



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA MIDORI DE OLIVEIRA

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM
NOVO SORVENTE BASEADO EM POLÍMERO
MOLECULARMENTE IMPRESSO COM ACESSO RESTRITO
PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM AMOSTRAS DE
LEITE**

FERNANDA MIDORI DE OLIVEIRA

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM
NOVO SORVENTE BASEADO EM POLÍMERO
MOLECULARMENTE IMPRESSO COM ACESSO RESTRITO
PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM AMOSTRAS DE
LEITE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Oliveira, Fernanda Midori.

Preparo, caracterização e aplicação de um novo sorvente baseado em polímero molecularmente impresso com acesso restrito para extração de ácido fólico em amostras de leite / Fernanda Midori Oliveira. - Londrina, 2015.

101 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

Inclui bibliografia.

1. MIP-RAM - Teses. 2. MISPE - Teses. 3. Estudo cinético - Teses. 4. Limpeza de amostra - Teses. I. Tarley, César Ricardo Teixeira. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

FERNANDA MIDORI DE OLIVEIRA

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM NOVO
SORVENTE BASEADO EM POLÍMERO MOLECULARMENTE
IMPRESSO COM ACESSO RESTRITO PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO
FÓLICO EM AMOSTRAS DE LEITE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira
Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Gizilene Maria de Carvalho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Universidade Estadual Paulista Julio de
Mesquita Filho - UNESP

Londrina, 27 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho a Deus, a minha família, ao Guilherme e a todas as pessoas que contribuíram para o meu crescimento intelectual e pessoal, seja pela amizade, pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS pela vida, por estar sempre me iluminando e abençoando meus passos, e por me cercar de tantas pessoas maravilhosas.

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência e por todo tempo dedicado a minha formação nestes cinco anos.

Aos meus pais, Valdemir e Eunice, por todas as oportunidades que me concederam ao longo de minha vida, pelo apoio nos momentos mais difíceis, por nunca terem deixado de acreditar no meu potencial e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Luciano, pela amizade, amor e companheirismo, dedicados desde a infância.

Aos meus amigos (Felipe, Juliana, Ederson, Eduardo, Nathália, Gustavo, Débora, Bruna, Dalva e Márcia) pela amizade e companheirismo nos momentos mais alegres e difíceis de minha vida.

Ao meu namorado e amigo, Guilherme, pelos incentivos e apoios, além do amor e companheirismo.

Às minhas sobrinhas, Ketelin e Bárbara por serem anjos na minha vida.

Aos professores, técnicos e colegas de curso pelos conhecimentos compartilhados ao longo destes anos.

A todas as pessoas que contribuíram mesmo que infimamente para a elaboração deste trabalho.

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

OLIVEIRA, Fernanda Midori. **Preparo, caracterização e aplicação de um novo sorvente baseado em polímero molecularmente impresso com acesso restrito para extração de ácido fólico em amostras de leite.** 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese de um polímero híbrido molecularmente impresso contendo acesso restrito como um novo material sorvente para a extração de ácido fólico em amostras de leite. A caracterização do material foi realizada por FT-IR, TGA, SEM, TEM e análise de área superficial, volume e tamanho de poros, cujos resultados confirmaram a presença da rede orgânica e inorgânica, como também a presença de mesoporos. A partir dos estudos cinéticos obteve-se o tempo de equilíbrio de 390 minutos, resultando em uma sorção de 5,6 mg de ácido fólico (AF) por grama de sorvente. A formação de sítios de sorção seletivos foi confirmada pela sorção competitiva de soluções binárias de AF:concomitante (cafeína, ácido úrico, 4-aminobenzamida e paracetamol), na qual os coeficientes de seletividade relativos encontrados foram de 1,82, 1,33, 4,37 e 1,53, respectivamente. A porcentagem de exclusão de albumina sérica bovina para o MIP-RAM foi de 55 ± 2 e para o MIP de $35 \pm 2\%$. Os estudos utilizando o polímero molecularmente impresso em extração em fase sólida (MISPE) demonstraram satisfatória limpeza dos cromatogramas sem a necessidade de lavagem do cartucho para remoção de interferências, tornando possível a injeção direta do eluato no sistema cromatográfico. O método MISPE apresentou limite de detecção de $1,45 \mu\text{g L}^{-1}$ e limite de quantificação de $4,83 \mu\text{g L}^{-1}$ e foi aplicado em amostras de leite em pó fortificadas com ácido fólico. As quantidades de ácido fólico obtidas foram similares aquelas declaradas no rótulo. Ainda, foram obtidos, após testes de adição e recuperação, percentuais de 95 a 108%, o que atesta a exatidão do método.

Palavras-chave: MIP-RAM. MISPE. Estudo cinético. Limpeza de amostra. Sorção.

OLIVEIRA, Fernanda Midori. **Preparation, characterization and application of a new sorbent based on molecularly imprinted polymer with restricted access for the folic acid extraction in milk samples.** 2015. 101 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The present work describes the synthesis of a hybrid molecularly imprinted polymer containing restricted access as a new adsorbent material for the extraction of folic acid in milk samples. The characterization of the material was performed by means of FT-IR, TGA, SEM, TEM and analyzes of surface area, pore volume and size pore, whose results confirmed the presence of organic and inorganic network, as the presence of mesopores. From the kinetic studies the equilibrium time was found to be 390 minutes yielding adsorption of 5.6 mg of folic acid per gram of adsorbent. The formation of selective adsorptive sites was confirmed by the competitive adsorption of binary solutions of AF:possible interfering (caffeine, uric acid, 4-aminobenzamide and paracetamol), in which the relative selectivity coefficients were found to be 1.82, 1.33, 4.37 and 1.53, respectively. The percentage of bovine serum albumin exclusion for the MIP-RAM was 55 ± 2 and for the MIP was $35 \pm 2\%$. Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) studies has shown excellent clean-up of chromatograms without the need to wash the cartridge for removal of interfering, thus making possible the direct injection of eluate into the chromatographic system. The MISPE method showed limit of detection of $1.45 \mu\text{g L}^{-1}$ and limit of quantification of $4.83 \mu\text{g L}^{-1}$ and it was applied to the powder milk samples fortified with folic acid. The amounts of folic acid were similar to those stated in the label. In addition, it was obtained upon addition and recovery tests, percentages of 95 to 108%, which attest the accuracy of method.

Keywords: MIP-RAM. MISPE. Kinetic Studies. Clean-up. Adsorption.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Representação de um sistema de extração em fase sólida (SPE)	17
Figura 2	– Número de trabalhos publicados sobre o assunto MIP-RAM nos últimos anos. Extraído de <i>Web of Science</i> utilizando as palavras-chaves “ <i>Molecularly Imprinted Polymer and Restricted Access</i> ”	19
Figura 3	– Estrutura do ácido fólico.....	20
Figura 4	– Representação gráfica da redução DTN (%) em alguns países	22
Figura 5	– Representação de um polímero molecularmente impresso	23
Figura 6	– Estrutura (A) ácido metacrílico (B) ácido acrílico (C)acrilamida (D) 1-vinilimidazol e (F) 4-vinilpiridina.	24
Figura 7	– Estrutura (A) etilenoglicol dimetacrilato (B) trimetilolpropano triacrilato e (C) divinilbenzeno.....	24
Figura 8	– Representação esquemática de um RAM do tipo ADS.....	26
Figura 9	– Estrutura (A) glicidil metacrilato e (B) (3-glicidoxi)propiltrimetoxisilano..	26
Figura 10	– Representação esquemática de um RAM obtido por revestimento com α_1 -glicoproteína ácida	27
Figura 11	– Extração em fase sólida <i>on-line</i> utilizando uma coluna contendo o MIP e outra coluna contendo o material RAM. AA- auto amostrador; B1, B2 e B3- bombas; W- descarte; CC- Coluna cromatográfica; V1 e V2-válvulas e D- detector.....	28
Figura 12	– Representação esquemática da síntese de um MIP-RAM.....	29
Figura 13	– Representação esquemática do processo de síntese do MIP-RAM-BSA.	31
Figura 14	– Representação esquemática do método de polimerização em <i>Bulk</i>	32
Figura 15	– Representação esquemática do método de polimerização por suspensão.....	32
Figura 16	– Micrografias eletrônicas de varredura dos métodos de polimerização (A) em <i>Bulk</i> , (B) por precipitação e (C) suspensão.....	33

Figura 17 – Estrutura (A) 3-(trimetoxisilil)propil trimetoxisilano e (B) viniltrimetoxisilano.	35
Figura 18 – Representação estrutural do MIP-RAM sintetizado.	40
Figura 19 – Espectros de FT-IR do MIP-RAM e dos polímeros obtidos em cada etapa de síntese.....	48
Figura 20 – Espectros de FT-IR do MIP-RAM, NIP-RAM e MIP.	48
Figura 21 – Curvas termogravimétricas do MIP-RAM e dos polímeros obtidos em cada etapa de síntese	49
Figura 22 – Curvas termogravimétricas derivadas para o MIP-RAM e os polímeros obtidos em cada etapa de síntese.....	56
Figura 23 – Curvas termogravimétricas do MIP-RAM, NIP-RAM e MIP	51
Figura 24 – Curvas termogravimétricas derivadas do MIP-RAM, NIP-RAM e MIP	52
Figura 25 – Micrografias eletrônicas de varredura (A) e (B) do MIP-RAM e (C) e (D) do NIP-RAM.	53
Figura 26 – Micrografias eletrônica de transmissão (A) Poli(MAA), (B) MIP-RAM, (C) Poli(MAA) não impresso, (D) NIP-RAM e (E) MIP.	54
Figura 27 – Representação gráfica do estudo de otimização da sorção de ácido fólico em função do pH.....	56
Figura 28 – Efeito do tempo na sorção de ácido fólico pelos materiais MIP-RAM, NIP-RAM e MIP.....	57
Figura 29 – Representação gráfica da relação entre o inverso da temperatura versus a razão entre quantidade adsorvida e concentração de sobrenadante (gráfico de Van't Hoff).	56
Figura 30 – Estrutura química (A) cafeína (B) ácido úrico (C) paracetamol e (D) 4-aminobenzamida.....	61
Figura 31 – Espectros de varredura obtidos para a solução inicial de BSA e para os efluentes dos cartuchos de MIP-RAM e MIP.....	62
Figura 32 – Cromatogramas obtidos na otimização da composição da fase móvel.	64
Figura 33 – Cromatogramas do extrato de leite injetado diretamente no sistema cromatográfico e da eluição do cartucho com metanol:tampão acetato 0,01 mol L ⁻¹ pH 5,7 (1:1, v/v).	66
Figura 34 – Cromatogramas do extrato de leite injetado diretamente no	

<p>sistema cromatográfico, do efluente do cartucho e da eluição do cartucho com ACN:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 5,7 (15:85, v/v).</p>	69
<p>Figura 35 – Área de pico em função do volume do solvente de eluição</p>	70
<p>Figura 36 – Cromatogramas do extrato de leite injetado diretamente no sistema cromatográfico e eluições do cartucho com 1,0 e 10,0 mL.</p>	71
<p>Figura 37 – Curva de calibração de padrões submetidos ao método MISPE..</p>	72
<p>Figura 38 – Curva de calibração de padrões injetados diretamente no sistema cromatográfico.</p>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de T_{onset} para o MIP-RAM e os polímeros obtidos em cada etapa de síntese	49
Tabela 2 – Área de superfície, volume de poros e tamanhos de poros	55
Tabela 3 – Constantes calculadas para os modelos aplicados no estudo de cinética de sorção. MIP-RAM $Q_{e\ experimental}= 5,6\ mg\ g^{-1}$; NIP-RAM $Q_{e\ experimental}=4,5\ mg\ g^{-1}$; MIP $Q_{e\ experimental}= 4,8\ mg\ g^{-1}$	58
Tabela 4 – Coeficientes calculados para MIP-RAM e NIP-RAM	61
Tabela 5 – Teor de água de equilíbrio (%) para o MIP-RAM, NIP-RAM e MIP	63
Tabela 6 – Métodos de extração e suas respectivas porcentagens de recuperação de ácido fólico.....	65
Tabela 7 – Otimização do solvente de lavagem com as respectivas porcentagens de extração do analito e propriedades de cada solvente	67
Tabela 8 – Otimização do solvente de eluição com as respectivas porcentagens de dessorção do analito e as propriedades de cada solvente	68
Tabela 9 – Aplicação do método MISPE em amostras de leite.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADS	Alquil diol sílica
AF	Ácido fólico
AIBN	2,2'-azo-isobutironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCA	Ácido tricloroacético
BSA	Albumina sérica bovina
C	Espessura da camada limite
C ₁₈	Octadecilsilano
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DVB	Divinilbenzeno
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
ELL	Extração Líquido-Líquido
FT-IR	Espectroscopia na região do infravermelho
GMA	Glicidilmetacrilato
GTMS	(3-glicidoxipropil)trimetoxisilano
k	Coeficiente de seletividade
K	Kelvin
k'	Coeficiente de seletividade relativo
k ₁	Constante de pseudo-primeira ordem
k ₂	Constante de pseudo-segunda ordem
K _d	Constante de distribuição
K _{id}	Coeficiente de difusão interno
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAA	Ácido metacrílico
MIP	Polímero molecularmente impresso
MIP-RAM	Polímero molecularmente impresso com acesso restrito
MISPE	Polímeros impressos para extração em fase sólida
NIP-RAM	Polímero não impresso com acesso restrito
OMS	Organização Mundial da Saúde

Q_e	Capacidade sortiva no equilíbrio
Q_t	Capacidade sortiva no tempo
RAM	Materiais de acesso restrito
RP	Fase reversa
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SPE	Extração em fase sólida
t	Tempo
T. Ac	Tampão acetato
TAE	Teor de Água de Equilíbrio
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TEOS	Tetraetoxisilano
TGA	Análise termogravimétrica
TRIM	Trimetilolpropano triacrilato
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
VTMS	Viniltrimetoxisilano
α	Velocidade Inicial de Sorção
β	Extensão de Cobertura de Superfície
ΔG	Energia Livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	ÁCIDO FÓLICO	20
2.2	MIP (POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS)	22
2.3	RAM (MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO)	21
2.4	MIP-RAM (POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS- MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO)	27
2.5	MÉTODOS DE POLIMERIZAÇÃO	31
2.6	PROCESSO SOL-GEL.....	33
2.7	POLÍMEROS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS	34
3	OBJETIVOS	36
4	PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1	EQUIPAMENTOS	37
4.2	MATERIAIS E SOLUÇÕES	38
4.3	SÍNTESE DO POLÍMERO.....	38
4.4	OTIMIZAÇÃO DE PH	40
4.5	CÍNÉTICA DE SORÇÃO	41
4.6	CONSTANTES TERMODINÂMICAS	42
4.7	PARÂMETROS DE SELETIVIDADE	43
4.8	ESTUDO DE SORÇÃO DE PROTEÍNAS.....	44
4.9	EFEITO SWELLING	44
4.10	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO DA MATRIZ ALIMENTÍCIA.....	44
4.11	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EMPREGANDO MIP-RAM.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO E ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	47
5.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	52
5.3	OTIMIZAÇÃO DE PH	55

5.4	CINÉTICA DE SORÇÃO	56
5.5	CONSTANTES TERMODINÂMICAS	59
5.6	PARÂMETROS DE SELETIVIDADE	60
5.7	ESTUDO DE SORÇÃO DE PROTEÍNAS.....	62
5.8	EFEITO SWELLING	62
5.9	OTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL.....	63
5.10	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NA MATRIZ ALIMENTÍCIA.....	64
5.11	OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE LAVAGEM	65
5.12	OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE ELUIÇÃO	68
5.13	OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE DE ELUIÇÃO.....	69
5.14	FIGURAS DE MÉRITO E APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE LEITE	71
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS		75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		76
ANEXOS		84
ANEXO A – Modelos aplicados aos dados cinéticos		85
ANEXO B – Cromatogramas obtidos dos extratos da matriz alimentícia e espectros de ultravioleta-visível do pico cromatográfico do ácido fólico		91
ANEXO C – Cromatogramas da etapa de lavagem do cartucho		95
ANEXO D – Cromatogramas da etapa de eluição do cartucho.....		99

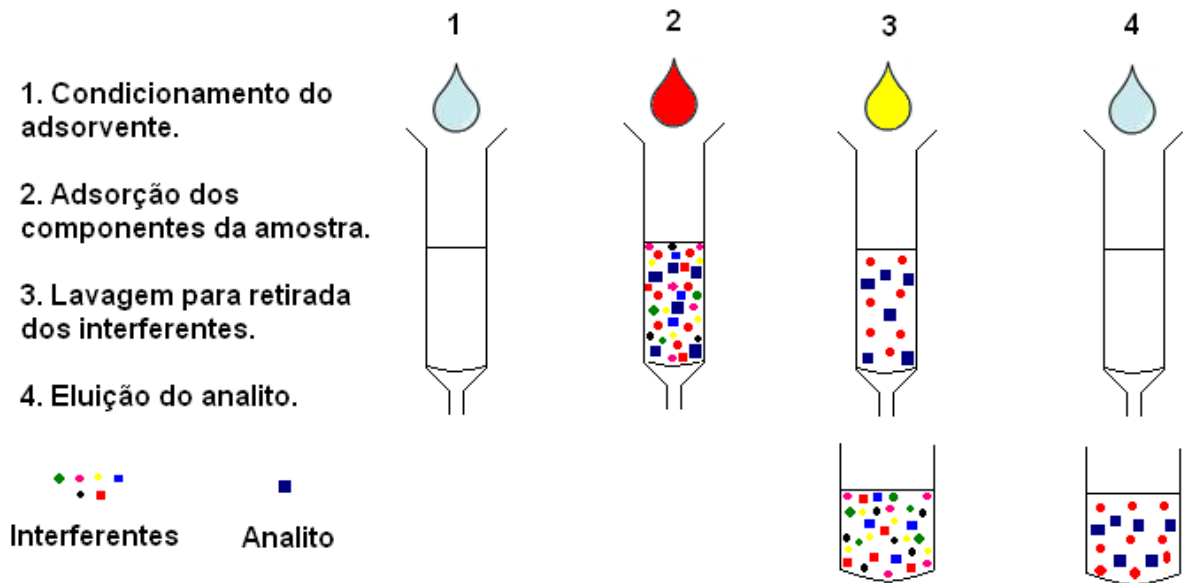
1 INTRODUÇÃO

A determinação e quantificação de substâncias orgânicas presentes em amostras complexas (alimentos, urina, medicamentos, solo, entre outras) exigem, usualmente, etapas de pré-tratamento para a eliminação de interferentes e/ou pré-concentração do analito de interesse. No caso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o pré-tratamento da amostra elimina a maior parte dos interferentes, aumentando a vida útil do sistema de separação cromatográfico e diminuindo a possibilidade de co-eluição do analito e interferentes. Entretanto, o tratamento prévio deve ser o mais rápido possível, pois muitas etapas podem ocasionar contaminação, perda de analito e aumentar o tempo de análise.^{1,2,3} Existem muitos pré-tratamentos para extração de analitos contidos em matrizes complexas como: extração em fase sólida⁴, extração líquido-líquido⁵, precipitação⁶, co-precipitação⁷ e filtração em membrana⁸. Dentre estas técnicas citadas, as mais utilizadas são a extração líquido-líquido e a extração em fase-sólida.

A extração líquido-líquido (ELL) consiste na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, na qual a eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente. Esta técnica apesar de muito utilizada apresenta muitas desvantagens, pois necessita de grandes quantidades de amostra e os solventes utilizados na maioria das vezes são tóxicos. Além disso, a ELL é de difícil automação, impurezas do solvente podem contaminar a amostra e pode ocorrer a formação de emulsões.³

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparo de amostra amplamente difundida. Ela consiste na utilização de uma fase sólida (um sorvente) para extrair o analito de interesse de um meio, retirando possíveis interferentes e em seguida um eluente é utilizado para a dessorção do analito (Figura 1). Quando o volume de eluente utilizado é menor do que o da amostra de partida, o analito é concentrado no eluato, o que confere à extração em fase sólida propriedades não apenas de limpeza da amostra, mas também de pré-concentração.⁹

Figura 1 – Representação esquemática de um sistema de extração em fase sólida (SPE).



A SPE apresenta vantagens em relação à ELL, pois permite altos fatores de pré-concentração, fácil regeneração da fase sólida e fácil automação. Além disso, existem vários sorventes comerciais com propriedades voltadas a solução de problemas analíticos (C_{18} , C_8 , alumina, Florisil[®], entre outros).^{9,10} A natureza do sorvente é o fator preponderante nos resultados obtidos na extração, pois o processo depende da afinidade que o analito possui pelo sítio sortivo, assim como a capacidade sortiva e seletividade. Vale ressaltar que o material deve possuir características que venham a favorecer o processo sortivo incluindo cinética rápida de sorção, alta área superficial, alta capacidade sortiva, estabilidade química, seletividade, baixa resistência à passagem de fluido e não apresentar inchaço em meio aquoso.⁴ Com o intuito de contornar a baixa seletividade dos materiais comerciais, alguns materiais com propriedades seletivas têm sido desenvolvidos, em especial os polímeros molecularmente impressos (MIP).

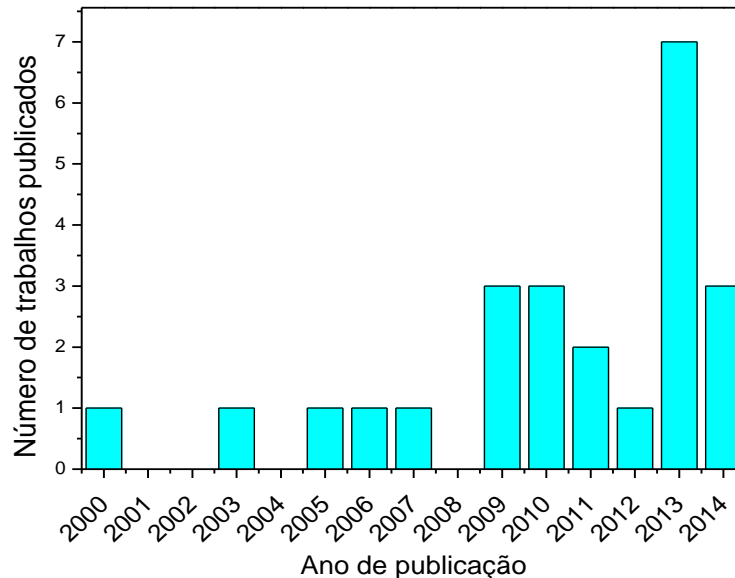
Os MIP são polímeros contendo sítios de reconhecimento seletivo para o analito de interesse, obtidos por meio da polimerização do monômero funcional que estabelece interações (ligação de hidrogênio, forças fracas de Van der Waals ou ligação covalente) com a molécula molde. A impressão molecular ocorre por meio de uma ou mais interações supracitadas e, após a remoção da molécula molde, o polímero dispõe de cavidades complementares na forma e tamanho da

molécula molde.¹¹ Apesar de seletivos os MIP não são eficientes na exclusão de macromoléculas (proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos etc.), diminuindo sobremaneira o desempenho seletivo do material quando o mesmo é aplicado em amostras complexas, como fluidos biológicos (sangue, urina e leite etc.).

A aplicação de fases sorventes para a exclusão de macromoléculas de fluidos biológicos é realizada empregando materiais de acesso restrito (RAM). Estes materiais são constituídos de sorventes poliméricos contendo em sua superfície grupos funcionais e/ou proteínas capazes de excluir as macromoléculas através de barreiras físicas ou químicas. Os poros destes materiais possuem tamanhos inferiores às macromoléculas, facilitando a sorção de analitos com massas moleculares menores. Cabe salientar que a sorção de analitos nos poros não é seletiva e, portanto, estes sorventes têm sido usualmente empregados em etapas de *clean-up* de fluídos biológicos.^{12,13}

Mediante o exposto algumas estratégias são reportadas na literatura para associar as vantagens dos MIP e RAM. Apesar dos MIP-RAM serem materiais com propriedades seletivas e de exclusão de macromoléculas com potencialidades analíticas já comprovadas o emprego desses materiais e/ou a síntese de novos materiais tem sido pouco difundida.^{14,15} De acordo com a Figura 2 observa-se que a quantidade de publicações nos últimos anos envolvendo o uso de MIP-RAM em métodos de pré-tratamento de amostras é ainda reduzida.

Figura 2 – Número de trabalhos publicados sobre o assunto MIP-RAM nos últimos anos. Extraído de *Web of Science* utilizando as palavras-chaves “*Molecularly Imprinted Polymer and Restricted Access*”.



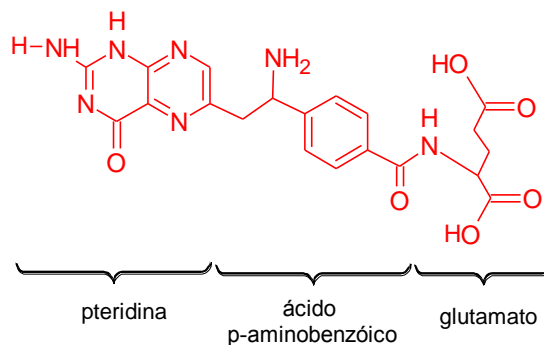
Os MIP-RAM orgânicos são obtidos por muitas técnicas de polimerização com utilização de diferentes monômeros funcionais, formando materiais com alta estabilidade química em uma ampla faixa de pH. Entretanto, dependendo do meio em que estes materiais entram em contato, há a possibilidade das cavidades seletivas criadas pela impressão molecular sofrerem deformações por retração ou expansão. Quando comparados aos polímeros orgânicos, os polímeros inorgânicos, obtidos pelo processo sol-gel, possuem a vantagem de apresentar alta área superficial, mas apresentam baixa estabilidade química em ampla faixa de pH. Alguns trabalhos, visando aliar as vantagens dos polímeros orgânicos e inorgânicos, relatam a síntese de polímeros híbridos com alta estabilidade química, estabilidade térmica, características morfológicas e texturais que favorecem o processo sortivo.¹⁶ Apesar dos materiais híbridos apresentarem as vantagens dos polímeros orgânicos e inorgânicos unidos em um único material, não há relatos na literatura sobre a síntese e aplicação de MIP-RAM híbridos em métodos de extração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel e pertence ao grupo das vitaminas do complexo B, sendo também conhecido como vitamina B9, ácido pteroilglutâmico ou 2-amino-4-hidroxi-6-metilenoamino-benzol-L-glutâmico. Sua estrutura pode ser dividida em três partes: pteridina, ácido p-aminobenzóico e glutamato (Figura 3).^{17,18}

Figura 3 – Estrutura do ácido fólico.



