incidência. Ao variar o ângulo de incidência, um perfil mais profundo da amostra é possível até a uma certa extensão.

Lista de referências

- 1 – Tarley C., Sotomayor M., Kubota L., Quim. Nova, 28 (2005) 1076
- 2 – Wulff G., Sarhan A., Angew. Chem. Int. Ed., 11 (1972) 341
- 3 – Piletsky S. A., Alcock S., Turner, A. P. F., Trends Biotechnol., 19 (2001) 9
- 4 – Wei S., Mizaikoff B., J. Separ. Sci., 30 (2007) 1794
- 5 – Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., “*Molecular Imprinting from Fundamentals to Applications*”, Wiley-VCH (2003)
- 6 – Alfaya A., Kubota L., Quim. Nova, 25 (2002) 835
- 7 – Jiang X., Jiang N., Zhang H., Liu M., Anal. Bioanal. Chem., 389 (2007) 355
- 8 – Mayes A.G., Whitcombe M.J., Adv. Drug Deliver. Rev., 57 (2005) 1742
- 9 – Spivak D. A., Adv. Drug Deliver. Rev., 57 (2005) 1779
- 10 – Kandimalla V.B., Ju H.X., Anal. Bioanal. Chem., 380 (2004) 587
- 11 – Zachary H., Mark E.B., Adv. Drug Deliver., 56 (2004) 1599
- 12 – Borje S., J. Chromatogr. A, 906 (2001) 227
- 13 – Borje S., Trends Anal. Chem., 16 (1997) 310
- 14 – Arshady R., Mosbach K., Macromol. Chem. Physic., 182 (1981) 687
- 15 – Caro E., Masque N., Marce R. M., Borrull F., Cormack P.A.G., Sherrington D.C., J. Chromatogr. A, 963 (2002) 169
- 16 – Ikegami T., Mukawa T., Nariai H., Takeuchi T, Anal. Chim. Acta, 504 (2004) 131
- 17 – Schultz L.G., Zhao Y., Zimmerman S.C., Angew. Chem. Int. Ed., 40 (2001) 1962
- 18 – Zimmerman S.C., Wendland M.S., Rakow N.A., Zharov I., Suslick K.S., Nature, 418 (2002) 399
- 19 – Holthoff E.L., Bright F.V., Anal. Chim. Acta, 594 (2007) 147
- 20 – Cummins W., Duggan P., McLoughlin P., Anal. Chim. Acta, 542 (2005) 52
- 21 – Olwill A., Hughes H., O’Riordain M., McLoughlinP., Biosens. Bioelectron., 20 (2004) 1045
- 22 – Wright, J.D., Sommerdijk, N.A.J.M., “*Sol-Gel Materials – Chemistry and Applications*”, Taylor & Francis (2001)
- 23 – Brinker C. J., Scherer G. W., “*Sol-Gel Science – The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*”, Academic Press (1990)
- 24 – www.cmls.llnl.gov/data/assets/images/science_and_technology/chemistry/solgel/solgel3.jpg, 10/08/2008
- 25 – Etienne Duguet, “*Introduction to Hybrid Organic-Inorganic Materials*”, University Bodeaux, 10/08/2008
- 26 – Nogueira P.J.S., “*Desenvolvimento de novas fibras para Microextração em Fase Sólida com aplicação da tecnologia Sol-Gel*”, Tese de Mestrado em Química Analítica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (2007)