O ácido fólico é uma substância sintética que possui atividades similares à dos folatos que são encontrados naturalmente. Entretanto, apresenta as vantagens de ser mais estável do que os folatos e de ser mais facilmente absorvido pelo organismo, uma vez que o anel pteridina não se encontra reduzido atribuindo-lhe uma maior resistência química. Por este motivo é utilizado para o enriquecimento de alimentos como farinhas e leites.^{17,18}

O folato atua como coenzima na redução e transformação de unidades de carbono, como também é fundamental para a divisão celular e síntese de nucleotídeos, purinas e pirimidinas. É extremamente importante na fase reprodutiva feminina, pois causa um aumento no número de eritócitos, alargamento do útero, e crescimento da placenta e do feto.¹⁷⁻¹⁹ A deficiência desta vitamina pode causar doenças cardiovasculares, alterações na síntese do DNA e cromossômicas, nascimento de crianças com defeito no tubo neural (devido à deficiência da vitamina no organismo da gestante), desordens neuropsiquiátricas e até mesmo alguns tipos de câncer.¹⁹

Os folatos não são sintetizados por mamíferos, deste modo sua obtenção é mediada por uma dieta alimentar rica em legumes e verduras. A ingestão de quantidades adequadas de ácido fólico antes da gestação e nos três primeiros meses de gravidez diminui o risco de má formação no tubo neural do feto. Mesmo com todas estas vantagens muitas gestantes não têm acesso a quantidades adequadas de ácido fólico por não possuírem uma dieta adequada, apresentarem dificuldades de absorção da vitamina ou até mesmo pelo modo de preparo dos alimentos, na qual se pode ter perda da vitamina.^{19,20}

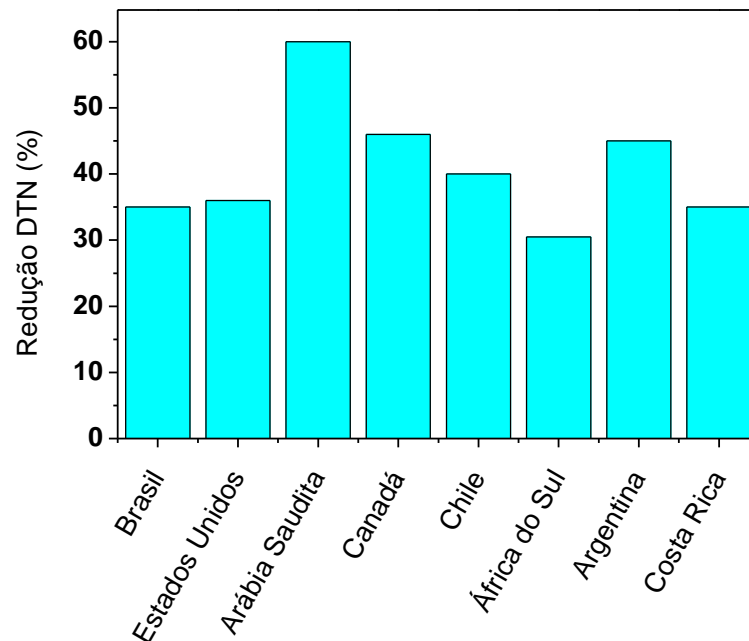
Considerando o efeito benéfico do ácido fólico à saúde humana, em especial à formação de fetos, o governo brasileiro por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tornou obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e de milho com ácido fólico, devendo cada 100 g de farinha apresentar pelo menos 150 µg de ácido fólico de acordo com a Resolução RDC nº 15, de 21 de fevereiro de 2000.²¹

Fujimori e colaboradores realizaram um estudo de 2001 a 2003 e de 2006 a 2008, visando avaliar o efeito que a fortificação de farinhas de trigo e milho proposta pela ANVISA sobre a redução de defeitos do tubo neural (DTN) de bebês nascidos no estado de São Paulo. Os autores observaram redução de 35% nos defeitos do tubo neural (DTN) dos nascidos vivos após a obrigatoriedade da política de prevenção, com destaque para redução de 48 e 22% para a anencefalia e espinha bífida, respectivamente. A encefalocele não apresentou redução significativa.²²

Além do Brasil outros países aderiram à recomendação de 2003 da Organização Mundial da Saúde (OMS) de fortificar farinhas de trigo e de milho com ácido fólico. Conforme apresentado na Figura 4, observa-se redução significativa dos defeitos do tubo neural (DTN) em países que realizaram a fortificação das farinhas de trigo e de milho com ácido fólico. Entretanto, a comparação entre as porcentagens de DTN dos países foram distintos, possivelmente devido a curva dose-resposta do ácido fólico ser linear com um limite terapêutico. Ao analisar a Figura 4 verifica-se que os países que apresentaram maior e menor porcentagem de redução dos DTN foram a Arábia Saudita (60,0%) e a África do Sul (30,5%), respectivamente. Esta variação pode ser relacionada com a concentração utilizada para o enriquecimento das farinhas em cada país (Arabia Saudita- 16,53 g de AF em

1000 g de farinha e África do Sul- 1,5 mg de AF em 1000 g de farinha de trigo e 2,21 mg de AF em 1000 g de farinha de milho).²²⁻²⁷

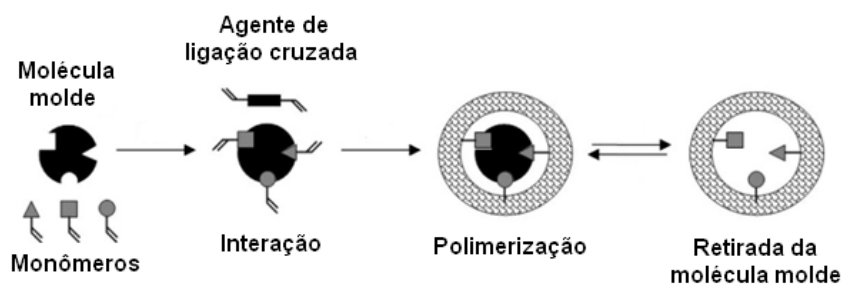
Figura 4 – Representação gráfica da redução DTN (%) em alguns países.



2.2 MIP (POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS)

Os polímeros molecularmente impressos, ou MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*, baseiam-se no reconhecimento molecular, similar ao sistema enzima-substrato e antígeno-anticorpo, entretanto apresentam as vantagens de serem mais estáveis em uma ampla faixa de pH e serem relativamente baratos. Nestes sistemas as macromoléculas possuem sítios receptores seletivos capazes de efetuar ligação com uma molécula na presença de compostos similares.^{28,29} Os MIP são obtidos pela interação da molécula molde com o monômero funcional, na seqüência é realizada a polimerização e retirada da molécula molde. Deste modo, o polímero obtido apresentará cavidades seletivas em forma e tamanho para o analito de interesse, Figura 5.

Figura 5 – Representação de um polímero molecularmente impresso.²⁹

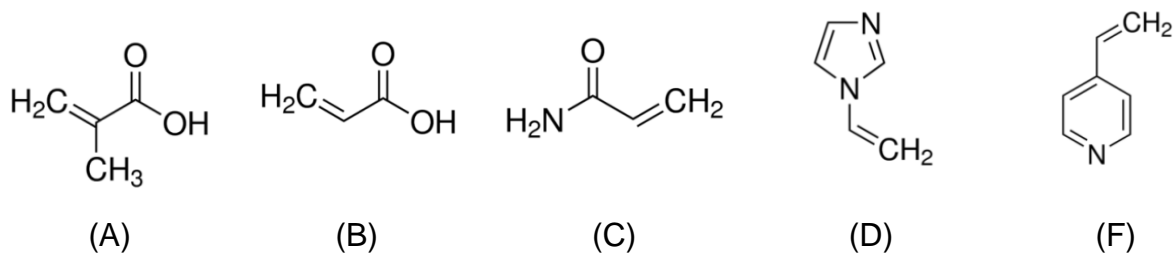


O êxito da formação dos sítios seletivos é dependente dos tipos de reagentes utilizados no momento da síntese. De modo geral para a síntese de polímeros orgânicos deve-se escolher qual será o melhor solvente porogênico, o monômero funcional, o agente de ligação cruzada e o iniciador radicalar.³⁰

O solvente porogênico eficaz é aquele capaz de solubilizar todos os reagentes de síntese e formar poros no material. A escolha de um solvente porogênico inadequado pode afetar diretamente as características texturais (área superficial, tamanho e volume de poros) do MIP formado, pois solventes pouco porosos e com área superficial baixa acabam dificultando a transferência de massa do analito ao sítio seletivo. Normalmente opta-se por utilizar solventes apolares ou polares apróticos em casos em que a interação do monômero-template ocorre por ligações de hidrogênio (ex: tolueno), mas quando esta interação ocorre por forças hidrofóbicas procura-se utilizar solventes polares próticos (ex: metanol).³⁰

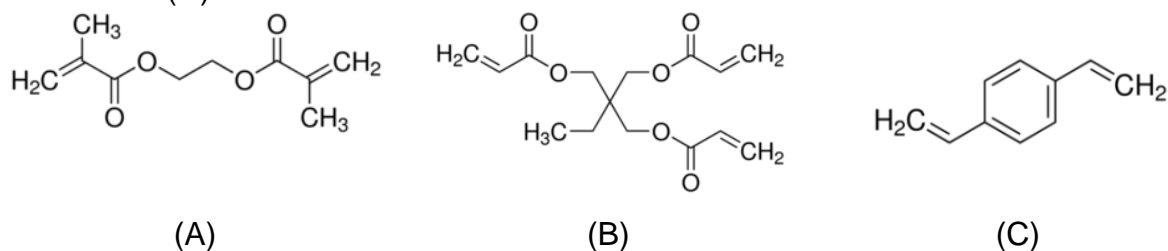
O monômero funcional escolhido necessita ter grupos funcionais capazes de interagir fortemente com a molécula molde de interesse, pois é a interação monômero-template a responsável pela formação dos sítios seletivos. O monômero funcional é o responsável pelas propriedades sortivas do polímero formado, logo quanto maior essa interação maior é capacidade do polímero adsorver seletivamente o analito frente aos constituintes de matriz. Os monômeros mais utilizados para o preparo de MIP explorando interações não covalentes com o template são: o ácido metacrílico, o ácido acrílico, a acrilamida, o 1-vinilimidazol e a 4-vinilpiridina (Figura 6).^{30, 31, 32}

Figura 6 – Estrutura (A) ácido metacrílico (B) ácido acrílico (C) acrilamida (D) 1-vinilimidazol e (F) 4-vinilpiridina.



O agente de ligação cruzada é o responsável por estabilizar o complexo monômero-template e, conseqüentemente, manter a estrutura tridimensional do sítio seletivo formado. Além de atribuir rigidez ao polímero formado, as características de estabilidade térmica e mecânica também são controladas pelo agente de ligação cruzada. Dentre os agentes de ligação cruzada mais difundidos destaca-se o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), o trimetilolpropano triacrilato (TRIM) e o divinil benzeno (DVB). Na síntese de MIP para moléculas polares aconselha-se utilizar o EGDMA ou TRIM, pois os DVB atribui características muito hidrofóbicas ao material (Figura 7).^{30, 33}

Figura 7 – Estrutura (A) etilenoglicol dimetacrilato (B) trimetilolpropano triacrilato e (C) divinilbenzeno.



O iniciador radicalar é uma substância que apresenta capacidade de formar radicais na presença de calor ou radiação ultravioleta, sendo responsável por reagir com os grupos vinílicos dos monômeros. Os radicais monoméricos formados reagem entre si resultando na formação da rede polimérica.³⁰ Os iniciadores radicalares mais utilizados são o 2,2'-azo-iso-butironitrila e o ácido 4,4'-azo-bis-(4-cianopentaenóico).³⁴

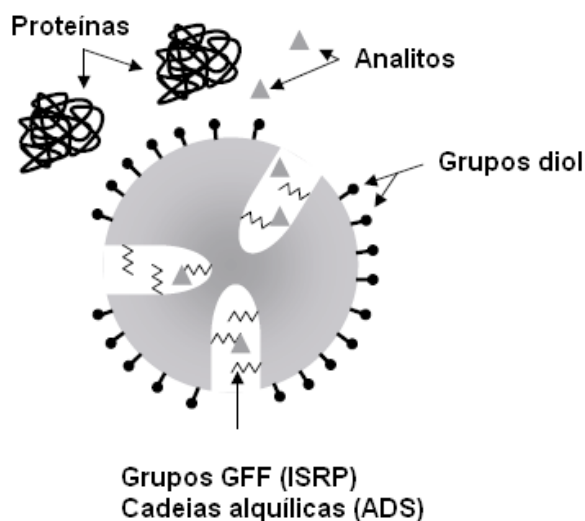
2.3 RAM (MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO)

Meios de extração mais simples e que envolvam um menor número de etapas no preparo de amostras são cada vez mais desejados para tornar o processo mais rápido e diminuir a perda do analito. Deste modo, os métodos de extração direta têm sido cada vez mais estudados, pois minimizam a perda de amostra, tornam a extração mais rápida e minimizam os erros.¹³ Mediante o exposto tem-se destaque para os materiais de acesso restrito (RAM- *Restricted Access Materials*) que possibilitam o preparo de amostra em apenas uma etapa.

O uso do termo meio de acesso restrito foi introduzido em 1991 por Desilets e colaboradores.³⁵ O termo designa partículas que possuem a capacidade de excluir ou apenas interagir superficialmente com macromoléculas, ocasionando pequena ou nenhuma interação entre as partículas que constituem o material e as macromoléculas, porém, estes materiais retêm em seus poros analitos com massa molecular pequena. Posteriormente, a eluição do analito de interesse é efetuada e o eluato é injetado no sistema cromatográfico para quantificação.³⁵⁻³⁷

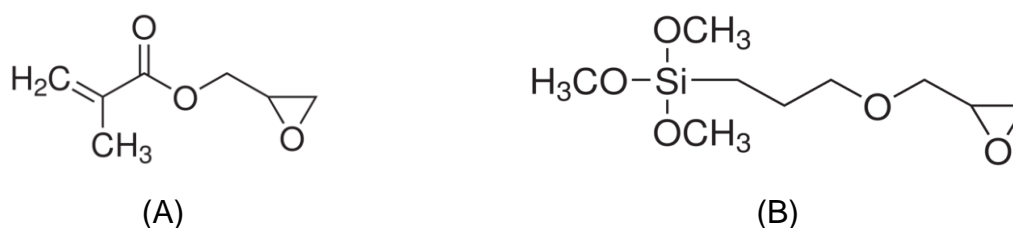
Uma maneira de sintetizar um RAM eficiente na exclusão de macromoléculas é inserir grupos hidroxila na superfície do material, criando uma superfície altamente hidrofílica. Neste caso, como as superfícies do RAM e de macromoléculas (como as proteínas) são hidrofílicas, estas sofrem hidratação e, como consequência, as moléculas de água na interface RAM-macromolécula previnem ou diminuem a interação das macromoléculas na superfície do RAM.³⁹ O interior dos poros destes RAM possui propriedades hidrofóbicas por conter grupos alquílicos e, portanto, permitem a retenção de analitos com baixa polaridade. A Figura 8 apresenta a representação esquemática de um RAM comercialmente disponível com propriedades hidrofílicas (Alquil Diol Sílica- ADS). Este material é constituído de sílica porosa modificada com grupos alcoólicos (poliglicidol) em sua superfície e, nos poros, os grupos hidrofóbicos.³⁷

Figura 8 – Representação esquemática de um RAM do tipo ADS.³⁷



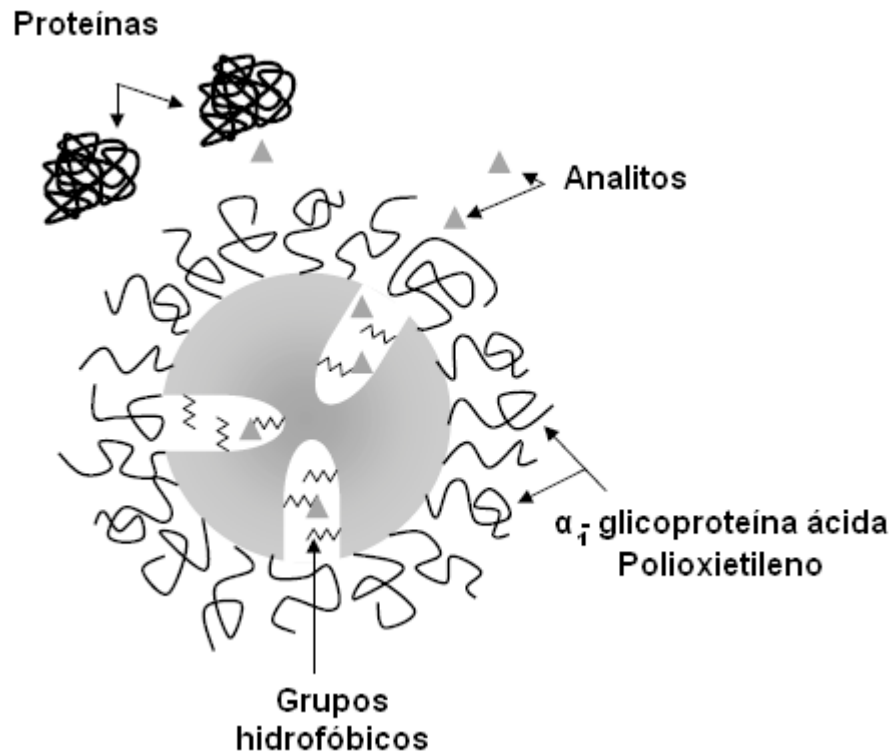
Recentemente, novos estudos têm reportado o preparo de RAM com superfície hidrofílica empregando moléculas que possuem o grupo epóxi em sua estrutura, tais como o glicidil metacrilato, Figura 9A, ou o (3-glicidiloxipropil)trimetoxissilano, Figura 9B. Após o término da síntese do RAM realiza-se a abertura do anel epóxi para obtenção de dióis, os quais atribuirão características hidrofílicas ao material sintetizado.³⁶⁻³⁸

Figura 9 – Estrutura (A) glicidil metacrilato e (B) (3-glicidiloxipropil)trimetoxissilano.



Os RAM podem também ser preparados immobilizando proteínas, como a α_1 -glicoproteína ácida em suportes sólidos de C_{18} (Figura 10).^{40,41} Nestes materiais a exclusão das proteínas contidas na amostra pelo RAM é resultado da repulsão eletrostática entre as proteínas (imobilizada e na solução) mediante adoção adequada do pH de extração em função do ponto isoelétrico das proteínas.

Figura 10 – Representação esquemática de um RAM obtido por revestimento com α_1 -glicoproteína ácida.³⁷

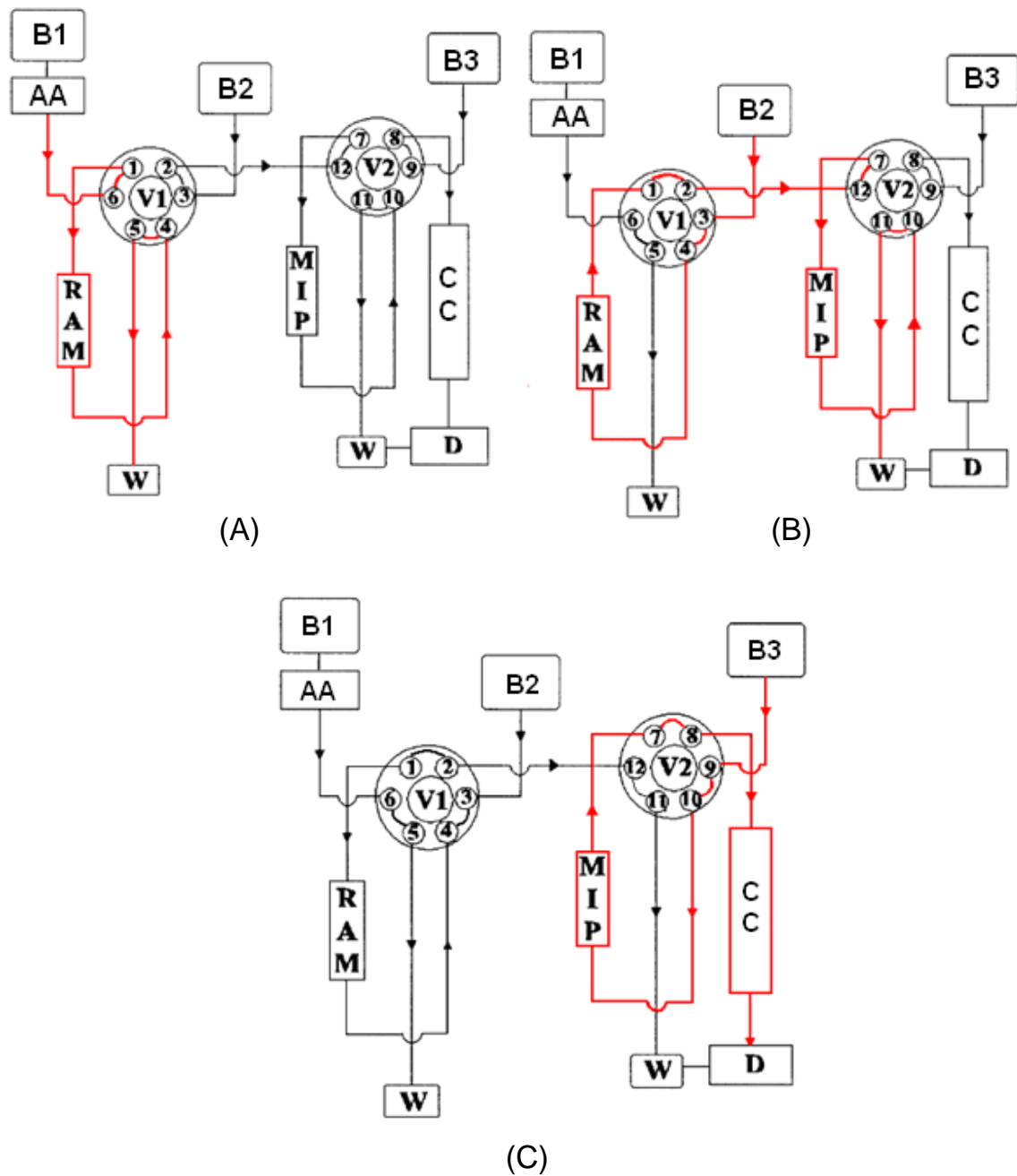


2.4 MIP-RAM (POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS- MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO)

Mediante as características dos MIP e dos RAM algumas estratégias são reportadas na literatura para unir as vantagens destes materiais fazendo uso de duas colunas em série. No trabalho de Boos e Fleischer, foi desenvolvida uma metodologia para a determinação *on-line* de tramadol em plasma humano por CLAE. Nesse trabalho, uma das colunas utilizadas foi recheada com o sorvente comercial RAM LiChrospher ADS RP-18 (25 μ m, 25 x 4 mm i.d.) e a outra com o MIP orgânico de tramadol. O MIP foi sintetizado utilizando a molécula molde (tramadol), o monômero funcional ácido metacrílico (MAA), o agente de ligação cruzada etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e o iniciador radicalar 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN). O procedimento de SPE foi acoplado *on-line* ao sistema cromatográfico conforme Figura 11. A amostra de plasma é bombeada diretamente para a coluna de RAM pela fase móvel, sendo o efluente, contendo as proteínas, descartado (Figura 11A). Em seguida, por meio do acionamento da segunda válvula de injeção o tramadol retido no RAM é eluído em direção à coluna de MIP onde é retido

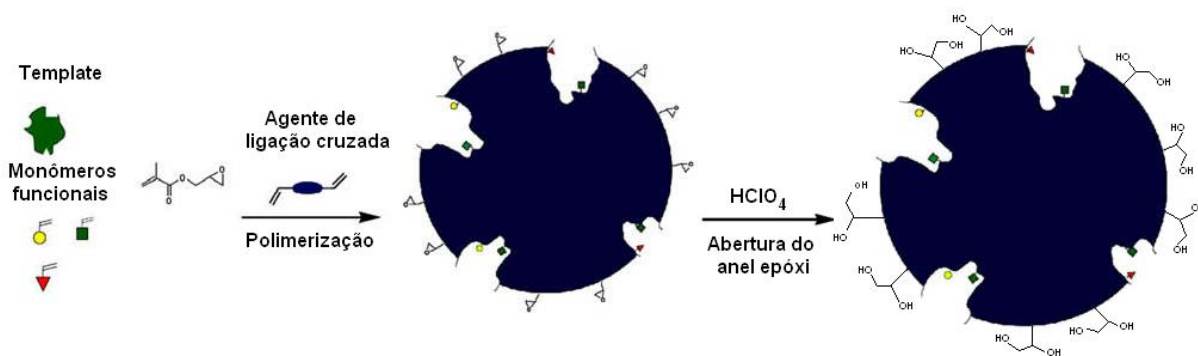
seletivamente (Figura 11B). Posteriormente, a desorção do tramadol sorvido no MIP é feita diretamente no sistema de separação cromatográfica (Figura 11C). Ao utilizar o método descrito, apenas o pico do analito foi observado indicando satisfatória limpeza da amostra.⁴²

Figura 11 – Extração em fase sólida on-line utilizando uma coluna contendo o MIP e outra coluna contendo o material RAM. AA- auto amostrador; B1, B2 e B3- bombas; W- descarte; CC- Coluna cromatográfica; V1 e V2- válvulas e D- detector.⁴²



Outra alternativa para unir as propriedades dos MIP e RAM baseia-se no emprego de um único material (MIP-RAM) que reúne as propriedades de ambos os materiais. Estes materiais foram combinados pela primeira vez por Sanbe e Haginaka em 2003, os quais sintetizaram um MIP-RAM orgânico para propranolol utilizando MAA (monômero funcional), EGDMA (agente de ligação cruzada) e uma mistura 1:1 do modificador de superfície (glicerol monometacrilato e glicerol dimetacrilato). Este material apresentou satisfatória exclusão de albumina sérica bovina e elevado coeficiente de seletividade relativo. Este polímero foi aplicado para separação dos enantiômeros R e S de Alprenolol em plasma de rato.⁴³ A Figura 12 apresenta uma representação esquemática da síntese de um MIP-RAM.³⁸

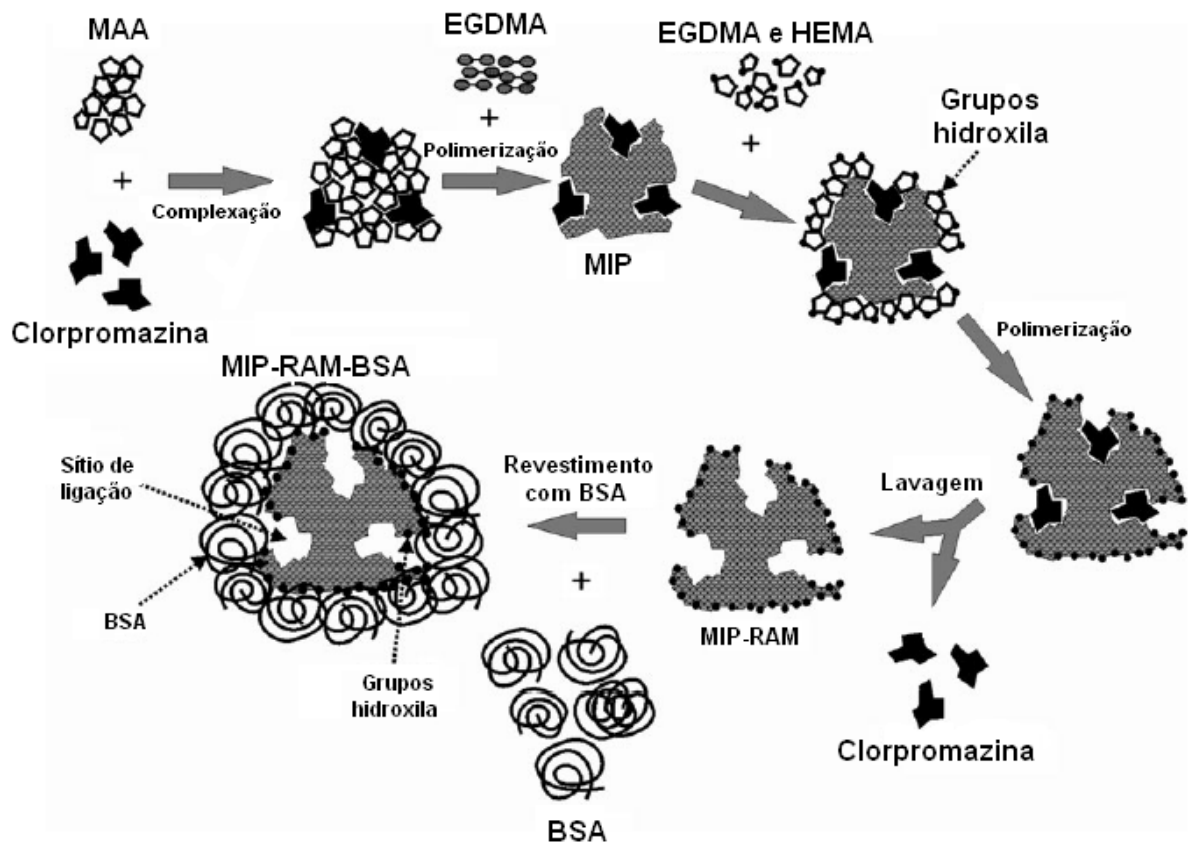
Figura 12 – Representação esquemática da síntese de um MIP-RAM.³⁸



Du e colaboradores sintetizaram um polímero orgânico MIP-RAM para extração de 2-metoxiestradiol em plasma de rato com quantificação por CLAE. Os autores utilizaram como reagentes o MAA, EGDMA e o glicidil metacrilato (GMA, co-monômero). Após a polimerização foi realizada a abertura do anel epóxi do GMA com ácido perclórico, de modo a tornar a superfície do material hidrofílica. O material obtido foi utilizado para determinação de 2-metoxiestradiol em plasma de rato, na qual foi observada melhor limpeza cromatográfica após a passagem da amostra por um cartucho contendo o MIP-RAM, em relação às limpezas obtidas pela passagem da amostra por cartuchos de C₁₈ e NIP-RAM.¹⁴ Apesar dos MIP-RAM serem materiais com propriedades seletivas e de exclusão de macromoléculas com potencialidades analíticas já comprovadas, o emprego desses materiais e/ou a síntese de novos materiais tem sido pouco difundida.^{14,15}

Moraes e colaboradores sintetizaram um MIP-RAM orgânico revestido com BSA (MIP-RAM-BSA), cujo revestimento tem a função aditiva aos grupos hidrofílicos presentes no material para excluir macromoléculas. A representação esquemática da síntese do MIP-RAM-BSA é apresentada na Figura 13. No procedimento de síntese a molécula molde (clorpromazina) foi dissolvida em clorofórmio na presença do monômero funcional (ácido metacrílico). Posteriormente, foi adicionado ao meio o agente de ligação cruzada (etilenoglicol dimetacrilato) e o iniciador radicalar (2,2'-azo-iso-butironitrila). A mistura foi borbulhada com gás nitrogênio e submetida ao aquecimento a 60 °C por 60 minutos em frasco fechado. Na sequência, foram adicionados ao meio os co-monômeros hidrofílicos glicérol dimetacrilato e o hidroximetil metacrilato, e submetidos à polimerização à 60°C por 24 horas. Após a síntese o material obtido (MIP-RAM) foi acondicionado em cartucho de SPE e lavado com 60 mL de metanol: ácido acético 4:1 (v/v), 30 mL de metanol e finalmente com 60 mL de metanol:tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,1 (80:20, v/v) para remoção da molécula molde. Para imobilização da BSA na superfície do MIP-RAM uma solução de BSA 1% (m/v) tamponada com tampão fosfato 50,0 mmol L⁻¹ pH 6,0 foi percolada através do cartucho contendo 1,0 g de MIP-RAM. Posteriormente, percolou-se uma solução de glutaraldeído 25% (m/v) e após 5 horas percolou-se uma solução de borohidreto de sódio 1% (m/v). Os autores realizaram o mesmo procedimento de síntese sem a presença na molécula molde (NIP-RAM-BSA). A fim de avaliar a capacidade máxima de adsorção do MIP-RAM-BSA e do NIP-RAM-BSA foram construídas isoterma de adsorção. Observou-se que o polímero com impressão química apresenta capacidade máxima de adsorção para clorpromazina 3,8 vezes maior quando comparado com o material sem impressão química. O MIP-RAM-BSA apresentou satisfatória capacidade de eliminação de macromoléculas de 99%, sendo utilizado para a determinação de clorpromazina em duas amostras de plasma humano.⁴⁴

Figura 13 – Representação esquemática do processo de síntese do MIP-RAM-BSA.⁴⁴

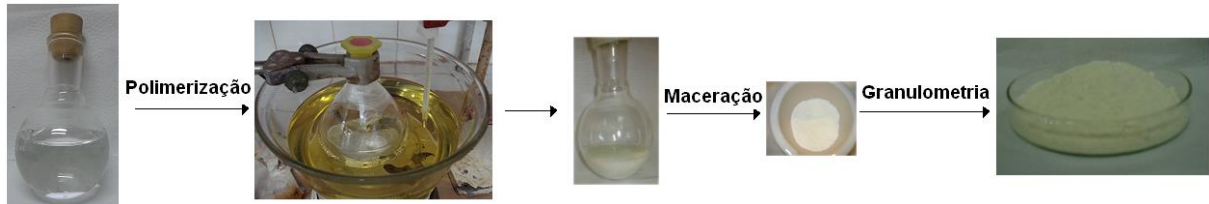


2.5 MÉTODOS DE POLIMERIZAÇÃO

A síntese de polímeros orgânicos pode ocorrer por vários métodos: meio homogêneo (conhecido como *bulk*), suspensão e precipitação. A metodologia utilizada para a obtenção dos polímeros é o que rege as características do mesmo. Dentre as metodologias citadas o método mais utilizado é o de polimerização em *bulk* (Figura 14), que consiste na reação em meio homogêneo entre o monômero funcional, a molécula molde, o solvente porogênico, o agente de ligação cruzada e o iniciador radicalar. A polimerização é realizada em atmosfera inerte com aquecimento ou na presença de radiação ultravioleta. O material obtido é rígido exigindo trituração e separação em diferentes tamanhos de partículas. A grande vantagem deste método de polimerização é a simplicidade, pois o parâmetro mais importante na síntese é a presença elevada do agente de reticulação, conforme já mencionado, para garantir a obtenção de partículas grandes e rígidas, quando comparado com os métodos de polimerização por precipitação e suspensão. Apesar

de ser um método simples de polimerização o material obtido é rígido mecanicamente e necessita de trituração. A trituração do material forma partículas irregulares que podem apresentar perda de mais de 50% dos sítios seletivos criados pela impressão molecular.^{11,45}

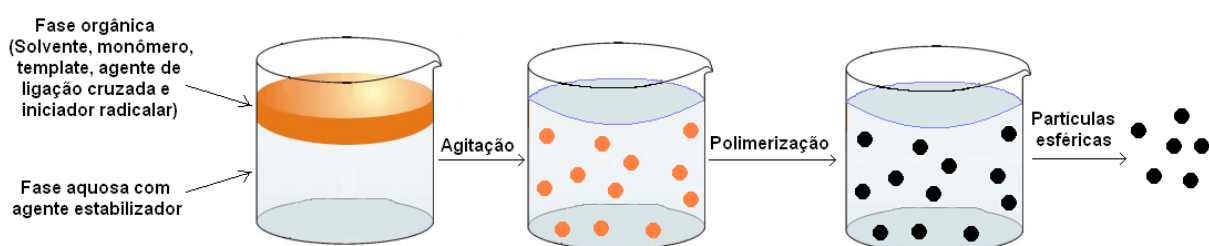
Figura 14 – Representação esquemática do método de polimerização em *bulk*.



A polimerização por precipitação é semelhante ao método *bulk*. Entretanto, faz uso de um grande volume de solvente para impedir a formação de material rígido que ocupe todo o espaço do frasco reacional e forma partículas esféricas regulares. A grande vantagem da utilização desta metodologia para a obtenção de um polímero molecularmente impresso consiste em não ser necessária a trituração do material obtido, o que não ocasiona a perda de sítios seletivos.^{11,42}

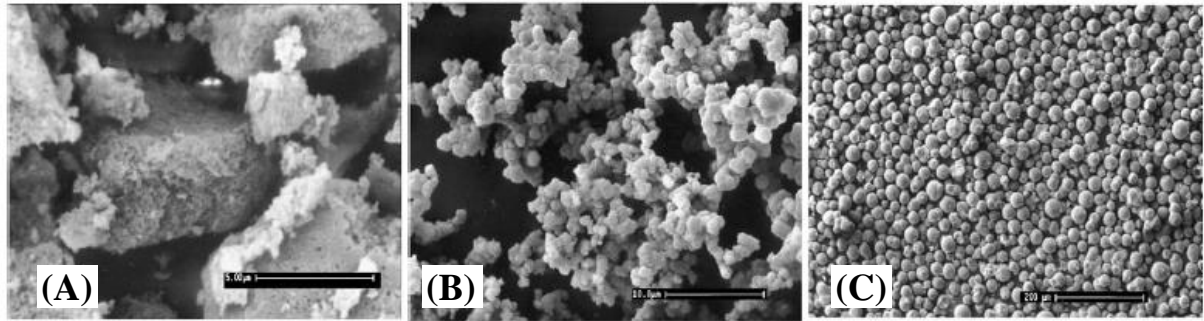
A polimerização por suspensão é realizada pela solubilização do monômero funcional, molécula molde, agente de ligação cruzada e o iniciador radicalar em um solvente orgânico apolar. Nesta solução é adicionado um agente estabilizador, como álcool poli(vinílico), solubilizado em água. O meio heterogêneo formado é agitado mecanicamente ocorrendo formação de gotas dispersas (contendo os reagentes de síntese) na fase imiscível. Em seguida o frasco reacional é submetido ao aquecimento ou radiação ultravioleta. Dentro das gotas formadas ocorre a polimerização e após término da síntese obtêm-se partículas poliméricas esféricas (Figura 15).¹¹

Figura 15- Representação esquemática do método de polimerização por suspensão.



A Figura 16 apresenta os aspectos morfológicos de polímeros obtidos por *bulk*, precipitação e suspensão, onde se observa que as características morfológicas são altamente influenciadas pelo método de polimerização utilizado.⁴⁶

Figura 16 – Micrografias eletrônicas de varredura dos métodos de polimerização (A) em *bulk*, (B) por precipitação e (C) suspensão.⁴⁶

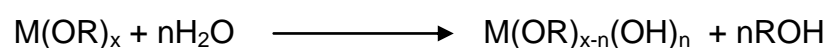


2.6 PROCESSO SOL-GEL

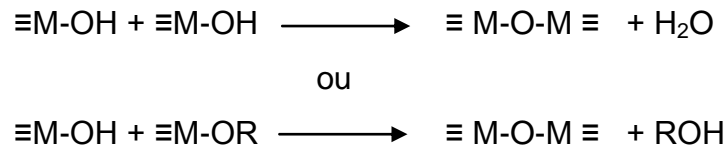
O processo sol-gel consiste em um processo químico utilizado para a síntese de materiais inorgânicos, na qual ocorre a transição do estado sol para o estado gel. O estado sol consiste em partículas com tamanho variando entre 1-100 nm que se encontram dispersas em um fluido. O estado gel é definido pela formação de uma estrutura rígida de partículas coloidais que imobilizam em seu interior a fase líquida do sistema.^{47,48}

A síntese pelo processo sol-gel necessita de basicamente quatro componentes: um precursor inorgânico (alcóxido metálico ou um sal), um solvente, água e um catalisador (ácido ou básico). Os alcóxidos metálicos possuem, de modo geral, a fórmula $M(OR)_x$ na qual M representa o metal, R o grupo alquila e x o estado de oxidação do metal. Dentre os alcóxidos mais utilizados no processo sol-gel tem-se destaque para os alcóxidos de silício, alumínio, titânio e de zircônio.^{49,50}

Os alcóxidos metálicos são solubilizados em um solvente (geralmente um álcool) e, posteriormente, adiciona-se água ao meio para realizar a hidrólise do alcóxido metálico, pois a água atua como nucleófilo uma vez que a hidrólise ocorre via substituição nucleofílica bimolecular. Na hidrólise ocorre a formação de grupos silanóis reativos.^{51,52}



Após a hidrólise ocorre a condensação dos grupos silanóis, que consiste na formação de ligações entre os grupos silanóis com a liberação de água. Devido à ocorrência da condensação com os grupos hidrolisados na primeira etapa há a formação de cadeias cada vez maiores formando polímeros. Vale salientar que as reações de condensação começam antes que as reações de hidrólise cessem.^{51,52}



As características dos polímeros sintetizados por sol-gel são definidas de acordo com o tipo de catálise utilizada para a obtenção do mesmo. Quando o catalisador utilizado é ácido o polímero obtido é linear e com pequena porosidade. Entretanto, quando a catálise é realizada em meio alcalino obtém-se um polímero tridimensional e com alta porosidade.⁵³

O processo sol-gel tem-se mostrado um método de síntese atraente, pois é um método relativamente simples, necessita de condições brandas de temperatura de síntese e a natureza dos polímeros sintetizados pode ser controlada pela variação na natureza e composição dos reagentes de síntese.^{13, 54}

2.7 POLÍMEROS HÍBRIDOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS

Polímeros híbridos orgânicos-inorgânicos são definidos como materiais constituídos por dispersão em nível molecular de um óxido (geralmente de silício) e um polímero orgânico.⁵⁵ Os polímeros híbridos, obtidos pelo processo sol-gel, são classificados a partir da combinação entre as frações orgânicas e inorgânicas presentes no material como: incorporação física dos constituintes de cada fração, existência de ligações químicas entre as frações e pela combinação das duas primeiras.⁵⁶

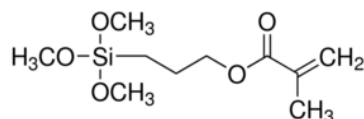
A incorporação física consiste na formação de ligações de hidrogênio, interação de Van der Waals ou interações iônicas entre as frações. A síntese de um material com estas características ocorre de três modos:

- Imobilização de compostos orgânicos na matriz inorgânica (catalisadores, corantes, entre outros). Os reagentes orgânicos são adicionados ao processo sol-gel e ficam confinados nos interstícios do material final.⁵⁶
- Monômeros orgânicos, que preenchem os poros da matriz inorgânica. Realiza-se a polimerização por aquecimento ou radiação ultravioleta para formar um material com entrelaçamento entre a fração orgânica e inorgânica.⁵⁶
- Polimerização da matriz orgânica e inorgânica concomitantemente. Neste caso, os precursores inorgânicos e monômeros orgânicos são polimerizados simultaneamente sem a formação de ligações química entre as frações.⁵⁶

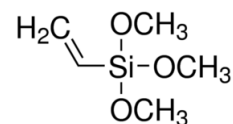
Um polímero híbrido com ligações químicas entre a fração orgânica e inorgânica é obtido, por sua vez, quando são utilizados compostos na síntese que possuem capacidade de promover reações de hidrólise e condensação (processo sol-gel), bem como reações radiculares (polimerização da fração orgânica), ocasionando ligações covalentes entre as diferentes matrizes. Reagentes com esta capacidade são conhecidos como agentes de acoplamento, pois possuem a função de acoplar as duas frações orgânica-inorgânica dos precursores funcionais.⁵⁶

O vinitrilmtoxissilano e o 3-(trimetoxissilil)propiltrimetoxissilano, (Figura 17), são agentes de acoplamento amplamente difundidos. O grupo vinílico presente nestes reagentes apresenta a capacidade de formar radicais que se unem a matriz orgânica do polímero híbrido. A união da matriz inorgânica ocorre pela hidrólise e condensação do grupamento alcóxido.⁵⁶

Figura 17 – Estrutura (A) 3-(trimetoxissilil)propiltrimetoxissilano e (B) vinitrilmtoxissilano.



(A)



(B)

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar um novo polímero híbrido MIP-RAM para ácido fólico, visando à aplicação do mesmo como sorvente em SPE para realização do *clean-up* de amostras de leite, assim como a quantificação do ácido fólico presente nessas amostras. Além de não existir relatos do emprego de MIP-RAM para extração de ácido fólico em leite, o ineditismo do presente trabalho também se refere à síntese de um material híbrido. Nestes materiais a combinação da fração orgânica monomérica com a fração inorgânica (SiO_2) pode resultar em materiais com maior estabilidade química, melhores propriedades texturais e morfológicas, além de aumentar a hidrofilicidade do material e reduzir a deposição de macromoléculas em sua superfície.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS

Um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu LC-20AD/T LPGE KIT com detector de arranjo de diodos (Tokyo, Japan) equipado com uma coluna cromatográfica C₁₈ (Shimadzu[®], 250 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm), protegida por uma coluna de guarda (Phenomenex[®], 4,0 mm x 3,0 mm e tamanho de partículas de 5 µm) e com volume de injeção de 20 µL foi utilizado para realizar as análises cromatográficas. A fase móvel foi constituída por acetonitrila (A) e tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 2,8 (B), cuja separação ocorreu no modo gradiente, iniciando com a proporção de 15% de A e 85% de B, chegando a 8,5 minutos com 24% de A e 76% de B, permanecendo até o término da corrida. Um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier modelo Shimadzu FT-IR 8300 operando no modo de transmissão entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹ foi usado para elucidar os grupos funcionais presentes nos polímeros através da utilização de pastilhas de KBr, previamente seco a 100 °C. As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro Metrohm[®] 827 pH lab. O espectrofotômetro UV-VIS PerkinElmer[®] Lambda 25 (Massachusetts, USA) foi utilizado para realização das medidas nas regiões do ultravioleta-visível. As análises termogravimétricas foram realizadas pelo aquecimento de aproximadamente 15,0 mg do polímero e seus intermediários de síntese de 30 °C à 900 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio utilizando o equipamento PerkinElmer[®] TGA 4000 (Massachusetts, USA). As características morfológicas do polímero foram avaliadas por um microscópio eletrônico de varredura JEOL[®] JSM 300-LV (Tóquio, Japão), sendo que o polímero foi previamente revestido com uma fina camada de ouro, usando o equipamento Bal-Tec[®] MED 020. As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas utilizando um microscópio JEOL[®] JEM-1400 com voltagem de aceleração de 120 kV, as amostras previamente preparadas por dispersão em etanol com sonicação por 20 minutos, posteriormente a suspensão obtida foi gotejada em grades de cobre e secas em dessecador. O estudo das constantes termodinâmicas foi realizado utilizando um banho termostático Marconi[®] MA-184 com temperaturas que foram variadas de 303,15 a 353,15 K. As análises de área de superfície, tamanho e volume de poros foram realizadas a partir do

aquecimento das amostras a 85 °C por 5 horas sob vácuo e submetidas à sorção de nitrogênio utilizando o equipamento Quantachrome[®] Nova 1200e, aos dados obtidos foram aplicados o modelo de BET (Brunauer, Emmett, Teller) para determinação da área de superfície e o modelo de BJH (Barrett, Joyner, Halenda) para determinação do volume e tamanho de poros presentes nos materiais.

4.2 MATERIAIS E SOLUÇÕES

Os reagentes empregados na síntese dos polímeros: monômero ácido metacrílico (MAA), reagente de ligação cruzada trimetilolpropano triacrilato (TRIM), iniciador radicalar 2,2'-azobis-iso-butyronitrila (AIBN), precursor inorgânico tetraetoxisilano (TEOS), (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (GTMS), agente de acoplamento viniltrimetoxisilano (VTMS) e ácido fólico (AF) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha). Os solventes e ácidos (ácido acético, ácido clorídrico, acetonitrila, metanol e etanol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] e usados sem purificação prévia. O hidróxido de potássio e o ácido tricloroacético (ATCA) foram adquiridos da Vetec[®] (São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Milli-Q[®] (Bedford, USA). A cafeína, o ácido úrico, o paracetamol e a 4-aminobenzamida utilizados no estudo de seletividade do polímero foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha).

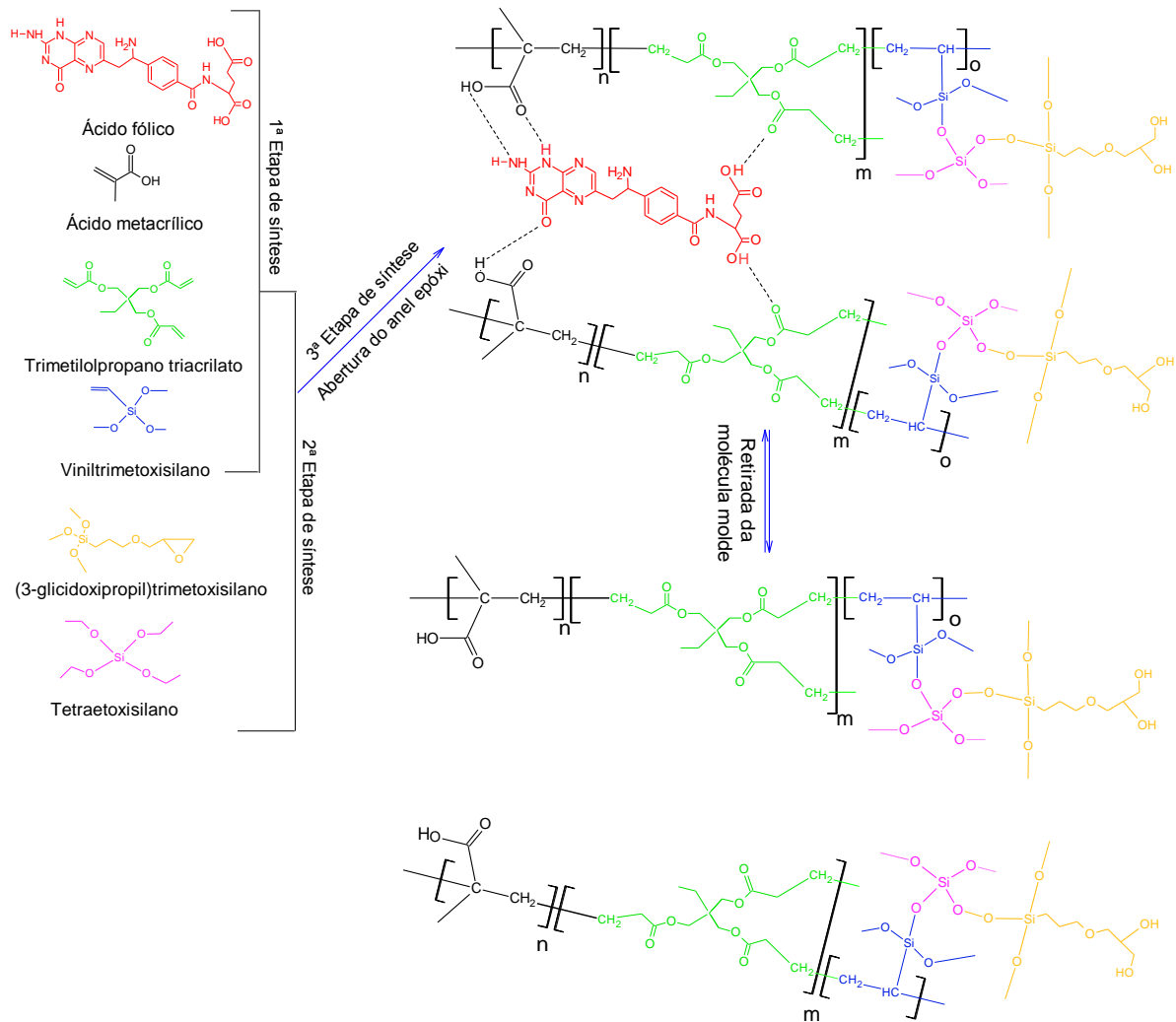
4.3 SÍNTESE DO POLÍMERO

O método de polimerização utilizado para a síntese dos materiais foi o de precipitação, uma vez que este fornece partículas esféricas regulares, que não necessitam de trituração. O ácido fólico se mostrou insolúvel em solventes orgânicos, podendo ser solubilizado apenas em meio ácido ou alcalino. Deste modo, optou-se por realizar a síntese em meio ácido, uma vez que o ácido fólico e o ácido metacrílico (monômero) se encontram protonados nesta condição, o que favorece a formação de ligações de hidrogênio entre o template e o monômero funcional. Cabe salientar que o ácido metacrílico foi escolhido como monômero funcional devido a sua solubilidade em meio ácido, o que não acontece com a 4-vinilpiridina e com o 1-vinilimidazol. A acetonitrila foi escolhida como solvente porogênico por apresentar características atraentes para a síntese de polímeros molecularmente impressos

como: miscibilidade em solução aquosa, por apresentar um ponto de ebulição intermediário e por possuir uma polaridade intermediária.