- 27 – www.chemistry.wustl.edu/~gelb/solgel.html, 10/08/2008
- 28 – www.solgel.com/articles/June00/phalip/introsolgel.htm, 10/08/2008
- 29 – Cormack A.G.P., Elorza Z.A., *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 173
- 30 – Fontanals N., Marcé R.M., Borrull F., *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 14
- 31 – Bulletin 910, Guide to Solid Phase Extraction, Supelo (1998)
- 32 – www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Analytical_Chromatography/Sample_Preparation/SPE/supelMIP.html, 10/08/2008
- 33 – Olsen J., Martin P., Wilson I.D., *Anal. Commun.*, 35 (1998) 13H
- 34 – Martín-Esteban A., *Fresen. J. Anal. Chem.*, 370 (2001) 795
- 35 – Lanza F., Sellergren B., *Chromatographia*, 53 (2001) 599
- 36 – Baggiani C., Anfossi L., Giovannoli C., *Anal. Chim. Acta*, 591 (2007) 29
- 37 – Tamayo F.G., Turiel E., Martín-Esteban A., *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 32
- 38 – Sellergren B., *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1578
- 39 – Martin P., Wilson I. D., Morgan D. E., Jones G. R., Jones K., *Anal. Commun.*, 34 (1997) 45
- 40 – Pilau E.J., Silva R.G.C., Jardim I.C.F.S., Augusto F., *J. Braz. Chem. Soc.*, 19 (2008) 1136
- 41 – Trabalho realizado no âmbito da disciplina de Toxicologia Mecanística, leccionada pelo Prof. Doutor Fernando Remião, do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto por Maria Eugénia dos Santos Guedes, Maria João Amaral Pacheco, Sílvia Isabel de Aragão Fernando (2007/2008)
- 42 – <http://en.wikipedia.org/wiki/Chloramphenicol>, 10/05/2008
- 43 – www.fda.gov/cvm/July_August02.htm, 10/05/2008
- 44 – www.deco.proteste.pt/map/show/166712/search/cloranfenicol.htm, 10/05/2008
- 45 – Shen H.Y., Jiang H.L., *Anal. Chim. Acta*, 535 (2005) 33
- 46 – Forti A.F., Campana G., Simonella A., Multari M., Scortichini G., *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 257
- 47 – Scortichini G., Annunziata L., Haouet M.N., Benedetti F., Krusteva I., Galarini R., *Anal. Chim. Acta*, 535 (2005) 43
- 48 – Bogusz M.J., Hassan H., Al-Enazi E., Ibrahim Z., Al-Tufail M., *J. Chromatogr. B*, 807 (2004) 243
- 49 – Nagata T., Saeki M., *J. Liq. Chromatogr.*, 15(1992) 2045
- 50 – Iosifidou E.G., Psomas J.E., *J. Liq. Chromatogr.*, 18 (1995) 1863
- 51 – di Pietra A.M., Piazza V., Andrisano V., Cavrini V., *J. Liq. Chromatogr.*, 18 (1995) 3529
- 52 – Luckas B., *Fresen. Z. Anal. Chem.*, 325 (1986) 470
- 53 – Pan C., Zhang H., Chen S., Xu Y., Jiang S., *Acta Chromatographica*, nº 17 (2006)
- 54 – Huang J.-F., Zhang H.-J., Feng Y.-Q., *J. Agr. Food Chem.*, 54 (2006) 9279
- 55 – Impens S., Reybroeck W., Vercaemmen J., Courtheyn D., Ooghe S., De Wasch K., Smedts W., De Brabander H., *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003)153

- 56 – Mottier P., Parisod V., Gremaud E., Guy P.A., Stadler R.H., *J. Chromatogr. A*, 994 (2003) 75
- 57 – Ramos M., Munoz P., Aranda A., Rodriguez I., Diaz R., Blanca J., *J. Chromatogr. B*, 791 (2003) 31
- 58 – Gikas E., Kormali P., Tsipi D., Tsarboboulos A., *J. Agr. Food Chem.*, 52 (2004) 1025
- 59 – www.cfsan.fda.gov/, 11/05/2008
- 60 – Peng X., Wang Z., Kuang W., Tan J., Li K., *Sci. Total Environ.*, 371 (2006) 314
- 61 – Mohamed R., Richoz-Payot J., Gremaud E., Mottier P., Yilmaz E., Tabet J.-C., Guy P.A., *Anal. Chem.*, 79 (2007) 9557
- 62 – Levi R., McNiven S., Piletsky S.A., Cheong S.-H., Yano K., Karube I., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2017
- 63 – McNiven S., Kato M., Levi R., Yano K., Karube I., *Anal. Chim. Acta*, 365 (1998) 69
- 64 – Mena M.L., Agüí L., Martínez-Ruiz P., Yáñez-Sedeño P., Reviejo A.J., Pingarrón J.M., *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 18
- 65a – Schirmer C., Meisel H., *J. Chromatogr. A*, 1132 (2006) 325; 65b – Schirmer C., Meisel H., *Anal. Bioanal. Chem.*, 392 (2008) 223
- 66 – Shi X., Wu A., Zheng S., Li R., Zhang D., *J. Chromatogr. B*, 850 (2007) 24
- 67 – Boyd B., Bjork H., Billing J., Shimelis O., Axelsson S., Leonora M., Yilmaz E., *J. Chromatogr. A*, 1174 (2007) 63
- 68 – Yang C.-M., Smatt J.-H., Zibrowius B., Lindén M., *New J. Chem.*, 28 (2004) 1520
- 69 – Hunnius M., Rufinska A., Maier W.F., *Micropor. Mesopor. Mat.*, 29 (1999) 389
- 70 – Trimmel G., Schubert U., *J. Non-Cryst. Solids*, 296 (2001) 188
- 71 – Jung J.-I., Bae J.Y., Bae B.-S., *J. Mater. Chem.*, 14 (2004) 1988
- 72 – Wei H.-S., Tsai Y.-L., Wu J.-Y., Chen H., *J. Chromatogr. B*, 836 (2006) 57
- 73 – Guardia L., Badía R., Díaz-García M.E., *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2006) 1822
- 74 – Stidl R., Cihna-Markl M., *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, 41 (2007) 175
- 75 – Azenha M., Kathirvel P., Nogueira P., Silva A.F., *Biosens. Bioelectron.*, 23 (2008) 1843
- 76 – Collinson M.M., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29 (1999) 289
- 77 – Yuan Z.-Y., Su B.-L., *J. Mater. Chem.*, 16 (2006) 663
- 78 – Matsui J., Goji S., Murashima T., Miyoshi D., Komai S., Shigeyasu A., Kushida T., Miyazawa T., Yamada T., Tamaki K., Sugimoto N., *Anal. Chem.*, 79 (2007) 1749
- 79 – Yilmaz E. Wihlborg A., Boyd B., Widstrand C., *Proceedings of the 9th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Ålesund 3-6 June 2007*, 38-40
- 80 – Cummins W., Duggan P., McLoughlin P., *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2006) 372
- 81 – Zhang, T., Liu, F., Chen, W., Wang, J., Li, K., *Anal. Chim. Acta*, 450 (2001) 53
- 82 – Shin W., Kim S., *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 4 (1983) 2
- 83 – Li F., Du P., Chen W., Zhang S., *Anal. Chim. Acta*, 585 (2007) 211
- 84 – Li F., Li X.-M., Zhang S.-S., *J. Chromatogr. A*, 1129 (2006) 223