Para a síntese do polímero 2 mmol de ácido fólico (0,8828g) foram solubilizados em 100 mL de HCl 3 mol L⁻¹ e agitados por 30 minutos. Em seguida, à mistura foram adicionados 310 mL de acetonitrila e 12 mmol de MAA (1,03 mL) e submetida à agitação por mais 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 24 mmol de TRIM (7,112 g), 2,94 mmol de VTMS (0,436 g) e 600,0 mg de AIBN. Após, gás nitrogênio foi borbulhado na solução por 5 minutos e em seguida o frasco foi fechado. A mistura foi polimerizada a 60 °C por 24 horas em banho de óleo. O polímero obtido foi filtrado sob vácuo e seco em estufa por 24 horas a 60 °C, este material foi denominado poli(MAA). Na etapa seguinte, 10,054 g do polímero orgânico obtido foram ressuspensos em 300 mL de etanol com agitação mecânica e, na sequência, foram adicionados 52 mmol de TEOS, 48 mmol de GTMS e 26 mL de NaOH 1 mol L⁻¹. A mistura foi polimerizada por 24 horas a temperatura ambiente sob agitação. Após este tempo o material obtido foi filtrado sob vácuo e seco em estufa por 48 horas a 60 °C, este material foi denominado poli(MAA)-SiO₂ 1.^{57,58} A quantidade de material obtida ao final deste processo foi de 10,583 g de poli(MAA)-SiO₂ 1. Para a abertura do anel epóxi 10,000 g do poli(MAA)-SiO₂ 1 foram misturados com 500 mL de HCl 0,18 mol L⁻¹, a qual permaneceu sob agitação à 60°C em banho de óleo por 36 horas, sendo posteriormente filtrado sob vácuo e seco em estufa a 60 °C, este material foi denominado poli(MAA)-SiO₂ 2.¹⁴ A extração da molécula molde foi realizada com metanol:ácido acético (90:10, v/v) utilizando o sistema Soxhlet, este material foi denominado MIP-RAM. A mesma metodologia de síntese empregada para o MIP-RAM foi utilizada para o MIP, exceto pelo uso do GTMS. O material NIP-RAM também foi preparado e, neste caso, não foi utilizado na síntese o ácido fólico. O polímero orgânico do NIP-RAM (primeira etapa de síntese) foi denominado como poli(MAA) não impresso. A Figura 18 mostra representação estrutural do polímero MIP-RAM sintetizado.

Figura 18 – Representação estrutural do MIP-RAM sintetizado.



4.4 OTIMIZAÇÃO DE pH

A influência do pH na sorção do ácido fólico no MIP-RAM foi realizada utilizando o método em batelada. Foram agitados por 60 minutos 50,0 mg do MIP-RAM com 40 mL de solução de ácido fólico 10 mg L^{-1} , em diferentes valores de pH (1,5; 4,4; 5,4; 6,4; 7,4; 8,4; 9,4 e 10,4). Os tampões utilizados na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foram: solução de KCl/HCl (pseudo tampão para o pH 1,5), tampão acetato (pH 4,4 e 5,4), tampão fosfato (pH 6,4 e 7,4) e tampão amoniacal (pH 8,4; 9,4 e 10,4). Após a agitação a mistura foi centrifugada com posterior filtração do sobrenadante em membrana de Nylon[®] $0,45 \mu\text{m}$ e analisada por espectrofotometria UV-VIS no comprimento de onda de 281 nm.

4.5 CINÉTICA DE SORÇÃO

Os estudos relativos à influência do tempo de contato do ácido fólico com os sorventes MIP-RAM, NIP-RAM e MIP sobre o perfil sortivo foram realizados em batelada. Cerca de 50,0 mg do polímero foram agitados mecanicamente com 40 mL de solução de ácido fólico 10 mg L^{-1} em meio de KCl/HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,5. Neste estudo os tempos de agitação estudados foram: 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 600 e 720 minutos. Posteriormente, realizou-se a centrifugação, filtração do sobrenadante em membrana de Nylon[®] $0,45 \mu\text{m}$ e análise por UV-Vis no comprimento de onda de 281 nm. A fim de investigar os mecanismos relativos à sorção do ácido fólico no MIP-RAM foram aplicados aos dados obtidos os seguintes modelos de cinética de sorção: pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, Elovich e difusão intrapartícula.

O modelo de pseudo primeira ordem é descrito pela equação de Lagergren (Equação 1), onde k_1 é a constante de pseudo primeira ordem (min^{-1}) e, Q_t e Q_e referem-se às quantidades de sorbato adsorvido no tempo t e no tempo de equilíbrio, respectivamente. Este modelo assume que a velocidade de sorção é proporcional ao número de sítios ativos energeticamente homogêneos presentes no sorvente e a diferença da concentração de saturação.⁵⁹

$$\text{Equação 1} \quad \log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - \frac{k_1}{2,303} t$$

O modelo cinético de pseudo-segunda ordem é descrito pela Equação 2, onde k_2 é a constante de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). O modelo de pseudo-segunda ordem admite que a taxa de ocupação dos sítios seja proporcional ao quadrado do número de sítios desocupados, admitindo também a existência de sítios com energias diferentes de sorção.^{60,61}

$$\text{Equação 2} \quad \frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t$$

O modelo de Elovich é descrito pela Equação 3, onde α é a taxa de sorção inicial ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$) e β a constante relacionada com a extensão da superfície de cobertura e a energia de ativação (g mg^{-1}). O modelo de Elovich prevê uma superfície heterogênea no material com energias de ativação diferentes.^{62, 63}

$$\text{Equação 3} \quad Q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t$$

O modelo de difusão intrapartícula é descrito pela Equação 4, onde k_{id} é o coeficiente de difusão intrapartícula ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0,5}$) e C a espessura da camada limite na superfície do sorvente (mg g^{-1}). O modelo de difusão intrapartícula pode apresentar até três inclinações. A primeira inclinação é relacionada com a difusão do analito da solução para a superfície externa do material. A segunda inclinação é relacionada com a sorção gradual no interior do material, conhecida como difusão intrapartícula. A terceira inclinação consiste na etapa, na qual o equilíbrio de sorção é atingido.⁶⁴⁻⁶⁷

$$\text{Equação 4} \quad Q_t = k_{id} t^{0,5} + C$$

4.6 CONSTANTES TERMODINÂMICAS

O estudo termodinâmico do processo de sorção do ácido fólico no MIP-RAM foi realizado através da agitação mecânica de 50,0 mg do MIP-RAM com 40 mL de uma solução de AF 10 mg L^{-1} por 390 minutos em temperaturas que variaram de 303,15 à 353,15 K utilizando um banho termostático. Posteriormente, a mistura foi filtrada em filtro de seringa de Nylon[®] 0,45 μm e analisadas por UV-Vis no comprimento de onda de 281 nm.⁶⁸

As constantes termodinâmicas foram calculadas a partir da Equação 5, onde a constante de distribuição (K_d) pode ser definida como a razão entre a quantidade adsorvida (mg g^{-1}) e a concentração do sobrenadante (mg L^{-1}), R representa a constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), ΔH a entalpia do sistema (ΔH) e ΔS a entropia do sistema.^{68,69}

Equação 5
$$\ln K_d = -\frac{\Delta H^{\circ}}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S^{\circ}}{R}$$

A energia livre de Gibbs (ΔG°) do sistema foi calculada a partir da Equação 6.

Equação 6
$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$$

4.7 PARÂMETROS DE SELETIVIDADE

Para o estudo de seletividade foram pesados 50,0 mg do MIP-RAM os quais foram agitados por 390 minutos com 40 mL de uma solução binária de ácido fólico e concomitantes, ambos na concentração de 10 mg L⁻¹. Os concomitantes estudados foram: cafeína (CAF), ácido úrico (AU), paracetamol (PAR) e a 4-aminobenzamida (AB), as quais possuem estruturas semelhantes aos fragmentos da molécula de ácido fólico. Após a agitação as soluções foram centrifugadas, filtradas em membrana de Nylon[®] 0,45 µm e analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis. Os comprimentos de onda utilizados foram: 272 (CAF), 283 (AU), 243 (PAR), 221 (AB) e 281 (AF) nm, com posterior deconvolução dos espectros obtidos. Os coeficientes de distribuição (K_d), de seletividade (k) e de seletividade relativo (k') foram calculados de acordo com as equações 7, 8, 9 e 10.⁶⁰

Equação 7
$$K_d = \frac{(C_i - C_f)}{C_f} \times \frac{V (mL)}{Massa (g)}$$

Equação 8
$$k_{impresso} = \frac{K_d \text{ analito}}{K_d \text{ competitivo}}$$

Equação 9
$$k_{\text{n\~{a}o impresso}} = \frac{K_d \text{ analito}}{K_d \text{ competitivo}}$$

Equação 10
$$k'_{impresso} = \frac{k_{impresso}}{k_{\text{n\~{a}o impresso}}$$

Em que C_i é a concentração inicial do AF e dos concomitantes (mg L^{-1}) da solução e C_f (mg L^{-1}) a concentração do AF e dos concomitantes no sobrenadante.

4.8 ESTUDO DE SORÇÃO DE PROTEÍNAS

O estudo de sorção de proteínas no material foi realizado pela percolação de 2 mL de uma solução de albumina sérica bovina (BSA) $1,2 \text{ g L}^{-1}$ em pH 1,5 com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, por um cartucho contendo 100,0 mg do MIP-RAM e outro cartucho com 100 mg do MIP.⁴⁰ Posteriormente, realizou-se a análise do efluente do cartucho por UV-Vis no comprimento de onda de 277 nm.³⁸ A porcentagem de exclusão foi calculada pela razão entre a absorbância do efluente do cartucho e a absorbância da solução inicial, o resultado obtido foi multiplicado por 100%. Após a percolação de BSA pelos cartuchos, foi empregada uma solução de NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para remoção da BSA remanescente no cartucho.

4.9 EFEITO *SWELLING*

O estudo do efeito *swelling* foi realizado com o intuito de avaliar a hidrofiliabilidade do MIP-RAM, NIP-RAM e MIP, por meio da absorção de água. Para este experimento 100,0 mg de cada material foram agitados com 10 mL de água ultra-pura por 24 horas, posteriormente os materiais foram filtrados em membranas de Nylon[®] sob vácuo e pesados em balança analítica. As massas iniciais e finais dos materiais foram utilizadas para calcular o teor de água de equilíbrio (TAE) determinado pela Equação 11.⁷⁰

$$\text{Equação 11} \quad TAE (\%) = \frac{(\text{Massa úmida} - \text{Massa seca})}{\text{Massa seca}} \times 100$$

4.10 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NA MATRIZ ALIMENTÍCIA

A quantificação de ácido fólico em matrizes alimentícias por CLAE requer que uma etapa prévia de extração seja realizada para viabilizar a análise.

Neste processo de extração usualmente são empregados solventes orgânicos e/ou ácidos com o intuito de precipitar as proteínas da matriz.⁷⁰⁻⁷²

Apesar dos MIP-RAM serem idealizados como materiais sorventes eficientes para utilização em amostras complexas sem requerer qualquer tratamento prévio, no presente trabalho fez-se necessário realizar uma etapa prévia de extração do ácido fólico para posterior emprego do material sorvente. Este procedimento prévio de extração ocorre em meio ácido promovendo a precipitação das proteínas do leite. No entanto, é oportuno mencionar que mesmo com a precipitação das proteínas o emprego do MIP-RAM foi necessário para obtenção de cromatogramas mais limpos, caracterizando a eficiência dos MIP-RAM no *clean-up* da amostra.

Para o preparo da amostra 2,50 g de leite em pó foram enriquecidos com uma solução de ácido fólico, de modo que a concentração final fosse de 2,0 mg L⁻¹. Posteriormente adicionou-se 10 mL de água para a solubilização do leite em pó. A fim de verificar qual seria a melhor metodologia para a extração do ácido fólico nas amostras foram utilizadas quatro diferentes metodologias.

- Metodologia 1- Saponificação dos ácidos graxos presentes na amostra com 7,5 mL de uma solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ e sonicação por 10 minutos com posterior adição de ácido tricloroacético 10% (m/v) até pH 1,5. A mistura obtida foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e aferida com água ultra-pura, a qual foi centrifugada por 10 minutos a 1600 rpm. A partir do sobrenadante obtido 5 mL foram filtrados em filtro de seringa de Nylon[®] 0,45 µm, evaporados até a secura à 60 °C, recuperados na fase móvel e injetados no sistema cromatográfico.

- Metodologia 2- Esta metodologia consistiu em realizar o mesmo procedimento da metodologia 1, exceto pela substituição do ácido tricloroacético por HCl 0,5 mol L⁻¹.

- Metodologia 3- A execução desta metodologia foi realizada conforme a metodologia 1 porém, sem a etapa de saponificação com adição de KOH 0,1 mol L⁻¹, o qual foi substituído 7,5 mL de água.

- Metodologia 4- A execução desta metodologia foi realizada conforme a metodologia 2 porém, sem a etapa de saponificação com adição de KOH 0,1 mol L⁻¹, o qual foi substituído 7,5 mL de água.

4.11 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EMPREGANDO MIP-RAM

Inicialmente, um cartucho de SPE foi recheado com 100,0 mg de MIP-RAM. Para avaliar o procedimento de extração em fase sólida foram estudadas quatro etapas:

- 1ª etapa- condicionamento do sorvente com 10 mL de água ultrapura.
- 2ª etapa- percolação de 10 mL de extrato da amostra pelo cartucho para retenção do analito e concomitantes.
- 3ª etapa- lavagem do cartucho com 10 mL de solvente para remoção dos interferentes. Nesta etapa foram testados os seguintes solventes d
- e lavagem: acetona, diclorometano, clorofórmio, hexano, acetona:diclorometano (1:1, v/v), diclorometano:etanol (1:1, v/v) e ácido acético 0,1 mol L⁻¹. Além destes experimentos, o procedimento de extração em fase sólida foi executado sem a etapa de lavagem.
- 4ª etapa- eluição do analito com 10 mL de solvente. Os solventes estudados para a eluição do cartucho foram: etanol, isopropanol, acetato de etila, fase móvel (acetonitrila:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 2,8, 15:85, v/v) e a fase móvel em pH 5,7 (acetonitrila:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 5,7, 15:85, v/v). Os volumes estudados para eluição do analito do cartucho foram: 3 mL, 2 mL, 1 mL e 0,5 mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO E ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

O MIP-RAM e os polímeros obtidos em cada etapa de síntese foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho para verificar a presença de grupos funcionais (Figura 19) e por análise termogravimétrica para monitorar mudanças de estabilidade térmica (Figura 21).

Em todos os espectros de FT-IR verificou-se a presença de uma banda larga e intensa em 3460 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H, presente no AF e/ou MAA. As bandas em 2968 e 1465 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento assimétrico do CH_3 presente no TRIM e no VTMS. A banda em 1729 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=O do AF, do MAA e do TRIM. Em 1634 cm^{-1} observa-se o estiramento C=C residual presente no MAA e TRIM. O sinal em 1388 cm^{-1} é atribuído à deformação angular fora do plano das metilas (*umbrella*), presentes no TRIM e VTMS. A banda em 1265 cm^{-1} refere-se ao estiramento COOH presente no AF e MAA. A absorção em 1161 cm^{-1} refere-se ao estiramento O-C(O)-C presente no MAA e AF. As únicas bandas que apresentaram diferenças entre os polímeros obtidos em cada etapa de síntese e o MIP-RAM foram: 1564 , 1062 e 466 cm^{-1} . Em 1564 cm^{-1} observa-se a deformação angular da ligação N-H da amina primária presente no AF, a qual foi observada apenas no poli(MAA)- SiO_2 1, o que pode ser explicado pelo fato da amina neste intermediário não estar carregada positivamente como nos outros polímeros.⁷³ As bandas em 1062 e 466 cm^{-1} são referentes aos estiramentos Si-O-Si, o que comprova a hidrólise e condensação da fração inorgânica. Devido ao não aparecimento das últimas duas bandas citadas no polímero orgânico é possível afirmar que a polimerização da fração inorgânica de fato ocorreu.^{16,74} O NIP-RAM e o MIP também foram caracterizados por FT-IR, conforme Figura 20, e seus espectros se apresentam similares quando comparados com o do MIP-RAM.

Figura 19 – Espectros de FT-IR do MIP-RAM e dos polímeros obtidos em cada etapa de síntese.

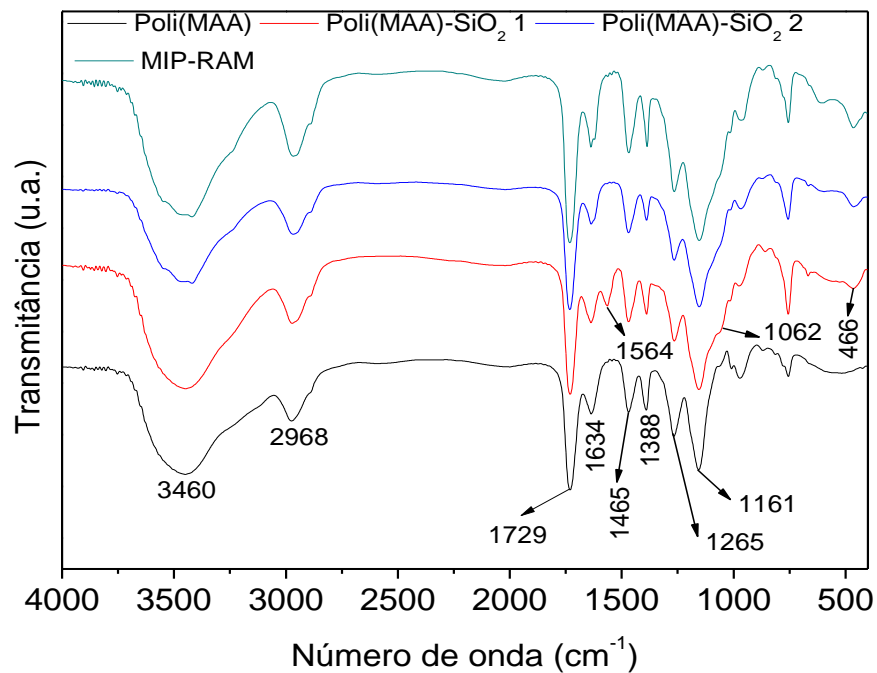
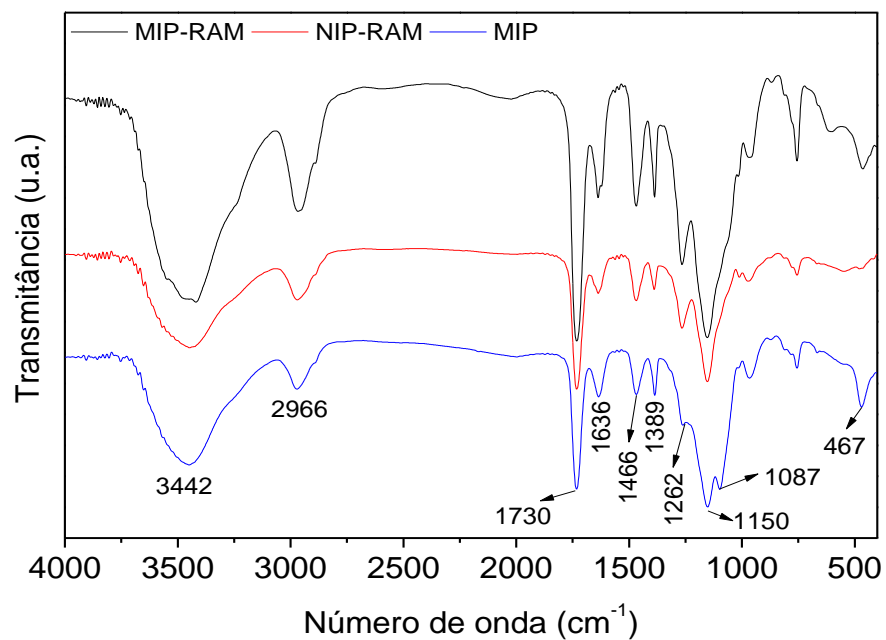


Figura 20 – Espectros de FT-IR do MIP-RAM, NIP-RAM e MIP.



Pela análise termogravimétrica também foi possível comprovar a polimerização da matriz de sílica (Figura 21), devido ao menor rendimento cerâmico que o poli(MAA) apresentou em relação aos materiais poli(MAA)-SiO₂ 1, poli(MAA)-

SiO₂ 2 e ao MIP-RAM. O MIP-RAM apresentou menor estabilidade térmica quando comparado com os polímeros obtidos nas etapas de síntese, de acordo com os valores de temperatura de onset (T_{onset} é o ponto de intersecção da linha de base extrapolada com a tangente da inclinação da curva), demonstrados na Tabela 1. A menor estabilidade térmica do MIP-RAM pode estar relacionada com a ausência do ácido fólico na estrutura do material, este quando presente forma complexos estáveis com o monômero funcional dificultando a degradação dos segmentos de cadeia.

Figura 21 – Curvas termogravimétricas do MIP-RAM e dos polímeros obtidos em cada etapa de síntese.

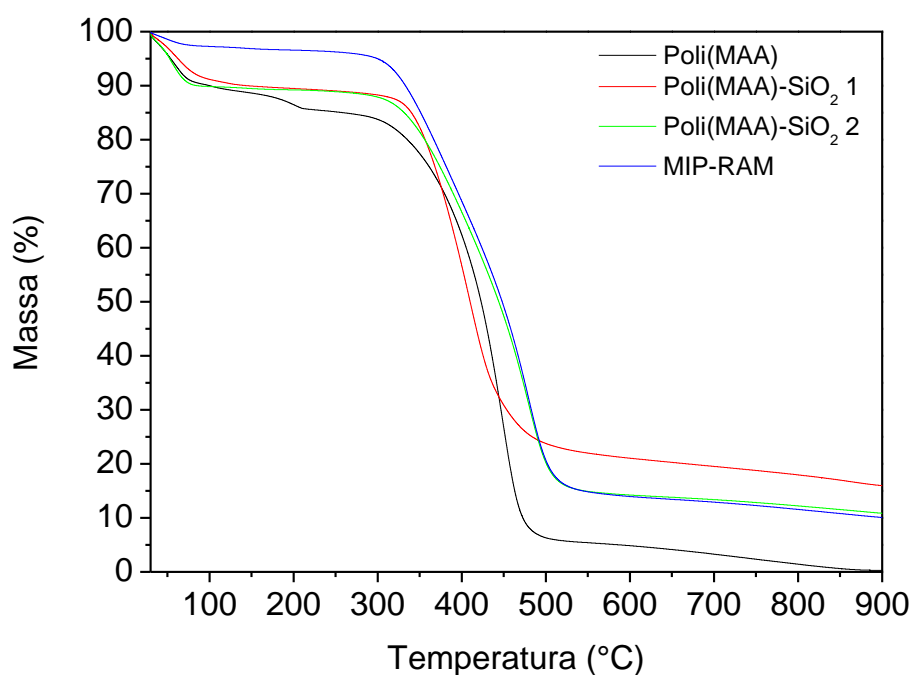


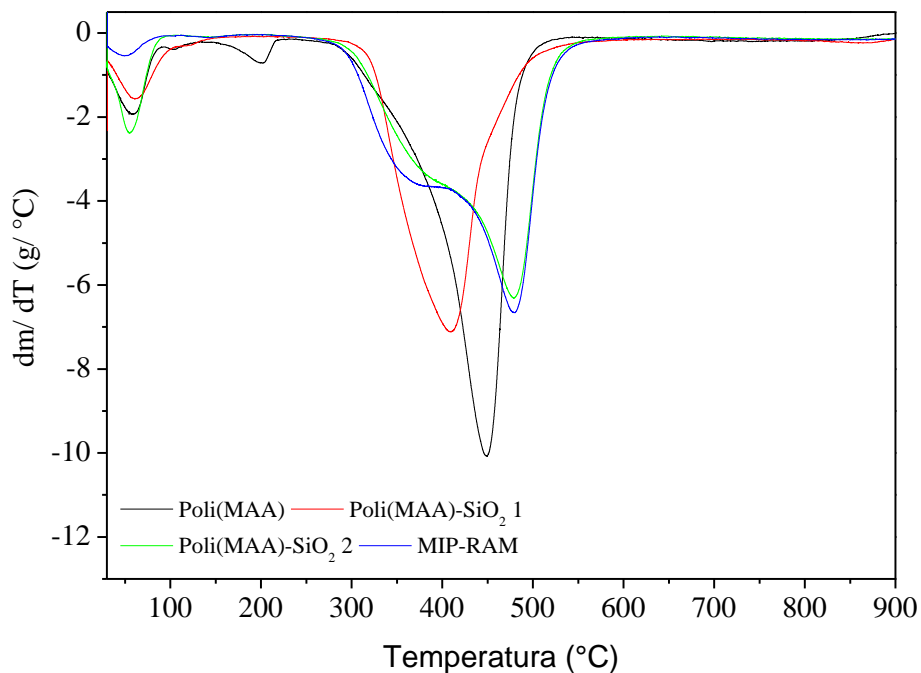
Tabela 1 – Valores de T_{onset} para o MIP-RAM e os polímeros obtidos em cada etapa de síntese.