- 85 – Guardia L., Badía R., Díaz-García M. E., Ania C.O., Parra J.B., *Biosens. Bioelectron.*, 23 (2008) 1101
- 86 – Pinel C., Loisel P., Gallezot P., *Adv. Mater.*, 9 (1997) 582
- 87 – <http://esc.syrres.com/interkow/webprop.exe>, 22/10/2008
- 88 – <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00446>, 22/10/2008
- 89 – Defreese J.L., Katz A., *Micropor. Mesopor. Mat.*, 89 (2006) 25
- 90 – Lin C.I., Joseph A.K., Chang C.K., Wang Y.C., Lee Y.D., *Anal. Chim. Acta*, 481 (2003) 175
- 91 – Jiang H., Zheng Z., Wang X., *Vib. Spectrosc.*, 46 (2008) 1
- 92 – Tejedor-Tejedor M.I., Paredes L., Anderson M.A., *Chem. Mater.*, 10 (1998) 3410
- 93 – Tan B., Rankin S.E., *J. Phys. Chem. B*, 110 (2006) 22353
- 94 – Boursy B., Corriu R.J.P., Strat V.L., Delord P., *New J. Chem.*, 23 (1999) 531
- 95 – www1.eere.energy.gov/vehiclesandfuels/pdfs/deer_2002/session11/2002_deer_fang.pdf, 09/10/2008
- 96 – Fujiwara M., Wessel H., Park H.-S., Roesky H.W., *Chem. Mater.*, 14 (2002) 4975
- 97 – Fujiwara M., Yamamura I., Nishiyama M., Shiokawa K., Ohtsuki S., Nomura R., *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Metal Chem.*, 37 (2007) 771
- 98 – Sen T., Tiddy G.J.T., Casci J.L., Anderson M.W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42 (2003) 4649
- 99 – Sen T., Tiddy G.J.T., Casci J.L., Anderson M.W., *Chem. Mater.*, 16 (2004) 2044
- 100 – Zhou Y., Antonietti M., *Adv. Mater.*, 15 (2003) 1452
- 101 – Brezesinski T., Erpen C., Iimura K., Smarsly B., *Chem. Mater.*, 17 (2005) 1683
- 102 – Zhou Y., Schattka J.H., Antonietti M., *Nano Lett.*, 4 (2004) 477
- 103 – Trewyn B.G., Whitman C.M., Lin V.S.Y., *Nano Lett.*, 4 (2004) 2139
- 104 – Zhou Y., Antonietti M., *Chem. Commun.*, (2003) 2564
- 105 – Kuang D.B., Brezesinski T., Smarsly B., *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 10534
- 106 – Nassar E., Ciuffi K., Gonçalves R., Messaddeq Y., Ribeiro S., *Quim. Nova*, 26 (2003) 674
- 107 – Kumar G., Prabhu K.N., *Adv. Colloid Interfac.*, 133 (2007) 61
- 108 – Kellner R., Mermet J., Widmer M., *“Analytical Chemistry”*, Wiley-VCH (1998)