Polímero	T_{onset} (°C)
Poli(MAA)	334,66
Poli(MAA)-SiO ₂ 1	348,66
Poli(MAA)-SiO ₂ 2	336,29
MIP-RAM	317,39

Nas curvas termogravimétricas derivadas para MIP-RAM e para os polímeros obtidos em cada etapa de síntese (Figura 22), observa-se a presença de

um evento com maior velocidade de perda de massa em aproximadamente 55 °C. Este evento é referente à água fisicamente adsorvida nos materiais, apresentando perda de massa de: 10,34%, 10,08%, 10,07% e 2,66% para o poli(MAA), poli(MAA)-SiO₂ 1, poli(MAA)-SiO₂ 2 e MIP-RAM, respectivamente.¹⁶

Figura 22 – Curvas termogravimétricas derivadas para o MIP-RAM e os polímeros obtidos em cada etapa de síntese.



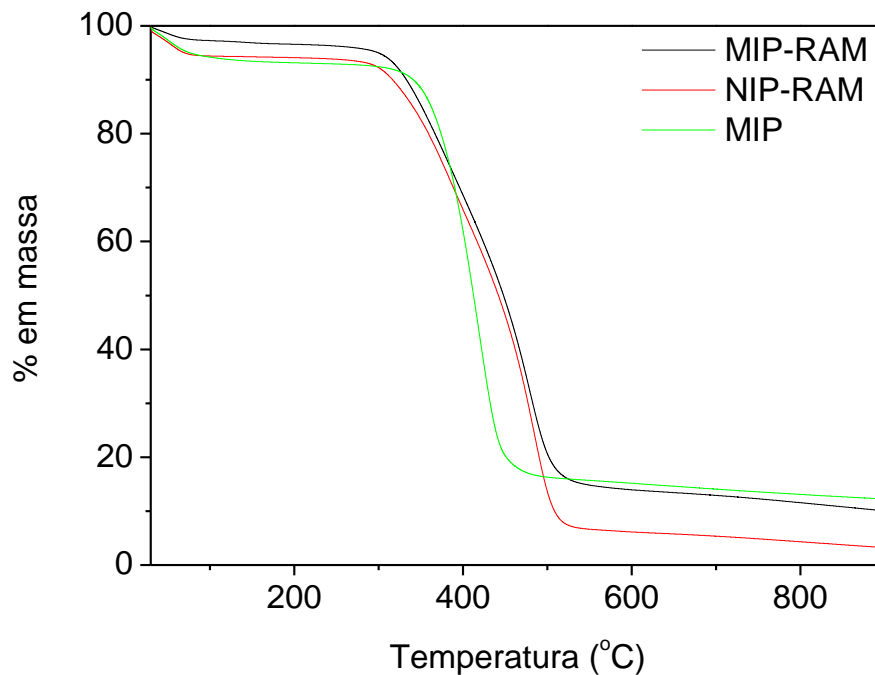
O poli(MAA) apresenta um evento na temperatura de 203,46 °C com perda de massa sutil de 3,90% atribuída a desidratação do monômero funcional MAA. O terceiro evento deste material é atribuído à decomposição do MAA e do TRIM, com perda de massa de 79,69% e com maior velocidade de perda de massa em 449,54 °C.¹⁶ O poli(MAA)-SiO₂ 1 apresentou um evento em 410,71 °C com perda de massa de 69,16%, podendo ser associada a degradação do MAA, do TRIM, do VTMS e do GTMS.

O poli(MAA)-SiO₂ 2 e o MIP-RAM apresentaram curvas termogravimétricas muito similares apresentando um segundo evento em 379,48 °C e 356,86 °C com perdas de massa de 23,99% e 26,95%, respectivamente. Estas perdas podem ser atribuídas à degradação do GTMS.^{75,76} O terceiro evento, referente à perda de MAA, do VTMS e do TRIM presente nesses materiais ocorreu

com maior velocidade de perda de massa em 480 °C com perda de 50,77% para poli(MAA)-SiO₂ 2 e 55,08% para o MIP-RAM.

As curvas termogravimétrica obtidas para o MIP-RAM, NIP-RAM e MIP apresentam T_{onset} de 317,39, 311,21 e 351,93 °C (Figura 23).

Figura 23 – Curvas termogravimétricas do MIP-RAM, NIP-RAM e MIP.

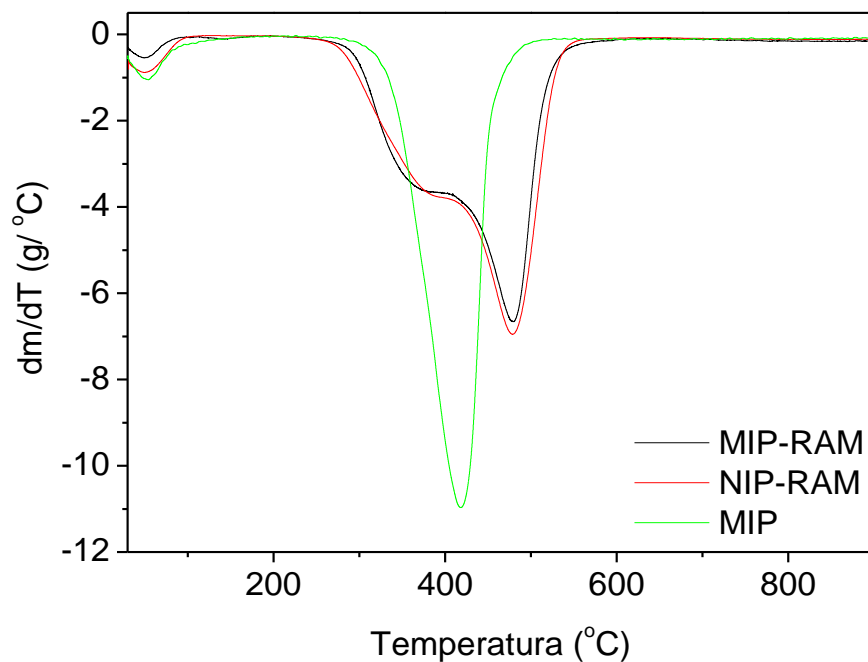


Nas curvas termogravimétricas derivadas do MIP-RAM e NIP-RAM foram observados três eventos (Figura 24). O primeiro evento ocorreu com maior velocidade de perda de massa em aproximadamente 51 °C, e refere-se à água adsorvida nos materiais representando perdas de massa de 2,65 e 5,48%, respectivamente para MIP-RAM e NIP-RAM. O segundo evento referente à degradação do GTMS ocorreu na temperatura de 356,86 °C para o MIP-RAM e 381,73 °C para o NIP-RAM com perdas de 26,95 e 30,29%, respectivamente. O terceiro evento referente a degradação do MAA, do TRIM e do VTMS ocorreu com maior velocidade de perda de massa em aproximadamente 480 °C com perdas de 55,08% (MIP-RAM) e 56,56% (NIP-RAM).^{16,75,76}

A curva termogravimétrica derivada do MIP apresentou apenas dois eventos. O primeiro evento ocorreu com maior velocidade de perda de massa em 53,75 °C com perda de 6,35% referente à água adsorvida no material. O segundo

evento com perda de 77,43% ocorreu com maior velocidade de perda de massa em 418,50 °C refere-se à degradação do MAA, TRIM e VTMS. Vale salientar que este material apresentou apenas dois eventos, pois este material não apresenta na sua estrutura o GTMS.^{16,75,76}

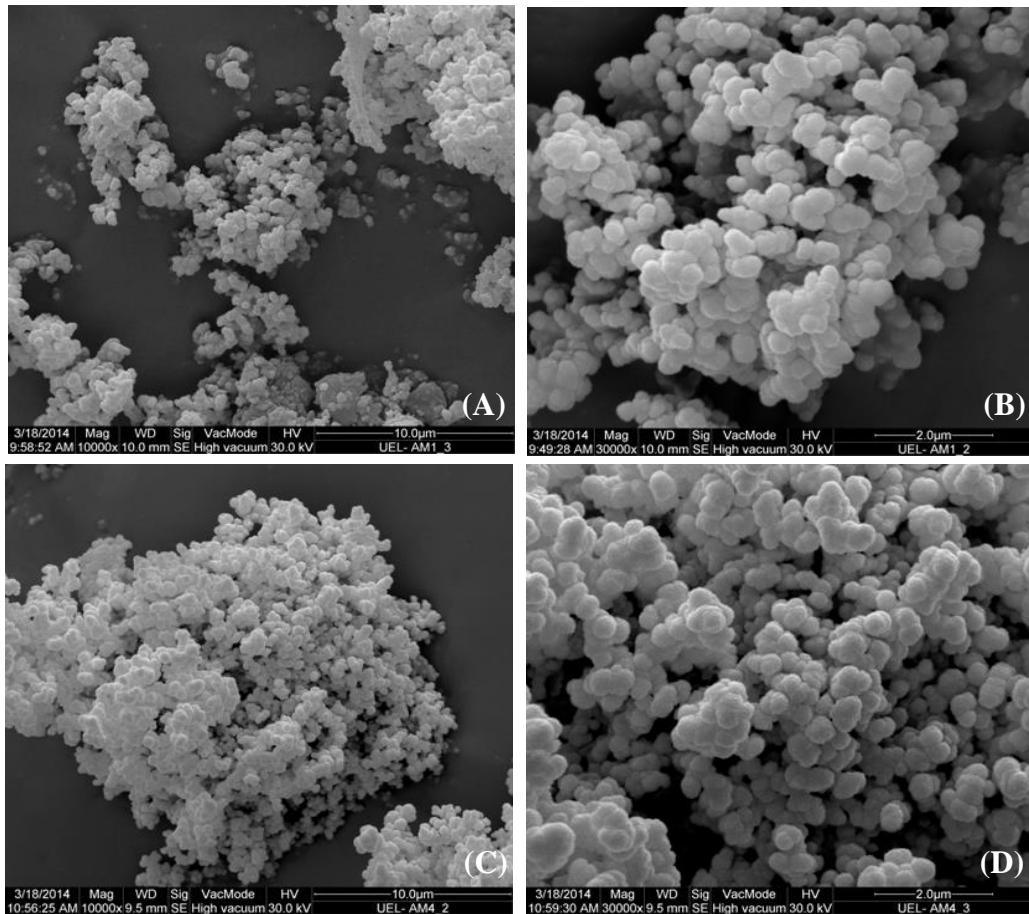
Figura 24 – Curvas termogravimétricas derivadas do MIP-RAM, NIP-RAM e MIP.



5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para o MIP-RAM e para o NIP-RAM. Nas micrografias, Figura 25, foi observada que a morfologia dos polímeros é bastante similar. As partículas regulares e agregadas obtidas são consequência do método de polimerização por precipitação. O método consiste na polimerização do monômero funcional e do agente de ligação cruzada na presença de um volume excessivo de solvente porogênico, sendo o último responsável por impedir a coalescência das partículas.⁷⁷

Figura 25 – Micrografias eletrônicas de varredura (A) e (B) do MIP-RAM e (C) e (D) do NIP-RAM.

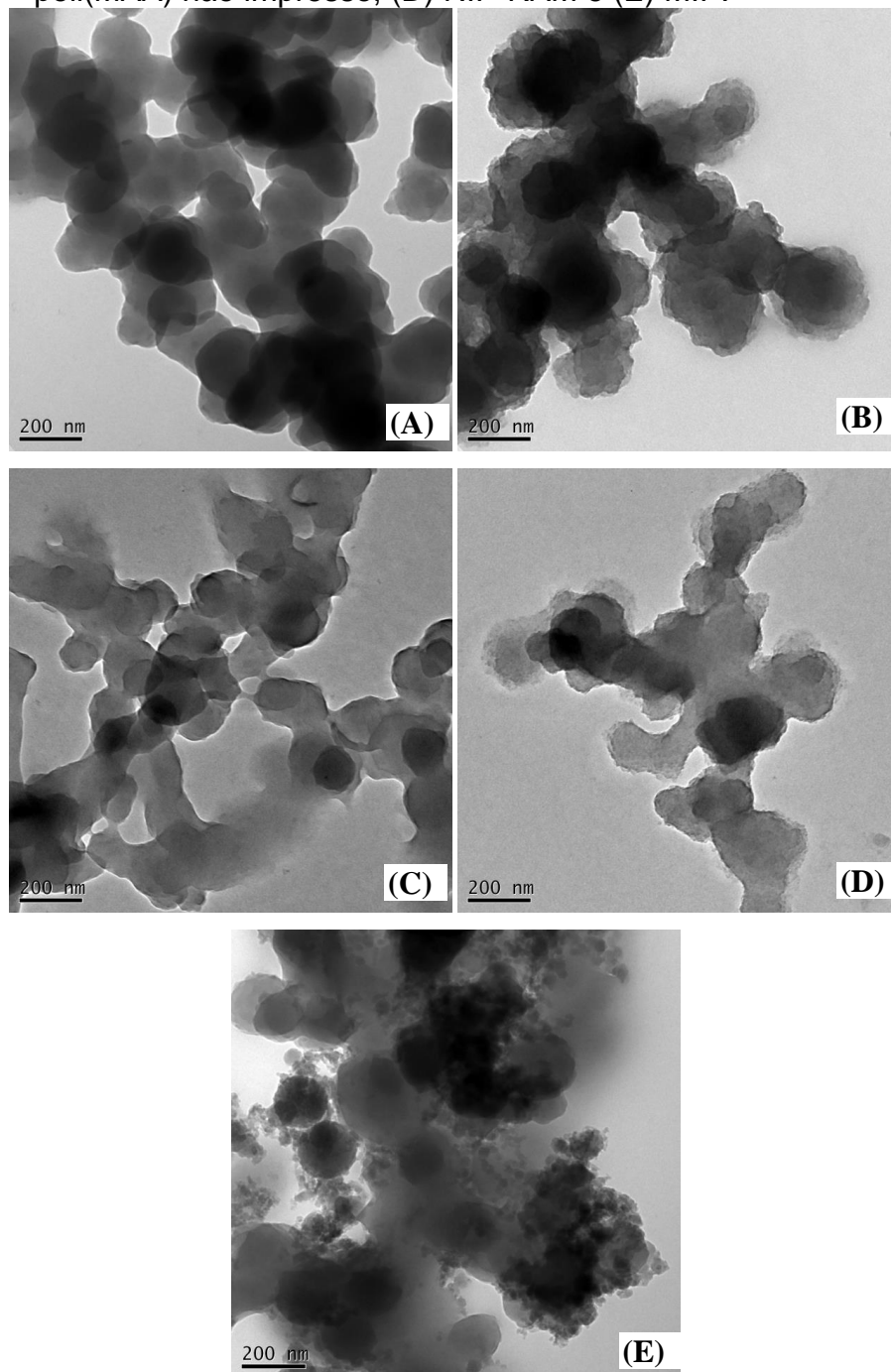


As micrografias eletrônicas de transmissão, Figura 26, para os poli(MAA) e para os polímeros MIP-RAM, NIP-RAM e MIP foram obtidas para avaliar a disposição das matrizes orgânicas e inorgânicas nos materiais.

De acordo com as micrografias eletrônicas de transmissão pode-se confirmar que as partículas dos polímeros apresentam elevada aderência entre si adquirindo propriedades morfológicas de monolitos e não de partículas isoladas, condições bastante favoráveis para o emprego destes materiais em processo de extração em fase sólida em colunas. Cabe ainda salientar que, de acordo com as Figuras 26A-D as imagens de transmissão dos materiais híbridos MIP-RAM e NIP-RAM possuem menor nitidez em comparação com o poli(MAA) e poli(MAA) não impresso, e não apresentam estrutura do tipo *core-shell*. Esta constatação revela que a matriz orgânica e inorgânica possui estrutura interpenetrante. Entretanto, a mesma característica não foi observada para o MIP (Figura 26E), pois se observou partículas com tamanhos irregulares e similares ao poli(MAA), que pode ser

atribuída à ausência do GTMS na síntese, uma vez que este pode atuar como auxiliar na reticulação da rede polimérica, favorecendo a homogeneidade do material.^{78,79}

Figura 26 – Micrografias eletrônica de transmissão (A) poli(MAA), (B) MIP-RAM, (C) poli(MAA) não impresso, (D) NIP-RAM e (E) MIP.



Os resultados das análises de área de superfície, tamanho e volume de poros estão demonstrados na Tabela 2. Ao comparar os resultados obtidos nota-

se que o MIP-RAM apresenta menor área superficial e menor volume de poros em relação ao NIP-RAM. A explicação para esta diferença morfológica pode estar relacionada à presença da molécula molde na polimerização, a qual pode aumentar a solubilidade do complexo template-monômero no solvente.⁸⁰ Como consequência, dificulta a remoção do solvente porogênico dos interstícios do polímero fazendo com que o volume dos poros seja menor e, conseqüentemente, a área superficial. Em relação ao MIP, o MIP-RAM possui menor área superficial e menor volume de poros possivelmente em função da modificação com a molécula GTMS que pode ocupar os poros do polímero e, assim, diminuir o volume de poros e área superficial. Entretanto, apesar de apresentar menor área superficial e menor volume de poros, o MIP-RAM apresenta maior capacidade sorção de ácido fólico em relação ao NIP-RAM e o MIP, como será visto no estudo de cinética de sorção. O tamanho dos poros obtidos para estes materiais podem ser classificados de acordo com a IUPAC como materiais mesoporos por possuírem tamanho de poro entre 2 e 50 nm.⁸¹

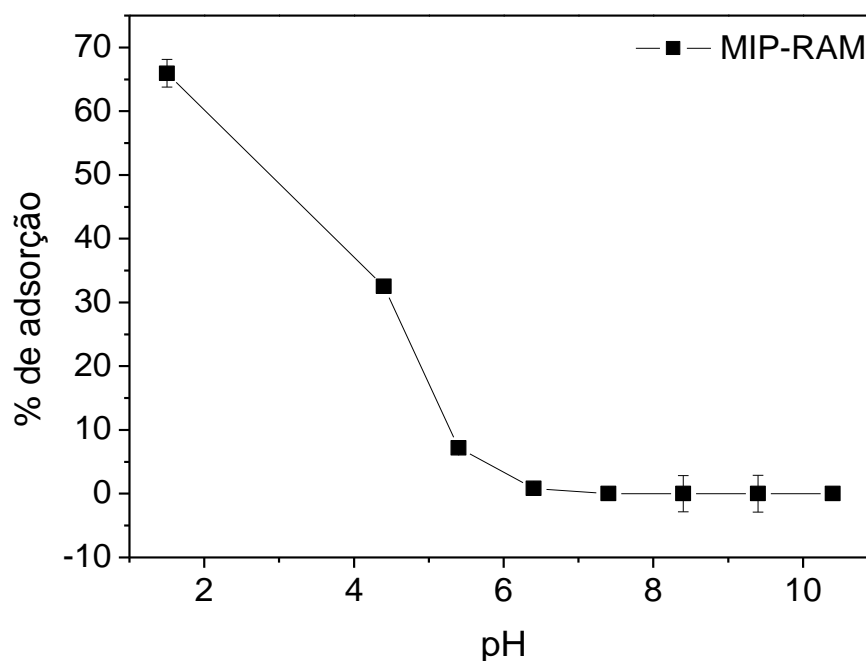
Tabela 2 – Área de superfície, volume de poros e tamanhos de poros.

Polímero	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume de poro (cm ³ g ⁻¹)	Tamanho de poro (nm)
MIP-RAM	17,5	0,039	3,04
NIP-RAM	61,0	0,114	3,32
MIP	55,3	0,103	3,35

5.3 OTIMIZAÇÃO DE PH

O perfil de sorção do ácido fólico em ampla faixa de pH é apresentado na Figura 27. A maior sorção ocorreu em pH 1,5, pois neste pH o monômero funcional se encontra protonado (ácido metacrílico pKa 4,46), o que favorece a sorção através de ligações de hidrogênio e/ou interações dipolo-dipolo momentâneo e permanente entre os grupos funcionais presentes no AF e no MAA. Assim sendo, o pH 1,5 foi adotado como o valor ótimo para sorção.

Figura 27 – Representação gráfica do estudo de otimização da sorção de ácido fólico em função do pH.

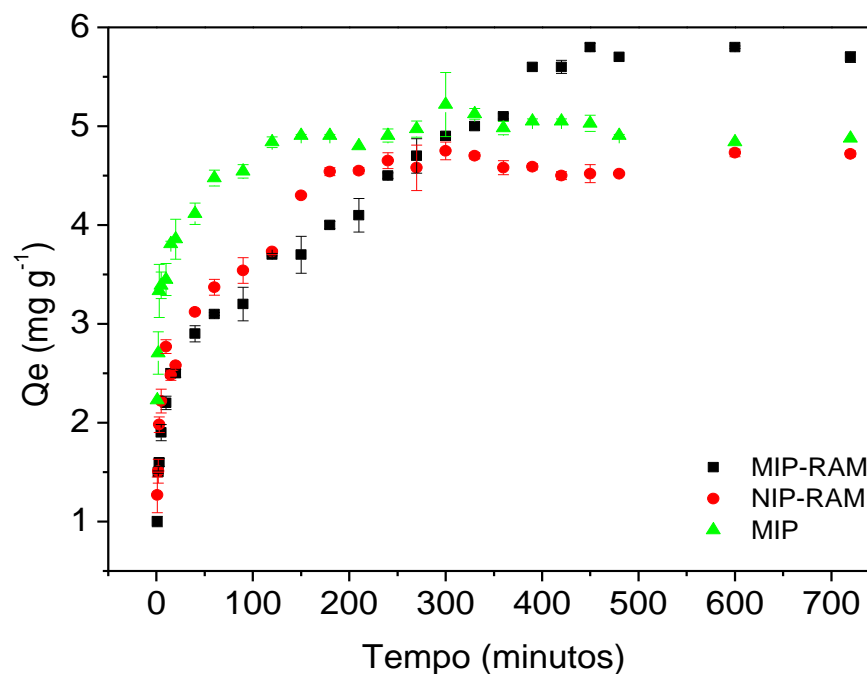


5.4 CINÉTICA DE SORÇÃO

O efeito do tempo na sorção de ácido fólico pelos materiais MIP-RAM, NIP-RAM e MIP foram avaliados pela agitação mecânica de uma solução de ácido fólico. Nesse experimento, verificou-se que os tempos necessários para atingir o equilíbrio do ácido fólico entre a fase sólida e a fase líquida foram de 390 minutos, 180 minutos e 120 minutos, respectivamente para MIP-RAM, NIP-RAM e MIP (Figura 28). Estes resultados podem ser atribuídos às diferenças morfológicas existentes entre estes materiais. O MIP-RAM apresenta características morfológicas que dificultam uma rápida transferência de massa da solução para o sítio sortivo como menor área superficial e menor volume de poros.⁸² Apesar da sorção do ácido fólico no MIP-RAM necessitar de um tempo de equilíbrio maior, a quantidade sorvida do sorvato pelo sorvente foi maior ($5,6 \text{ mg g}^{-1}$), quando comparado com o polímero sem impressão química (NIP-RAM) com sorção de $4,5 \text{ mg g}^{-1}$. Neste caso, a maior sorção de AF pelo MIP-RAM está relacionada com a maior afinidade do analito pela cavidade seletiva. O MIP, por sua vez, apresenta cavidades com afinidade pelo AF (cavidades seletivas), bem como apresenta características texturais similares ao

NIP-RAM. Estes dois fatores aliados favorecem a obtenção de um tempo de equilíbrio menor, comparado aos outros polímeros, além de uma sorção intermediária de $4,8 \text{ mg g}^{-1}$. Ainda, outro aspecto que pode ser considerado para justificar o menor tempo de equilíbrio para o MIP, resulta da ausência de GTMS (com anel aberto e grupos dióis) em sua matriz polimérica, o qual pode atuar como uma barreira química no transporte de massa do AF.

Figura 28 – Efeito do tempo na sorção de ácido fólico pelos materiais MIP-RAM, NIP-RAM e MIP.



Aos dados cinéticos foram aplicados os seguintes modelos: pseudo-primeira ordem, pseudo- segunda ordem, Elovich e difusão intrapartícula, cujos resultados obtidos na aplicação destes modelos estão mostrados na Tabela 3. De acordo com as regressões obtidas e as constantes calculadas pelos ajustes dos modelos verificou-se que os modelos que se ajustaram melhor aos dados experimentais foram o de pseudo-segunda ordem, Elovich e difusão intrapartícula (Anexo A).

Tabela 3 – Constantes calculadas para os modelos aplicados no estudo de cinética de sorção. MIP-RAM Q_e experimental= 5,6 mg g⁻¹; NIP-RAM Q_e experimental=4,5 mg g⁻¹; MIP Q_e experimental= 4,8 mg g⁻¹.

Sorvente	Pseudo primeira-ordem			Pseudo segunda-ordem			Elovich			Difusão intrapartícula		
	k_1	Q_e	R	k_2	Q_e	R	β	α	r	K_{id}	C	r
MIP-RAM	0,01	3,85	0,99	0,01	5,05	0,99	1,53	1,77	0,97	0,41	0,82	0,97
NIP-RAM	0,01	2,68	0,95	0,03	4,13	0,99	1,88	5,64	0,98	0,70	0,61	0,99
MIP	0,02	1,79	0,95	0,09	4,60	0,99	2,10	84,86	0,97	1,49	0,69	0,98

$K_1=$ é a constante de pseudo-primeira ordem do processo de sorção (min⁻¹); $K_2=$ é a constante de pseudo-segunda ordem do processo de sorção (g mg⁻¹ min⁻¹); β está relacionado com a extensão de cobertura da superfície e com a energia de ativação para quimissorção (g mg⁻¹); α é a taxa de velocidade inicial de sorção (min⁻¹ mg g⁻¹); K_{id} é o coeficiente de difusão interno (mg g⁻¹ min^{-1/2}); C é uma constante relacionada com a espessura da camada limite (mg g⁻¹).

O modelo de pseudo-segunda ordem apresentou satisfatório coeficiente de correlação linear e a sorção predita pelo modelo foi próxima aquela observada nos dados experimentais, o que não foi observado para o modelo de pseudo-primeira ordem.^{60,83} O ajuste dos modelos aos dados experimentais indica que o MIP-RAM, NIP-RAM e o MIP apresentam sítios com energias de ligação diferentes na superfície do material, corroborando com o modelo de Elovich.⁸⁴

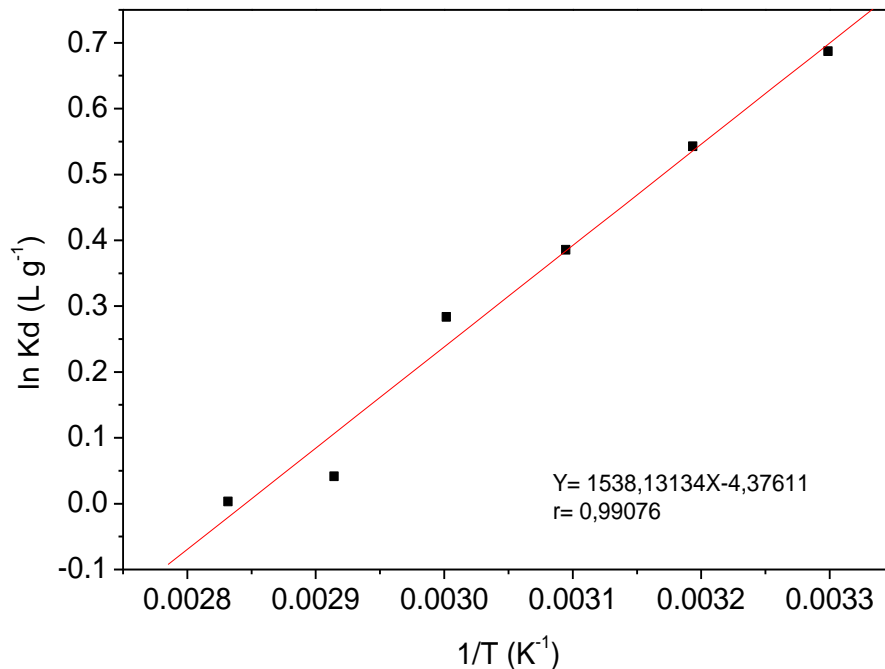
O modelo de difusão intrapartícula apresentou três inclinações. A primeira inclinação refere-se à difusão do analito da solução para a superfície externa do material. A segunda inclinação é definida como a etapa determinante da reação, a qual é relacionada com a sorção gradual no interior do material, conhecida como difusão intrapartícula. Os pontos restantes representam que o equilíbrio de sorção foi atingido (anexo A). Conforme observado na Tabela 3 os valores da constante C para os três materiais, relativos à primeira inclinação são diferentes de zero indicando que o processo de difusão intrapartícula não é o único responsável pelo processo de sorção. Como a constante C representa a espessura da camada limite pode-se inferir que a sorção do ácido fólico nos materiais também ocorre na superfície externa do material.⁶⁵⁻⁶⁷

5.5 CONSTANTES TERMODINÂMICAS

As constantes termodinâmicas do processo sortivo foram calculadas a partir do gráfico de Van't Hoff (Figura 29), a qual foi obtida pela relação entre o inverso da temperatura (K) e a razão entre quantidade adsorvida (mg g^{-1}) e concentração de sobrenadante (mg L^{-1}). O gráfico de Van't Hoff obtido forneceu a seguinte regressão linear: $\text{Ln}K_d = 1538,1314 (1/T) - 4,37611$ com $r = 0,99076$, que ao ser substituída na Equação 5 possibilitou a determinação da entalpia e da entropia do sistema. Em seguida foi calculada a energia livre de Gibbs na temperatura de 303,15 K utilizando a Equação 6. Os valores de ΔH , ΔS e ΔG da sorção de AF no MIP-RAM foram de: $-12,79 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-36,38 \text{ K}^{-1} \text{ J mol}^{-1}$ e $-1,76 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. A entalpia negativa obtida indica que o processo é exotérmico, isto implica que o processo sortivo é favorecido em temperaturas menores, característico de processos sortivos de natureza física. Além disso, pode-se inferir que a sorção do AF na superfície do material é de natureza física (fiossorção), pois o valor do ΔH obtido é menor que 40 kJ mol^{-1} . As interações de natureza física envolvem forças fracas de Van der Waals, em especial dipolo-dipolo permanente e induzido com energia variando de $2-29 \text{ kJ mol}^{-1}$ e o analito sorvido pode estabelecer interações com mais de um sítio ao longo da superfície do polímero. Estas condições são plausíveis considerando a natureza do ácido fólico e os sítios de interação que o MIP-RAM pode apresentar. Entretanto, cabe salientar que, ligações de hidrogênio entre os sítios do MIP-RAM com o ácido fólico podem também ocorrer e, segundo dados da literatura, interações desta natureza para compostos orgânicos possuem energia na faixa de $2-40 \text{ kJ mol}^{-1}$.⁸⁵ As ligações de hidrogênio, diferente das forças de Van der Waals são consideradas químicas devido à natureza da interação, mas não necessariamente consideradas quimiossorção, pois estas contemplam ligações químicas covalentes.

A entropia negativa obtida para a sorção de ácido fólico no MIP-RAM indica que o processo sortivo diminui a desordem do sistema e a energia livre de Gibbs negativa indica um processo espontâneo.^{68,69,86}

Figura 29 – Representação gráfica da relação entre o inverso da temperatura versus a razão entre quantidade sorvida e concentração de sobrenadante (gráfico de Van't Hoff).



5.6 PARÂMETROS DE SELETIVIDADE

Para comprovar se o MIP-RAM apresenta sítios sortivos com maior afinidade à molécula molde (ácido fólico), foi realizada a sorção competitiva de uma solução binária de AF:concomitante (cafeína, ácido úrico, paracetamol e 4-aminobenzamida) na presença do MIP-RAM ou NIP-RAM. As estruturas químicas dos concomitantes são apresentadas na Figura 30. As moléculas concomitantes foram escolhidas por possuírem estruturas semelhantes aos fragmentos da molécula de ácido fólico. A Tabela 4 apresenta os coeficiente de distribuição (K_d), coeficiente de seletividade (k) e coeficiente de seletividade relativo (k'). De acordo com os valores dos coeficientes de seletividade relativo superiores a 1 pode-se, inferir que a sorção do ácido fólico no MIP-RAM mesmo na presença de concomitantes acontece em sítios seletivos em detrimento ao NIP-RAM.⁶⁰

Figura 30 – Estrutura química (A) cafeína (B) ácido úrico (C) paracetamol e (D) 4-aminobenzamida.

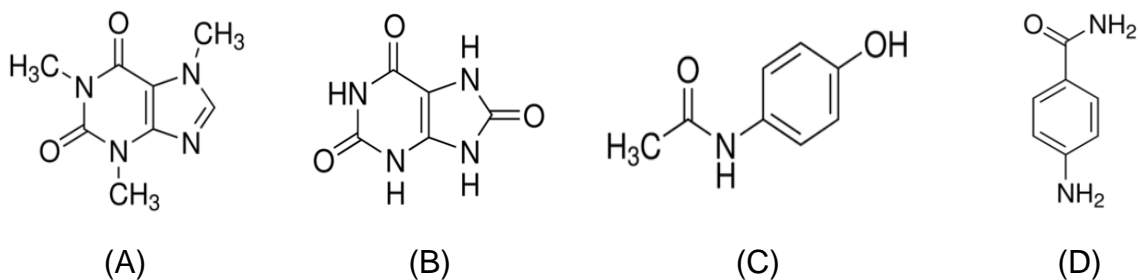


Tabela 4 – Coeficientes calculados para MIP-RAM e NIP-RAM.

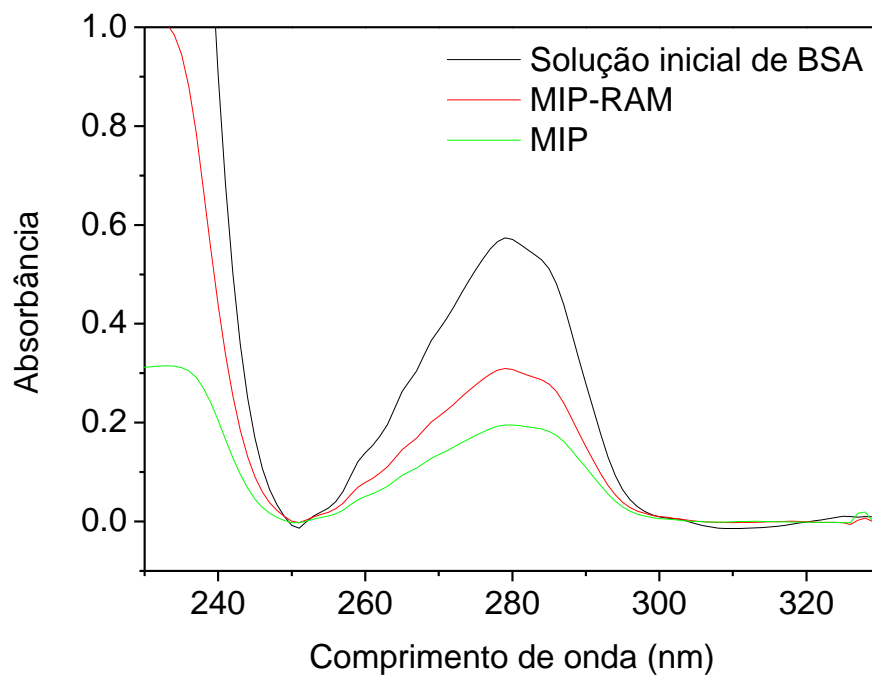
Polímero	Molécula	K_d	k	k'
MIP-RAM	Ácido fólico	979,8	17,64	1,82
	Cafeína	55,5		
NIP-RAM	Ácido fólico	890,6	9,71	1,33
	Cafeína	91,7		
MIP-RAM	Ácido fólico	4033,4	0,39	1,53
	Ácido úrico	10265,3		
NIP-RAM	Ácido fólico	3136,2	0,30	4,37
	Ácido úrico	10611,5		
MIP-RAM	Ácido fólico	1247,2	4,50	1,53
	Paracetamol	277,2		
NIP-RAM	Ácido fólico	920,4	2,93	1,53
	Paracetamol	313,9		
MIP-RAM	Ácido fólico	1173,3	33,35	4,37
	4-aminobenzamida	35,2		
NIP-RAM	Ácido fólico	867,1	7,64	4,37
	4-aminobenzamida	113,5		

Analisando a constante de distribuição para AF:cafeína nota-se que o MIP-RAM adsorve mais AF e menos cafeína quando comparado com o NIP-RAM. O mesmo perfil sortivo é observado para o paracetamol e para 4-aminobenzamida. Para o ácido úrico o MIP-RAM sorveu mais o concomitante do que o analito, entretanto pode-se observar que o NIP-RAM adsorve ainda mais ácido úrico e menos AF quando comparado com o MIP-RAM. A partir desses dados de sorção verifica-se que o MIP-RAM apresenta maior afinidade para o AF em relação aos concomitantes. Estes resultados aliados ao coeficiente de seletividade relativo comprovam a formação de sítios seletivos para o analito, pois mesmo os concomitantes apresentando estruturas semelhantes e menores que a estrutura do AF houve a sorção preferencialmente da molécula molde.

5.7 ESTUDO DE SORÇÃO DE PROTEÍNAS

O estudo de sorção de proteínas realizado com o MIP-RAM e MIP demonstraram que a porcentagem de exclusão de proteínas é de 55 ± 2 e 35 ± 2 , respectivamente. Este resultado corrobora com o princípio dos RAM, na qual a síntese de polímeros com características mais hidrofílicas tornam o material menos susceptível a sorver proteínas.³⁸ A Figura 31 apresenta os espectros UV-VIS obtidos utilizando a solução inicial e os efluentes dos cartuchos após percolação da solução de BSA.

Figura 31 – Espectros de varredura obtidos para a solução inicial de BSA e para os efluentes dos cartuchos de MIP-RAM e MIP.



5.8 EFEITO SWELLING

O estudo do efeito *swelling* (hidrofilicidade dos materiais) realizado com os materiais MIP-RAM, NIP-RAM e MIP, forneceram as porcentagens de teor de água de equilíbrio (TAE), mostradas na Tabela 5. De acordo com os valores de TAE observa-se que o MIP-RAM absorve menos água que os demais materiais NIP-RAM e MIP. A menor capacidade de absorção de água do MIP-RAM pode estar associada

à sua menor porosidade, conforme resultados similares reportados na literatura.⁸⁷ Esta constatação pode ainda ser justificada ao se observar os valores de TAE para o NIP-RAM e MIP, com valores de TAE substancialmente maiores e maior porosidade. Uma observação importante que deve ainda ser feita é que o NIP-RAM e MIP possuem propriedades texturais similares (ver Tabela 2), mas, no entanto, o NIP-RAM absorve maior quantidade de água o que pode estar associado às suas propriedades hidrofílicas mais acentuadas em relação ao MIP. Assim sendo, pode-se inferir que o MIP-RAM, embora apresente menor porosidade, com conseqüente menor absorção de água, também possui propriedades hidrofílicas em sua superfície, conforme já evidenciado pelos estudos de exclusão de BSA.

Tabela 5 – Teor de água de equilíbrio (%) para o MIP-RAM, NIP-RAM e MIP.

Polímero	Teor de água de equilíbrio (%)
MIP-RAM	156,86 ± 3,23
NIP-RAM	230,00 ± 1,21
MIP	211,43 ± 4,85

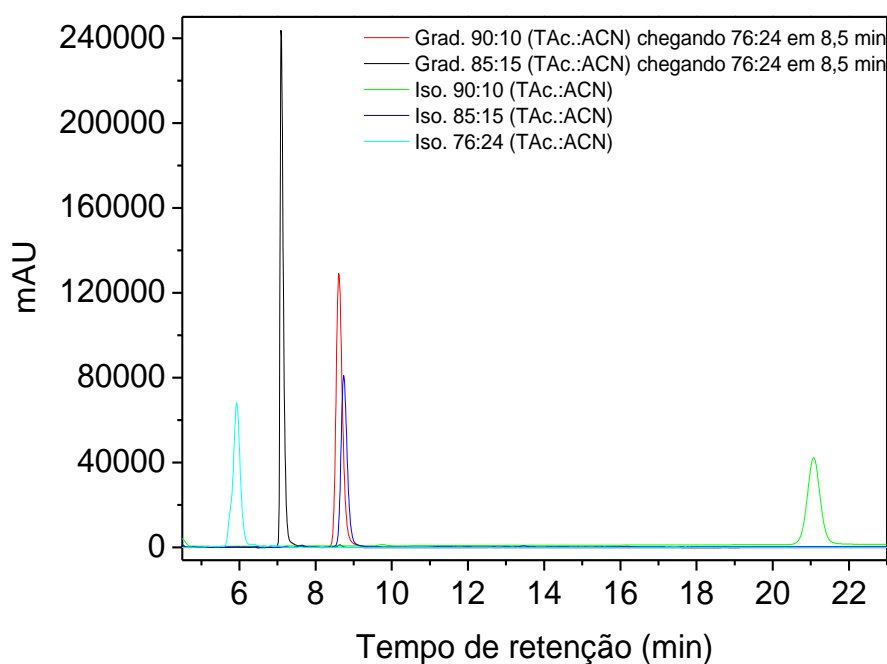
5.9 OTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL

As condições cromatográficas utilizadas para a análise de ácido fólico em leite foram baseadas nas condições estudadas por Catharino e colaboradores, sendo que as melhores composições de fase móvel foram escolhidas para realização deste estudo.⁷¹

De acordo com os cromatogramas reunidos na Figura 32, observa-se que no modo isocrático (iso) de separação, o incremento da proporção de acetonitrila (de 10 à 24%) promoveu diminuição nos tempos de retenção mas, por outro lado, observou-se um alargamento de pico quando comparados com os cromatogramas obtidos no modo gradiente (grad.). Deste modo, optou-se por utilizar o modo gradiente na separação cromatográfica, pois os picos obtidos se mostraram mais definidos e com tempos de retenção menores. Assim, dois sistemas de separação por gradiente foram avaliados (Figura 32). A corrida cromatográfica iniciada com a proporção de tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 2,8 (T. Ac.):acetonitrila (ACN) (85:15, v/v) apresentou melhores resultados em relação a proporção 90:10 (v/v). Nesta fase móvel a proporção final do gradiente foi de tampão acetato 0,266

mol L⁻¹:acetonitrila 76:24 (v/v) em 8,50 minutos, permanecendo até o término da corrida, com tempo de retenção do ácido fólico em 7,07 minutos.

Figura 32 – Cromatogramas obtidos na otimização da composição da fase móvel.



5.10 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NA MATRIZ ALIMENTÍCIA

Tendo em vista que a sorção do AF no MIP-RAM ocorre preferencialmente em meio ácido, fez-se necessário modificar a metodologia utilizada por Catharino e colaboradores para extração de ácido fólico na matriz alimentícia.⁷¹ As modificações foram necessárias para favorecer a posterior sorção do ácido fólico na MIP-RAM após sua extração da matriz alimentícia. A Tabela 6 apresenta as porcentagens de recuperação do analito após submissão aos diferentes métodos de extração. É importante mencionar novamente que os extratos obtidos após os métodos de extração, conforme seção 4.10, foram recuperados na fase móvel e injetados no sistema cromatográfico. Verificou-se que o melhor método de extração consiste na saponificação dos ácidos graxos com KOH e precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (ATCA), sendo este método empregado para a extração do ácido fólico nas amostras de leite. Os cromatogramas obtidos dos

extratos e os espectros de ultravioleta-visível do pico cromatográfico do ácido fólico são apresentados no anexo B.

Tabela 6 – Métodos de extração e suas respectivas porcentagens de recuperação de ácido fólico.

Meio de extração	% de Recuperação
KOH + HCl	82,3 ± 5,6
KOH + ATCA	94,3 ± 6,8
ATCA	73,8 ± 0,6
HCl	79,9 ± 2,5

*KOH 0,1 mol L⁻¹; ATCA= ácido tricloroacético 10% (m/v); HCl 0,5 mol L⁻¹

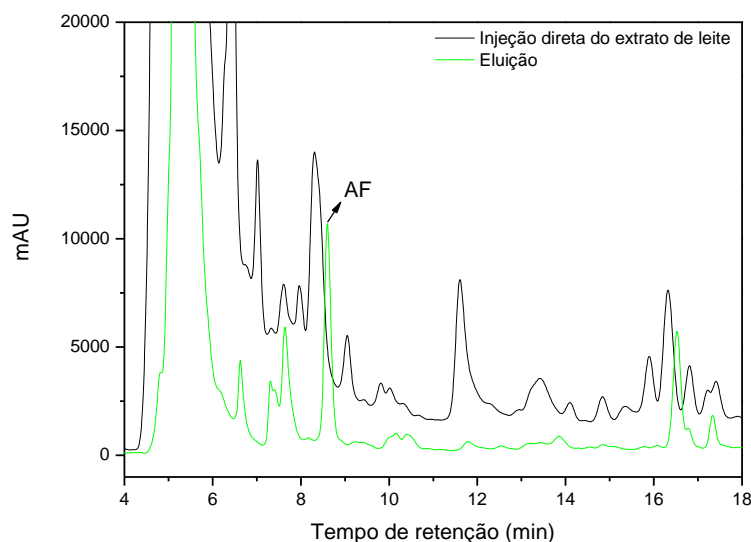
5.11 OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE LAVAGEM

O estudo do solvente de lavagem tem como finalidade avaliar o meio ideal para remoção dos possíveis interferentes da amostra sem, no entanto, remover o analito de interesse da fase sólida. O estudo foi conduzido após percolar 10 mL do extrato de leite obtido pelo pré-tratamento com KOH e ATCA pelo cartucho contendo o MIP-RAM. Diferentes solventes de lavagem (10 mL cada) foram testados: acetona, diclorometano:acetona (1:1, v/v), clorofórmio, diclorometano:etanol (1:1, v/v), ácido acético 0,1 mol L⁻¹, diclorometano e hexano. Após a etapa de lavagem, realizou-se a eluição com 10 mL de uma solução de metanol: tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ pH 5,7 (50:50, v/v).

Com intuito de avaliar a real necessidade do emprego do solvente de lavagem, foi também realizado um ensaio consistindo apenas nas etapas de percolação e eluição. Nestes experimentos, os efluentes das etapas de extração, lavagem e eluição foram evaporados até a secura e recuperados no mesmo volume da fase móvel, filtrados em filtro 0,45 µm e injetados no sistema cromatográfico para avaliar a porcentagem de extração do analito em cada etapa. Os cromatogramas de cada uma destas etapas, considerando o emprego de diferentes solventes de lavagem estão reunidos no Anexo C. Evaporou-se também uma porção do extrato de leite obtido com o pré-tratamento com KOH e ATCA sem passar pelo cartucho, o qual foi recuperado na fase móvel e injetado no sistema cromatográfico. É oportuno mencionar que a porcentagem de extração do ácido fólico pelo MIP-RAM contido no extrato de leite obtido após o pré-tratamento com KOH e ATCA foi de 80,3 ± 1,3%,

conforme pode ser observado pela menor área de pico em comparação à injeção direta do extrato no sistema cromatográfico (Figura 33).

Figura 33 – Cromatogramas do extrato de leite injetado diretamente no sistema cromatográfico e da eluição do cartucho com metanol:tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ pH 5,7 (1:1, v/v).



A Tabela 7 apresenta os percentuais de remoção de ácido fólico ao se empregar diferentes solventes de lavagem. Verificou-se que o solvente de lavagem que mais desorveu o AF do MIP-RAM foi a acetona, possivelmente por possuir maior basicidade em relação aos outros solventes utilizados e, por consequência, maior interação ácido-base com o AF. A mistura diclorometano:acetona (1:1, v/v) foi responsável por desorver 19,0% do AF, o que pode ser justificado pela presença de acetona na mistura, uma vez que o diclorometano empregado isoladamente não possui afinidade suficiente para desorver o analito, pois trata-se de um solvente ácido e com baixa polaridade. O clorofórmio assim como o diclorometano não possui basicidade, entretanto, por ser mais polar que o CH₂Cl₂, o CHCl₃ remove 9,1% do AF adsorvido. Para a mistura diclorometano:etanol (1:1, v/v) obteve-se desorção de 6,8%. A porcentagem de desorção não foi maior, porque o diclorometano corresponde a 50% da mistura e, conforme já mencionado não possui basicidade.

A polaridade também é um parâmetro para explicar o fato do hexano não extrair o AF sorvido. Quanto menor a polaridade do solvente menor é a

quantidade de ácido fólico desorvida. Mediante o exposto, fica claro que as propriedades físico-químicas de polaridade e acidez/basicidade são igualmente importantes no processo de lavagem. No entanto, o pH do solvente de lavagem também é um parâmetro a ser considerado. Cita-se, por exemplo, o caso do ácido acético 0,1 mol L⁻¹, cujo meio ácido (pH 2,87) mantém as ligações de hidrogênio formadas entre o AF e o MAA e evita o processo de desorção.

Por fim, analisando os solventes mostrados na Tabela 7, verifica-se que o ácido acético 0,1 mol L⁻¹, diclorometano e hexano, seriam os melhores solventes de lavagem. Porém, em relação ao diclorometano e hexano, observou-se pelos cromatogramas (Anexo C) que, igualmente ao AF, os interferentes também não foram removidos, inviabilizando o emprego destes solventes no processo de lavagem. No caso do ácido acético 0,1 mol L⁻¹, constatou-se eficiência na remoção dos interferentes, mas, em contrapartida, o cartucho de MIP-RAM apresentou resistência à percolação do solvente devido ao inchaço (efeito *Swelling*) reduzindo sobremaneira a vazão.

Deste modo, optou-se por não empregar o solvente de lavagem no processo de extração. Os ensaios foram realizados utilizando apenas a percolação da amostra no cartucho de MIP-RAM seguida da etapa de eluição com 10 mL de uma solução metanol:tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ pH 5,7 (50:50, v/v). Nesta condição, observou-se ausência de interferentes em potencial no cromatograma do eluato evidenciando o desempenho do MIP-RAM no processo de limpeza (*clean-up*) sem a necessidade de inclusão da etapa de lavagem (Figura 33).

Tabela 7 – Otimização do solvente de lavagem com as respectivas porcentagens de extração do analito e propriedades de cada solvente.⁸⁸

	% de remoção de AF	P	α	β
Acetona	53,0 ± 0,2	5,1	0,06	0,38
Diclorometano: acetona (1:1, v/v)	19,0 ± 3,5	-	-	-
Clorofórmio	9,1 ± 0,4	4,1	0,43	0,00
Diclorometano:etanol (1:1, v/v)	6,4 ± 0,5	-	-	-
Ácido acético 0,1 mol L ⁻¹	-	6,0	0,54	0,15
Diclorometano	-	3,1	0,27	0,00
Hexano	-	0,1	-	-
Sem lavagem	-	-	-	-

P= Polaridade; α - acidez; β - Basicidade

5.12 OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE ELUIÇÃO

A Tabela 8 apresenta a eficiência de cada solvente na eluição do ácido fólico adsorvido no MIP-RAM. A escolha dos solventes estudados foi feita de acordo com a basicidade e no ponto de ebulição (PE). Foi também avaliada a eficiência da fase móvel (ACN:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹, 15:85, v/v) como solvente de eluição, alterando o pH da mesma de 2,8 para 5,7. Os cromatogramas dos eluatos no Anexo D.

Tabela 8 – Otimização do solvente de eluição com as respectivas porcentagens de dessorção do analito e as propriedades de cada solvente.⁸⁸

Solvente	% de eluição	P	α	β
Etanol	82,0 ± 0,9	4,3	0,39	0,36
Isopropanol	83,4 ± 3,1	3,9	0,22	0,35
Acetato de etila	12,0 ± 0,5	4,4	0,00	0,45
Fase móvel pH 2,8	86,2 ± 4,1	-	-	-
Fase móvel pH 5,7	99,7 ± 1,9	-	-	-

P- Polaridade; α - Acidez; β - Basicidade

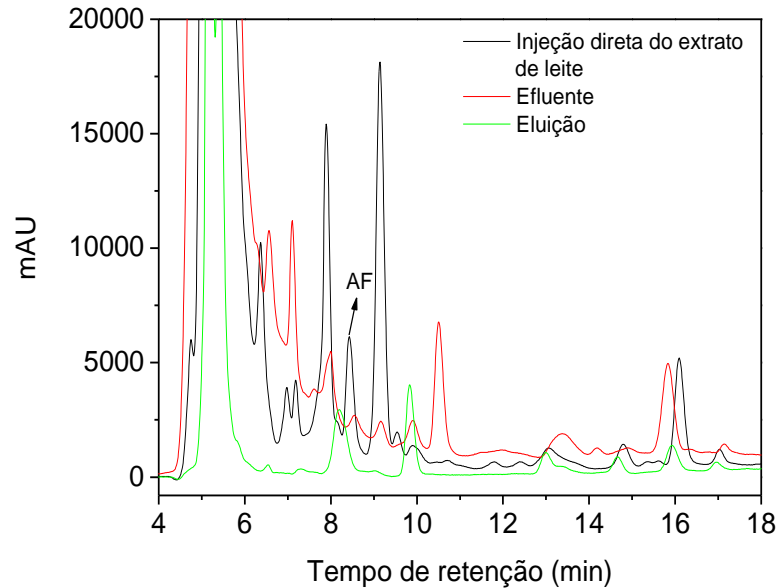
De acordo com a Tabela 8, verificou-se que o acetato de etila apesar de possuir a maior basicidade e a maior polaridade entre os solventes, foi o que apresentou a menor capacidade de eluição do analito. Esta constatação pode ser atribuída à propriedade aprótica do solvente, incapaz de competir pelas ligações de hidrogênio entre o ácido fólico e o monômero ácido metacrílico. Esta explicação é ainda corroborada pelos elevados percentuais de eluição ao se empregar o etanol e isopropanol.

O uso da fase móvel (ACN:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 2,8, 15:85, v/v) como eluente não favoreceu a eluição do AF, pois neste pH o MAA se encontra protonado (pKa 4,46). Entretanto, ao alterar o pH da fase móvel para 5,7 observou-se uma eluição quantitativa conforme a Tabela 8. Deste modo optou-se por trabalhar com uma mistura ACN:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 5,7 (15:85, v/v) como eluente, uma vez que além de ser eficiente na eluição de AF, não requer a evaporação e recuperação do analito na fase móvel.

A Figura 34 mostra a satisfatória limpeza cromatográfica obtida apenas pela passagem da amostra pelo cartucho contendo o MIP-RAM, sem a

realização da etapa de lavagem do mesmo, com posterior eluição do analito com ACN:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 5,7 (15:85, v/v).

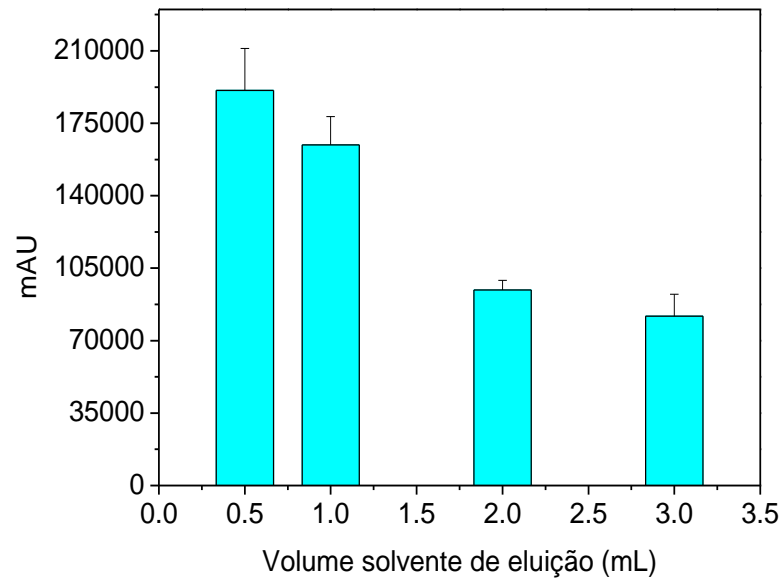
Figura 34 – Cromatogramas do extrato de leite injetado diretamente no sistema cromatográfico, do efluente do cartucho e da eluição do cartucho com ACN:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 5,7 (15:85, v/v).



5.13 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME SOLVENTE DE ELUIÇÃO

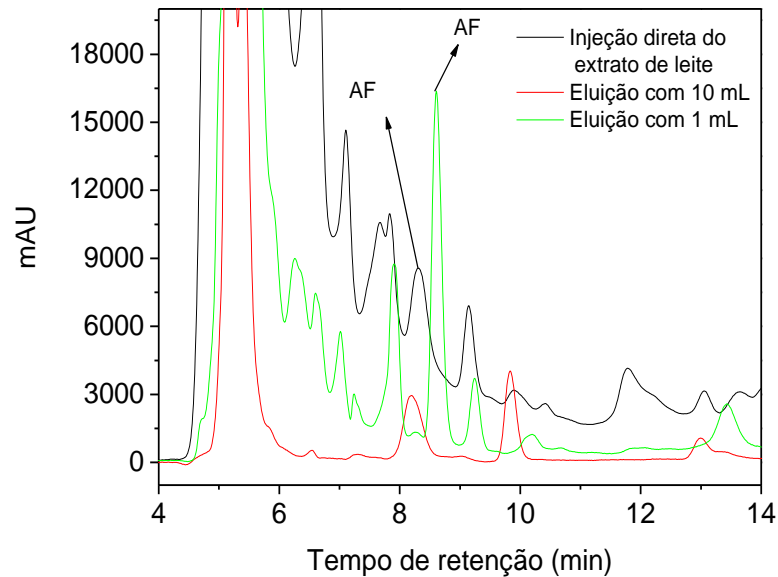
A fim de pré-concentrar o analito presente nas amostras de leite realizou-se a otimização do volume de eluição. A Figura 35 apresenta as áreas de pico em função do volume do solvente de eluição. Analisando os valores de área obtidos verifica-se que o volume que apresentou melhores resultados foi o volume de 1 mL, pois apresentou um ganho satisfatório de resposta analítica e um desvio padrão relativamente baixo. Para o volume de eluição de 0,5 mL verifica-se que houve um aumento na área de pico quando comparado a eluição com 1 mL entretanto, o desvio padrão obtido foi alto o que poderia prejudicar uma análise quantitativa do analito em amostras.

Figura 35 – Área de pico em função do volume do solvente de eluição.



O cromatograma obtido ao se empregar 1,0 mL de solvente de eluição foi comparado com aquele fazendo uso de 10,0 mL, uma vez que este volume foi utilizado nos experimentos anteriores. De acordo com Figura 36, observa-se um ganho satisfatório na área de pico ao comparar a eluição com 1,0 mL e 10,0 mL. Além disto, constatou-se satisfatória limpeza cromatográfica em comparação ao cromatograma do extrato injetado diretamente no sistema cromatográfico (Figura 36).

Figura 36 – Cromatogramas do extrato de leite injetado diretamente no sistema cromatográfico e eluições do cartucho com 1,0 e 10,0 mL.



5.14 FIGURAS DE MÉRITO E APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE LEITE

A eficiência do método MISPE proposto foi avaliada a partir das figuras de mérito do sistema que são: fator de pré-concentração, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e repetibilidade intra-dia.

A curva de calibração de padrões submetidos ao método MISPE é representada pela equação $mAU=315,34[AF]+1220,20$ com $r=0,999$, (Figura 37), e a equação dos padrões injetados diretamente no sistema cromatográfico representada por $mAU=143,36[AF]-1083,57$ com $r=0,999$, (Figura 38).

Figura 37 – Curva de calibração de padrões submetidos ao método MISPE.

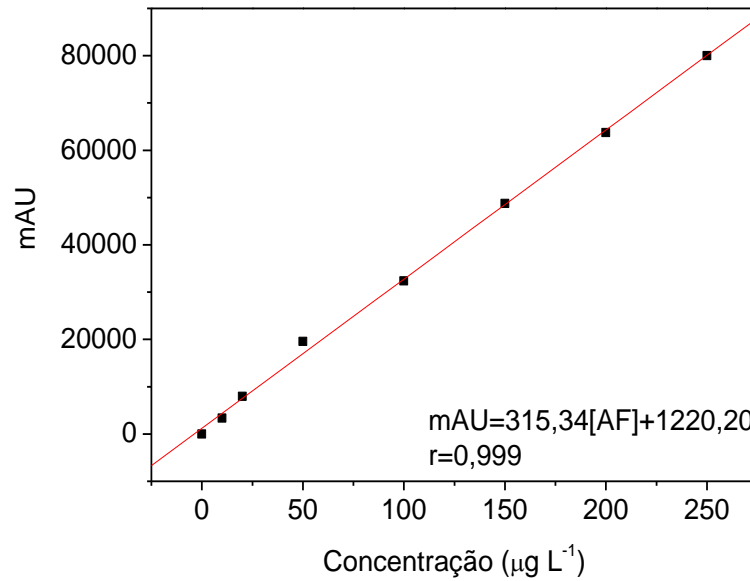
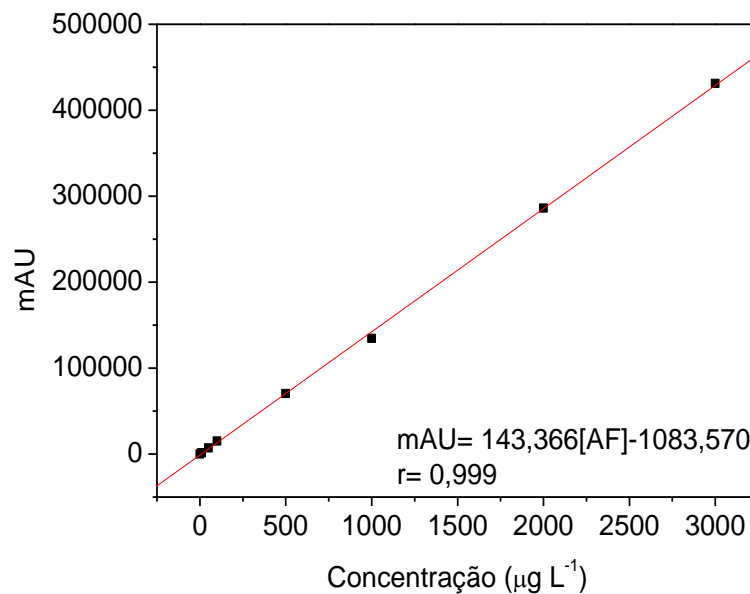


Figura 38 – Curva de calibração de padrões injetados diretamente no sistema cromatográfico.



O fator de pré-concentração do método MISPE foi calculado pela razão entre os coeficientes angulares das curvas de calibração do método MISPE e de padrões injetados diretamente no sistema cromatográfico, sendo obtido um fator de pré-concentração de 2,19 vezes.

O limite de detecção e quantificação do método MISPE foram calculados de acordo com a IUPAC, Equações 12 e 13, respectivamente. Onde σ representa o desvio padrão para a leitura de dez brancos e m o coeficiente angular da curva de calibração do método MISPE. Os LD e LQ obtidos foram de 1,45 e 4,83 $\mu\text{g L}^{-1}$.⁸⁹

$$\text{Equação 12} \quad \text{LD} = \frac{3x\sigma}{m}$$

$$\text{Equação 13} \quad \text{LQ} = \frac{10x\sigma}{m}$$

A repetibilidade intra-dia ($n=10$) do método proposto foi avaliada para as concentrações de 20,0 e 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentando coeficiente de variação de 4,68 e 4,08%, respectivamente.

O método MISPE otimizado foi aplicado em amostras de leite em pó enriquecidas com AF, que foram adquiridas em um supermercado local. Além de comparar o valor rotulado com o valor encontrado, realizou-se também o enriquecimento das amostras com AF, de modo que a concentração de AF fosse o dobro do valor rotulado (Tabela 9).

De acordo com a Tabela 9 verifica-se que a concentração encontrada é próxima ao valor rotulado, além da obtenção de satisfatórias porcentagens de recuperação.

Tabela 9 – Aplicação do método MISPE em amostras de leite.

Amostra	Valor rotulado (μg)	Concentração adicionada (μg)	Concentração encontrada (μg)	Recuperação (%)
A	120 [*]	0	119,1 \pm 1,1 [*]	-
		120	244,1 \pm 1,1 [*]	104,2
B	37 ^{**}	0	35,5 \pm 2,1 ^{**}	-
		37	70,7 \pm 1,3 ^{**}	95,0
C	110 ^{***}	0	110,1 \pm 1,2 ^{***}	-
		110	229,3 \pm 1,3 ^{***}	108,4
D	130 ^{***}	0	123,3 \pm 3,0 ^{***}	-
		130	259,6 \pm 6,6 ^{***}	104,8

* μg de AF em 25 g de amostra; ** μg de AF em 28,5 g de amostra; *** μg de AF em 100 g de amostra.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Por meio dos dados de seletividade e do estudo de sorção de proteínas foi possível demonstrar que o material híbrido MIP-RAM possui sítios de sorção com maior afinidade pelo ácido fólico, além de ser eficiente na exclusão de proteínas. A caracterização por FT-IR, TG, TEM e dados texturais foi útil para confirmar a polimerização das frações orgânica e inorgânica, com obtenção de um MIP-RAM com partículas contendo mesoporos e de elevada aderência entre si adquirindo propriedades morfológicas de monolitos e não de partículas isoladas. O MIP-RAM apresentou, mediante os estudos cinéticos, maior sorção de ácido fólico ($5,6 \text{ mg g}^{-1}$) em relação ao NIP-RAM ($4,5 \text{ mg g}^{-1}$) e MIP ($4,8 \text{ mg g}^{-1}$). Os modelos cinéticos de Elovich e pseudo-segunda ordem comprovaram que a sorção do ácido fólico ocorre em sítios de energia diferente de ligação. De acordo com o modelo de difusão intrapartícula observou-se que a difusão dentro dos poros não é o único processo responsável pela retenção do ácido fólico, indicando que a sorção na superfície externa do material também pode ocorrer. Os dados de MISPE obtidos demonstraram uma elevada eficiência na limpeza dos cromatogramas, após a passagem da amostra pelo cartucho contendo o MIP-RAM, sendo que esta limpeza dispensa a etapa de lavagem do cartucho para remoção dos interferentes, o que torna o método ainda mais eficiente. Além desta vantagem, o eluato obtido pode ser injetado diretamente no sistema cromatográfico, o que evita possíveis perdas do analito por degradação, além de tornar o sistema de análise mais rápido. A aplicação do método MISPE proposto em amostras de leite em pó demonstrou que o método proposto é exato, uma vez que os valores rotulados foram muito próximos aos valores encontrados. Como considerações finais e perspectivas futuras, pode-se inferir que os polímeros híbridos quimicamente impressos e com acesso restrito constituem como uma fase sólida com reais potencialidades em procedimentos de extração/pré-concentração de analitos em matrizes complexas. Assim, estudos concernentes à síntese de novos MIP-RAM híbridos, por meio da associação de Ciências de Materiais e Química Analítica, contemplam um amplo campo de pesquisa que pode ser de sobremaneira explorado visando à melhoria e/ou o desenvolvimento de novos métodos analíticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.
2. JARDIM, I. C. S. F.; Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13-25, 2010.
3. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.
4. OLIVEIRA, F. M.; SOMERA, B. F.; CORAZZA, M. Z.; YABE, M. J. S.; SEGATELLI, M. G.; RIBEIRO, E. S.; LIMA, E. C.; DIAS, S. L. P.; TARLEY, C. R. T.; Cellulose microfiber functionalized with N,N'-bis (2-aminoethyl)-1,2-ethanediamine as a solid sorbent for the fast preconcentration of Cd(II) in flow system analysis. **Talanta**, v. 85, p. 2417-2424, 2011.
5. ANTHEMIDIS, A.N.; ZACHARIADIS, G.A.; FARASTELIS, C.G.; STRATIS, J.A.; On-line liquid-liquid extraction system using a new phase separator for flame atomic absorption spectrometric determination of ultra-trace cadmium in natural waters. **Talanta**, v.62, p. 437-443, 2004.
6. IWATA, Y.; IMURA, H.; SUZUKI, N.; Selective preconcentration of rare earth elements by substoichiometric precipitation of calcium oxalate and its application to the neutron activation analysis of biological material. **Analytica Chimica Acta**, v. 239, p. 115-120, 1990.
7. XIAODAN, T.; XU, Z.; WANG, J.; A hydride generation atomic fluorescence spectrometric procedure for selenium determination after flow injection on-line co-precipitate preconcentration. **Spectrochimica Acta Part B**, v.60, p. 1580-1585, 2005.
8. SOYLAK, M.; UNSAL, Y. E.; KIZIL, N.; AYDIN, A.; Utilization of membrane filtration for preconcentration and determination of Cu(II) and Pb(II) in food, water and geological samples by atomic absorption spectrometry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 517- 521, 2010.
9. BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F.M.; Extração em fase sólida (spe) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, p. 172-175, 2001.
10. VIDAL, L.; RIEKKOLA, M. L.; CANALS, A.; Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.715, p. 19-41, 2012.

11. TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P.; KUBOTA, L. T.; Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, p. 1087-1101, 2005.
12. LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B.; Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, p. 72-78, 2006.
13. QI, Y.; WEI, J.; WANG, H.; ZHANG, Y.; XU, J.; QIAN, X.; GUAN, Y.; Improved selection of LMW over HMW proteins from human plasma by mesoporous silica particles with external modification. **Talanta**, v.80, p. 703-709, 2009.
14. DU, B.; QU, T.; CHEN, Z.; CAO, X.; HAN, S.; SHEN, G.; WANG, L.; A novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples. **Talanta**, v. 129, p. 465-472, 2014.
15. PARISI, O. I.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PUOCI, F.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U. G.; PICCI, N.; Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. **Journal of Polymer Research**, v. 17, p. 355-362, 2010.
16. CLAUSEN, D. N.; PIRES, I. M. R.; TARLEY, C. R. T.; Improved selective cholesterol adsorption by molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica (PMAA-SiO₂) hybrid material synthesized with different molar ratios. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 99-108, 2014.
17. SILVA, W. J. M.; Dissertação de Mestrado. Ácido fólico: validação do método espectrofotométrico. Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2012.
18. VIEIRA, K. M.; *Tese de Doutorado*. Aplicação dos processos oxidativos, redutivos e (foto)eletroquímicos na degradação de fármacos em meio aquoso. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2011.
19. SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M.Z.; **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 17-24, 2007.
20. ARAÚJO, M.M.; *Tese de Doutorado*. Efeito do processamento por ionização, calor e micro-ondas na degradação do ácido fólico. IPEN: autarquia associada à Universidade de São Paulo, Brasil, 2012.
21. (ANVISA) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 15, de 21 de fevereiro de 2000. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002/120602.htm>>. Acesso em: 30 de maio de 2013.
22. FUJIMORI, E.; BALDINO, C. F.; SATO, A. P. S.; BORGES, M. N.; Prevalência e distribuição espacial de defeitos do tubo neural no Estado de São Paulo, Brasil, antes e após a fortificação de farinhas com ácido fólico. **Caderno de Saúde Pública**, v. 29, p. 145-154, 2013.

23. HERTRAMPF, E.; CORTE'S, F.; Folic Acid Fortification of Wheat Flour: Chile. **Nutrition Reviews**, v. 62, p. 44-48, 2004.
24. WALSH, P. D.; TAIROU, F.; ALLEN, M. I. V.; UH, S.-H.; LOWRY, R. B.; SIBBALD, B.; EVANS, J. A.; VAN DEN HOF, M. C. ; ZIMMER, P.; CROWLEY, M.; FERNANDEZ, B.; LEE, N. S. ; NIYONSENGA, T.; Reduction in Neural-Tube Defects after Folic Acid Fortification in Canada. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 135-142, 2007.
25. SAFDAR, O. Y.; AL-DABBAGH, A. A.; ABUELIENEEN, W. A.; KARI, J. A.; Decline in the incidence of neural tube defects after the national fortification on flour. **Saudi Medical Journal**, v. 28, p. 1227-1229, 2007.
26. RICKS, D. J.; REES, C. A.; OSBORN, K. A.; CROOKSTON, B. T.; LEAVER, K.; MERRILL, S. B.; VELÁSQUEZ, C.; RICKS, J. H.; Peru's national folic acid fortification program and its effect on neural tube defects in Lima. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.32, p. 391-398, 2012.
27. SAYED, A.-R.; BOURNE, D.; PATTINSON, R.; NIXON, J.; HENDERSON, B.; Decline in the Prevalence of Neural Tube Defects Following Folic Acid Fortification and Its Cost-Benefit in South Africa. **Birth Defects Research (Part A)**, v. 82, p. 211-216, 2008.
28. DAVIS, R.E.; NICOL, D.J.; Folic Acid. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, p. 133-139, 1988.
29. ZHANG, H.; Controlled/"living" radical precipitation polymerization: A versatile polymerization technique for advanced functional polymers. **European Polymer Journal**, v. 49, p.579-600, 2013.
30. YAN, H.; ROW, K. H.; Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, p. 155-178, 2006.
31. TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.668, p.87-99, 2010.
32. SCORRANO, S.; MERGOLA, L.; SOLE, R. D.; VASAPOLLO, G.; Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers for Amino Acid Derivates by Using Different Functional Monomers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 1735-1743, 2011.
33. MASQUEÈ, N.; MARCEÈ, R. M.; BORRULL, F.; Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p. 477-486, 2001.
34. MARESTONI, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SEGATELLI, M. G.; SARTORI, L. R.; TARLEY, C. R. T.; Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 36, p. 1194-1207, 2013.

35. DESILETS, C.P.; ROUNDS, M.A.; REGNIER, F.E.; Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 544, p. 25-39, 1991.
36. NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H.; A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 8-35, 2009.
37. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L.; Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 141-156, 2004.
38. PUOCI, F.; IEMMA, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O.I.; SPIZZIRRI, U.G.; PICCI, N.; New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 1634-1640, 2009.
39. PONCIN-EPAILLARD, F.; VRLINIC, T.; DEBARNOT, D.; MOZETIC, M.; COUDREUSE, A.; LEGEAY, G.; MOUALIJ, B. E.; ZORZI, W.; Surface treatment of polymeric materials controlling the adhesion of biomolecules. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, p.528-543, 2012.
40. MORAES, G.O.I.; *Dissertação de Mestrado*. Síntese de um polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAM-MIP-BSA), para análise direta de clorpromazina em plasma por sistema de cromatografia líquida bidimensional. Universidade Federal de Alfenas, Brasil, Brasil, 2012.
41. LIMA, V.V.L.; CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B.; Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, p. 72-78, 2006.
42. BOOS, K.-S.; FLEISCHER, C.; Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, p. 16-20, 2001.
43. SANBE, H.; HAGINAKA, J.; Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of b-blockers in biological fluids. **Analyst**, v.128, p. 593–597, 2003.
44. MORAES, G. O. I.; SILVA, L. M. R.; SANTOS-NETO, A. J.; FLORENZANO, F. H.; FIGUEIREDO, D. C.; A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7687-7696, 2013.
45. FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z.; Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação

- controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 361-375, 2008.
46. PÉREZ-MORAL, N.; MAYES, A. G.; Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 15-21, 2004.
47. ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T.; A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
48. BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H.; GALLAS, M. R.; Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, p.1926-1933, 2009.
49. LI, B.R.; GAO, H.; LIU, J.P.; YANG, Z.W.; Synthesis of Lu₂Ti₂O₇ nano-powders by salt modified sol-gel process. **Ceramics International**, v.38, p. 5453-5459, 2012.
50. AMBATI, J.; RANKIN, S.E.; Reaction-induced phase separation of bis(triethoxysilyl)ethane upon sol-gel polymerization in acidic conditions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 345-353, 2011.
51. SCHUEREN, L.V.D.; CLERCK, K.D.; BRANCATELLI, G.; ROSACE, G.; DAMME, E.V.; VOSC, W.D.; Novel cellulose and polyamide halochromic textile sensors based on the encapsulation of Methyl Red into a sol-gel matrix. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, p. 27-34, 2012.
52. YANG, J.M.; CHIANG, C.Y.; WANG, H.Z.; YANG, C.C.; Two step modification of poly(vinyl alcohol) by UV radiation with 2-hydroxy ethyl methacrylate and sol-gel process for the application of polymer electrolyte membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 341, p. 186-194, 2009.
53. JIN, Y.; JIANG, M.; SHI, Y.; LIN, Y.; PENG, Y.; DAI, K.; LU, B.; Narrowly dispersed molecularly imprinted microspheres prepared by a modified precipitation polymerization method. **Analytica Chimica Acta**, v. 612, p. 105-113, 2008.
54. YEH, J.-M.; WENG, C.-J.; LIAO, W.-J.; MAU, Y.-W.; Anticorrosively enhanced PMMA-SiO₂ hybrid coatings prepared from the sol-gel approach with MSMA as the coupling agent. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 1788-1798, 2006.
55. SAEGUSA, T.; Organic-inorganic polymers hybrids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 1965-1970, 1995.
56. JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A.; Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, p.281-288, 2005.
57. JIN, Y.; JIANG, M.; SHI, Y.; LIN, Y.; PENG, Y.; DAI, K.; LU, B.; Narrowly dispersed molecularly imprinted microspheres prepared by a modified

- precipitation polymerization method. **Analytica Chimica Acta**, v. 612, p. 105-113, 2008.
58. YEH, J.-M.; WENG, C.-J.; LIAO, W.-J., MAU, Y.-W.; Anticorrosively enhanced PMMA–SiO₂ hybrid coatings prepared from the sol–gel approach with MSMA as the coupling agent. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, p. 1788- 1795, 2006.
59. ANAIA, G. C.; *Dissertação de Mestrado*. Determinação de íons metálicos por FI-FAAS após separação e concentração em fase sólida: avaliação crítica de adsorventes. Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.
60. OLIVEIRA, F. M.; SOMERA, B. F.; RIBEIRO, E. S.; SEGATELLI, M. G.; YABE, M. J. S.; GALUNIN, E.; TARLEY, C. R. T.; Kinetic and Isotherm Studies of Ni²⁺ Adsorption on Poly(methacrylic acid) Synthesized through a Hierarchical Double-Imprinting Method Using a Ni²⁺ Ion and Cationic Surfactant as Templates. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 8550-8557, 2013.
61. CELA-PÉREZ, M. C.; CASTRO-LÓPEZ, M. M.; LASAGABÁSTER-LATORRE, A.; LÓPEZ-VILARI, J. M.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. V.; BARRAL-LOSADA, L. F.; Synthesis and characterization of bisphenol-A imprinted polymer as a selective recognition receptor. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, p. 275-284, 2011.
62. WANG, Z.; AINSWORTH, C. C.; FRIEDRICH, D. M.; GASSAMAN, P. L.; JOLYI, A. G.; Kinetics and mechanism of surface reaction of salicylate on alumina in colloidal aqueous suspension. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 64, p. 1159-1172, 2000.
63. CACEREZ, L.; ESCUDEY, M.; FUENTES, E.; BAEZ, M. E.; Modeling the sorption kinetic of metsulfuron-methyl on Andisols and Ultisols volcanic ash-derived soils: Kinetics parameters and solute transport mechanisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p.795-803, 2010.
64. OFOMAJA, A. E.; Intraparticle diffusion process for lead(II) biosorption onto mansonia wood sawdust. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5868-5876, 2010.
65. CHEUNG, W. H.; SZETO, Y. S.; MCKAY, G.; Intraparticle diffusion processes during acid dye adsorption onto chitosan. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2897-2904, 2007.
66. CARVALHO, T. E. M.; FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. C.; Sorção do corante reativo laranja 16 de soluções aquosas por zeólita sintética. **Química Nova**, v. 33, p. 358-363, 2010.
67. XUE, Y.; HOU, H.; ZHU, S.; Adsorption removal of reactive dyes from aqueous solution by modified basic oxygen furnace slag: Isotherm and kinetic study. **Chemical Engineering Journal**, v. 147, p. 272-279, 2009.
68. TARLEY, C. R. T.; ANDRADE, F. N.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M.; BEIJO, L. A.; SEGATELLI, M. G.; Ion-imprinted polyvinylimidazole-silica hybrid copolymer

- for selective extraction of Pb(II): Characterization and metal adsorption kinetic and thermodynamic studies. **Analytica Chimica Acta**, v. 72, p. 83-91, 2012.
69. NEKOUEI, F.; NEKOUEI, S.; TYAGI, I.; GUPTA, V. K.; Kinetic, thermodynamic and isotherm studies for acid blue 129 removal from liquids using copper oxide nanoparticle-modified activated carbon as a novel adsorbent. **Journal of Molecular Liquids**, v. 201, p. 124-133, 2015.
70. PARAMESWARAN, G.; MATHEW, B.; Bioremediation of Waste Water Containing Hazardous Cadmium Ion with Ion Imprinted Interpenetrating Polymer Networks. **Advances in Environmental Chemistry**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
71. CATHARINO, R. R.; VISENTAINER, J. V.; GODOY, H. T.; Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 389-395, 2003.
72. CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.; Extração em fase sólida para determinação de ácido fólico em leites e produtos lácteos. **Revista Analítica**, v. 1, p. 43-47, 2003.
73. LIU, Y.-L.; SU, Y.-H.; LAI, J.-Y.; In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan–silica hybrid membranes with using γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent. **Polymer**, v. 45, p. 6831-6837, 2004.
74. LIU, B.; YAN, E.; ZHANG, X.; YANG, X.; BAI, F.; A general method for the synthesis of monodisperse hollow inorganic–organic hybrid microspheres with interior functionalized poly(methacrylic acid) shells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 369, p. 144-153, 2012.
75. VÉLEZ, J. F.; PROCACCINI, R. A.; APARICIO, M.; MOSA, J.; Epoxy-silica hybrid organic–inorganic electrolytes with a high Li-ion conductivity. **Electrochimica Acta**, v.110, p. 200-207, 2013.
76. MACAN, J.; BRNARDIC, I.; ORLIC, S.; IVANKOVIC, H.; IVANKOVIC, M.; Thermal degradation of epoxy–silica organic–inorganic hybrid materials. **Polymer Degradation Stability**, v. 91, p. 122-127, 2006.
77. PÉREZ-MORAL, N.; MAYES, A. G.; Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 15-21, 2004.
78. ZU, L.; LI, R.; JIN, L.; LIAN, H.; LIU, Y.; CUI, X.; Preparation and characterization of polypropylene/silica composite particle with interpenetrating network via hot emulsion sol–gel approach. **Progress in Natural Science Materials International**, v. 24, p. 42-49, 2014.
79. PONYRKO, S.; KOBERA, L.; BRUS, J.; MATEJKA, L.; Epoxy-silica hybrids by nonaqueous sol-gel process. **Polymer**, v. 54, p. 6271-6282, 2013.
80. RENKECZ, T.; MISTLBERGER, G.; PAWLAK, M.; HORVÁTH, V.; BAKKER, E.; Molecularly Imprinted Polymer Microspheres Containing Photoswitchable

Spiropyran-Based Binding Sites. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, p. 8537–8545, 2013.

81. CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z.; Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 173-182, 2004.
82. YU, Q.; DENG, S.; YU, G.; Selective removal of perfluorooctane sulfonate from aqueous solution using chitosan-based molecularly imprinted polymer adsorbents. **Water Research**, v. 42, p. 3089-3097, 2008.
83. LOPEZ, M. M. C.; PEREZ, M. C. C.; GARCIA, M. S. D.; VILARIÑO, L. J. M.; RODRIGUEZ, M. V. G.; LOSADA, L. F. B.; Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins. **Analytica Chimica Acta**, v.721, p.68-78, 2012.
84. ZHOU, C.; WU, Q.; LEI, T.; NEGULESCU, I. I.; Adsorption kinetic and equilibrium studies for methylene blue dye by partially hydrolyzed polyacrylamide/cellulose nanocrystal nanocomposite hydrogels. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 17-24, 2014.
85. SITE, A. D.; Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants. A Review. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 30, p. 187-439, 2001.
86. LU, J.-L.; WU, M.-Y.; YANG, X.-L.; DONG, Z.-B.; YE, J.-H.; BORTHAKUR, D.; SUN, Q.-L.; LIANG, Y.-R.; Decaffeination of tea extracts by using poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethylacrylate) as adsorbent. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 555-562, 2010.
87. WU, N.; SUN, Y.; JIAO, Y.; CHEN, L.; Effect of Inorganic/Organic Hybrid on the Wettability of Polymer Nanofibrous Membranes. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v.8, p. 1-5, 2013.
88. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W.; Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed., Wiley: New York, 2009.
89. CURRIE, L. A.; Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **International Union Of Pure And Applied Chemistry**, v. 67, p. 1699-1723, 1995.

ANEXOS

ANEXO A

Modelos aplicados aos dados cinéticos

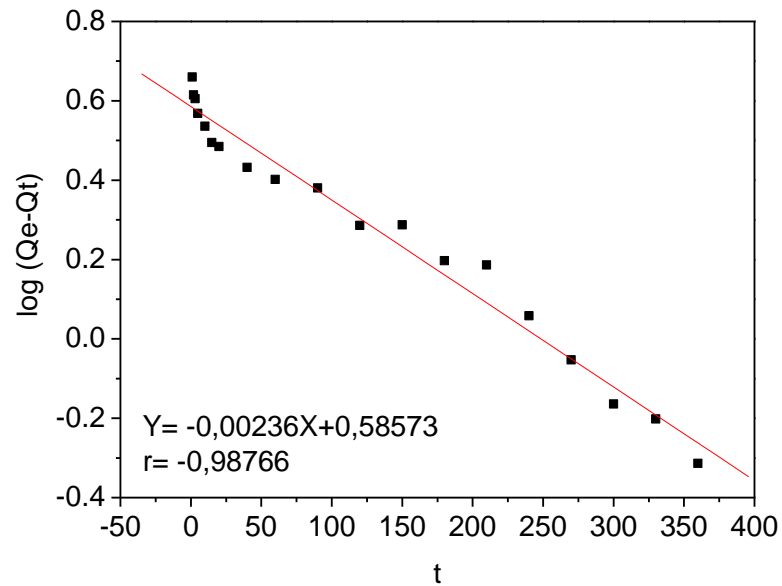
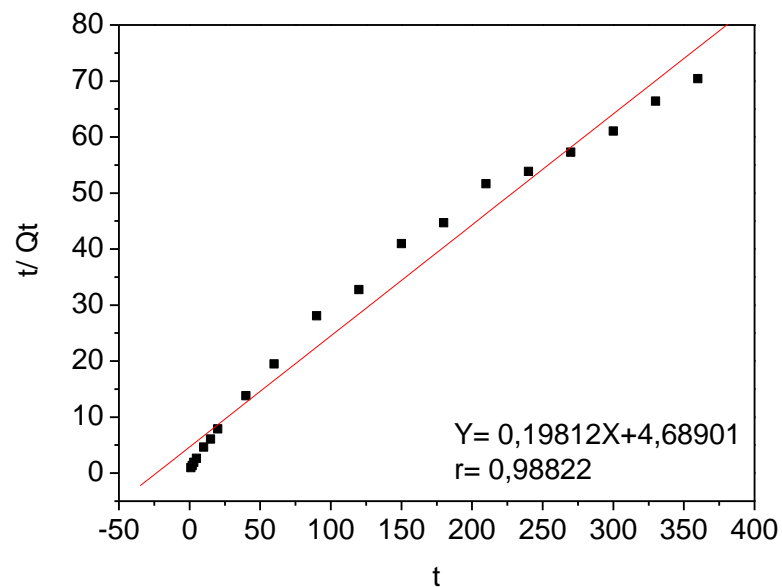
Figura A1 – Modelo de pseudo-primeira ordem aplicado aos dados cinéticos do MIP-RAM.**Figura A2** – Modelo de pseudo-segunda ordem aplicado aos dados cinéticos do MIP-RAM.

Figura A3 – Modelo de Elovich aplicado aos dados cinéticos do MIP-RAM.

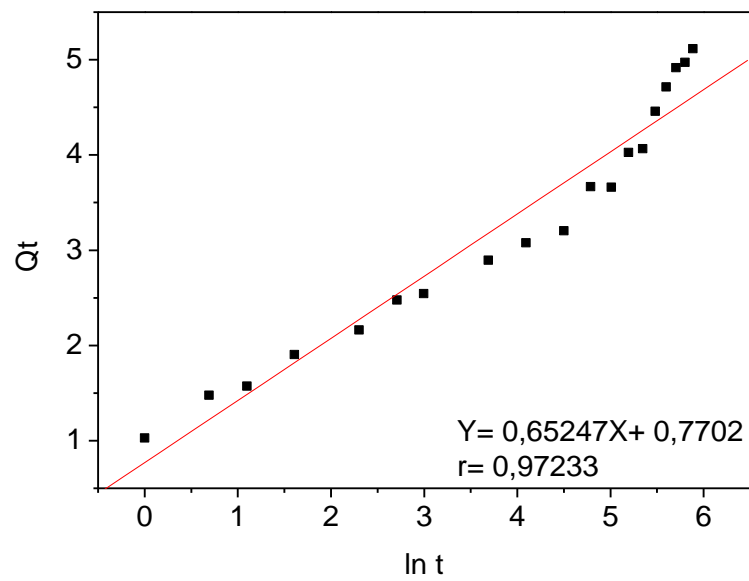


Figura A4 – Modelo de difusão intrapartícula aplicado aos dados cinéticos do MIP-RAM.

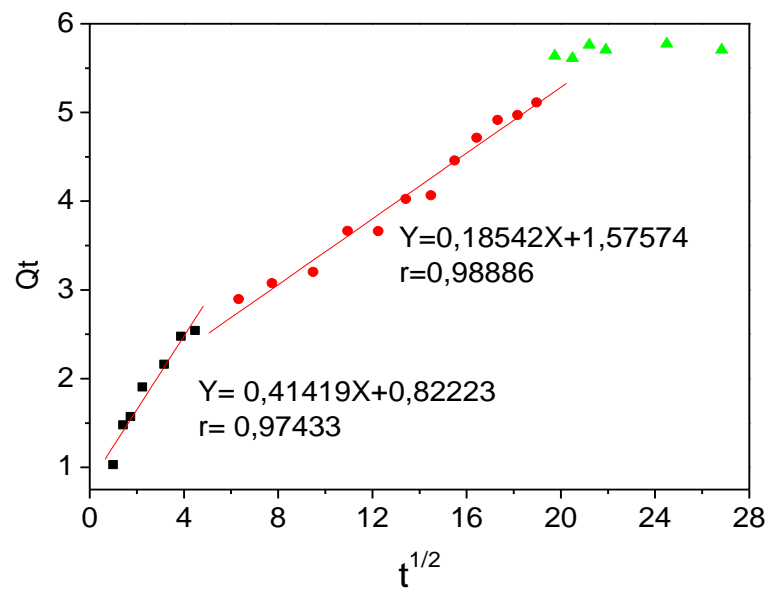


Figura A5 – Modelo de pseudo-primeira ordem aplicado aos dados cinéticos do NIP-RAM.

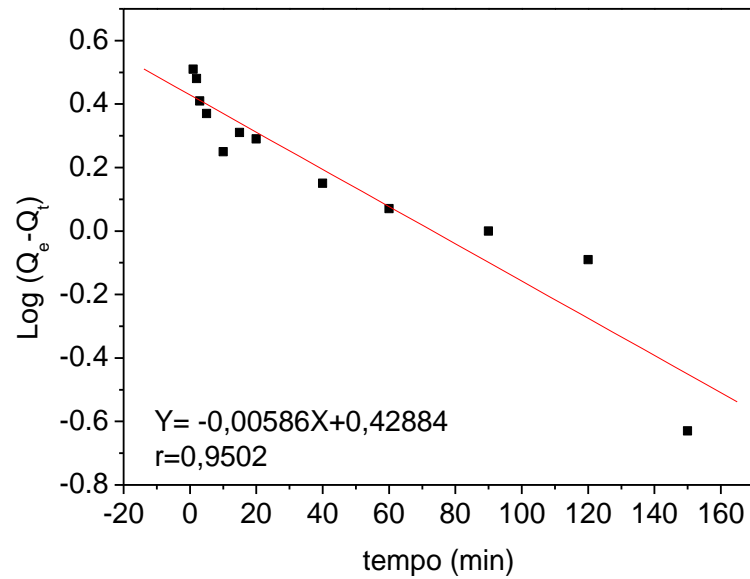


Figura A6 – Modelo de pseudo-segunda ordem aplicado aos dados cinéticos do NIP-RAM.

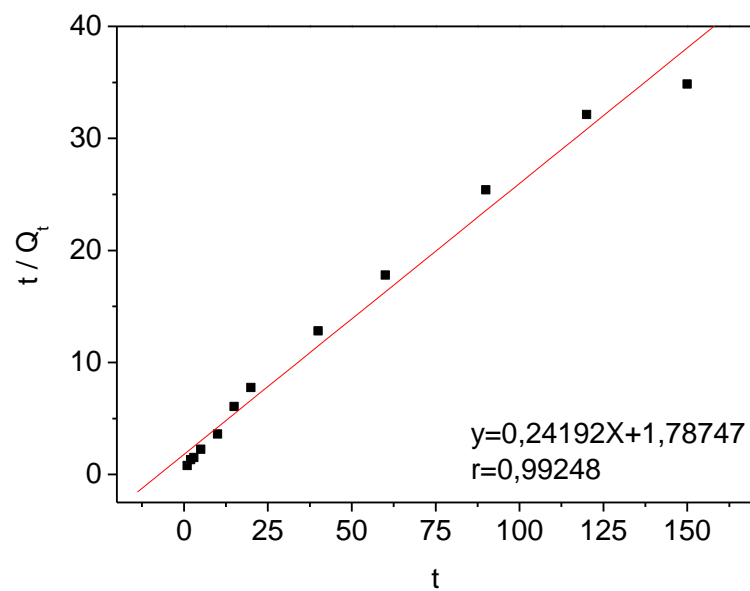


Figura A7- Modelo de Elovich aplicado aos dados cinéticos do NIP-RAM.

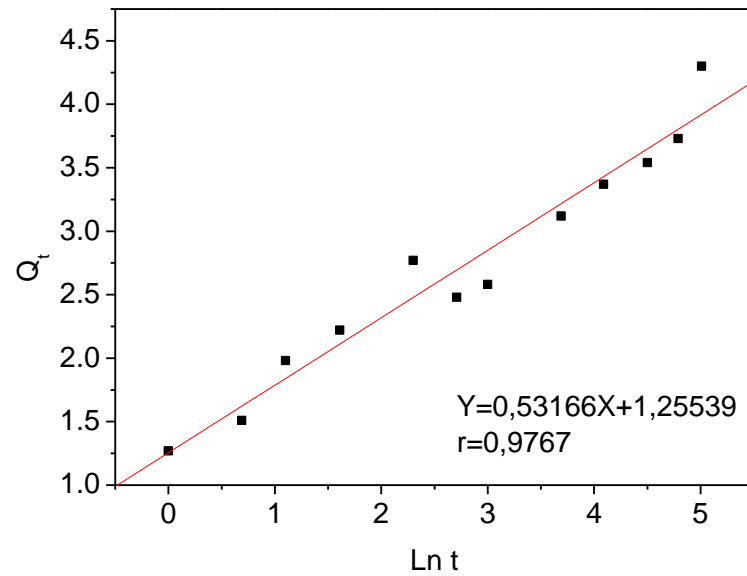


Figura A8 – Modelo de Difusão intrapartícula aplicado aos dados cinéticos do NIP-RAM.

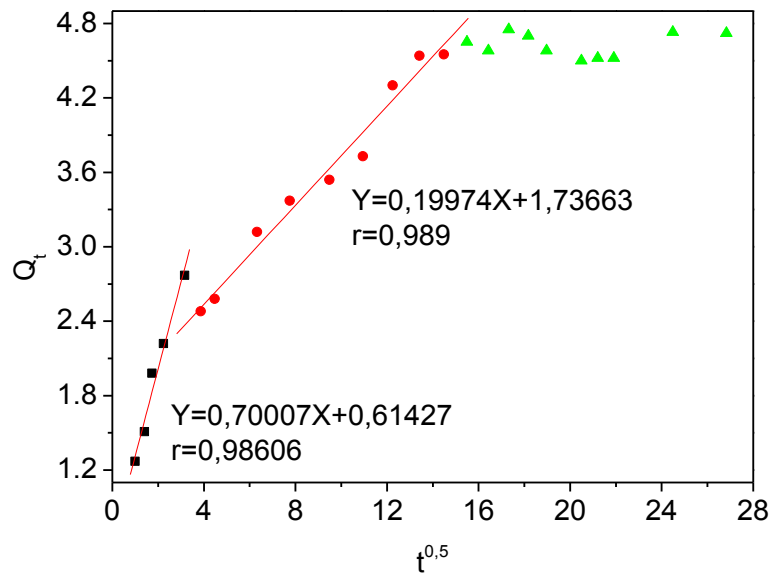


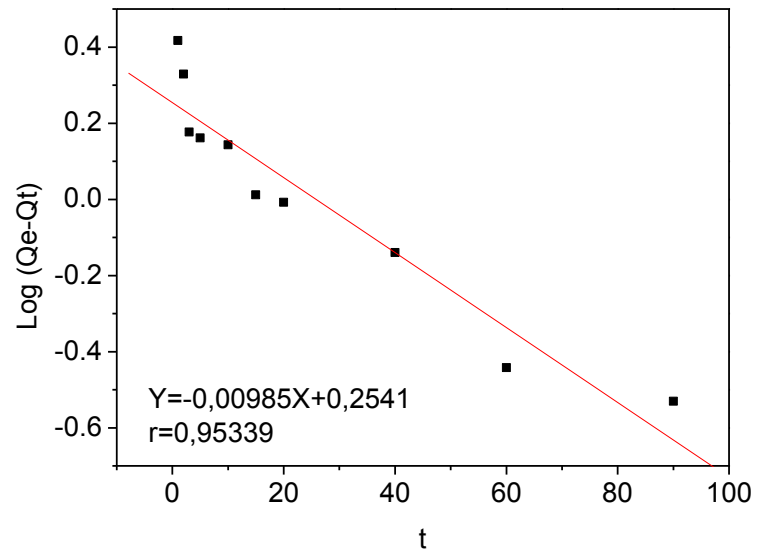
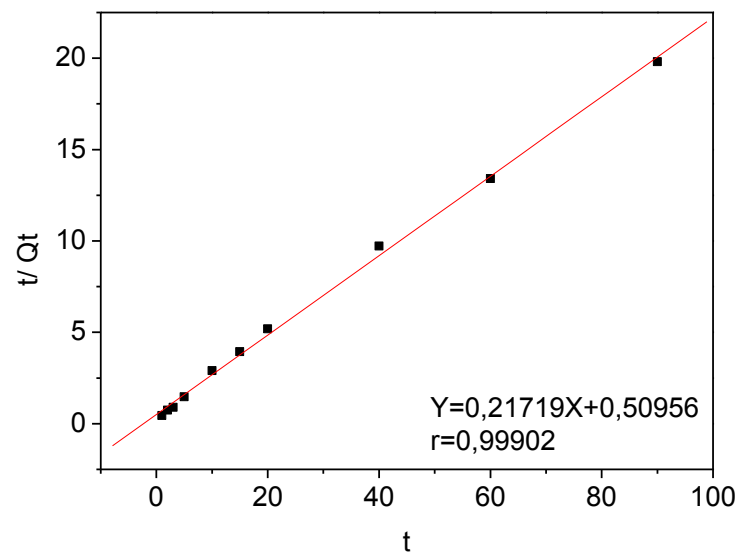
Figura A9 – Modelo de pseudo-primeira ordem aplicado aos dados cinéticos do MIP.**Figura A10** – Modelo de pseudo-segunda ordem aplicado aos dados cinéticos do MIP.

Figura A11 – Modelo de Elovich aplicado aos dados cinéticos do MIP.

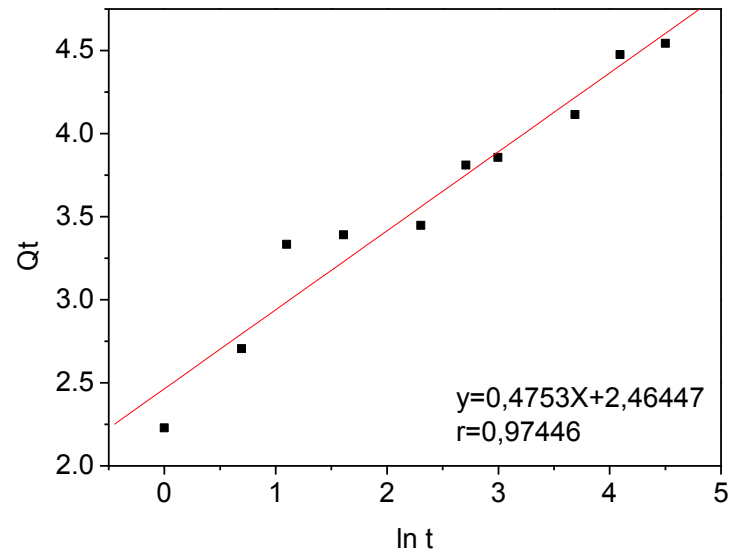
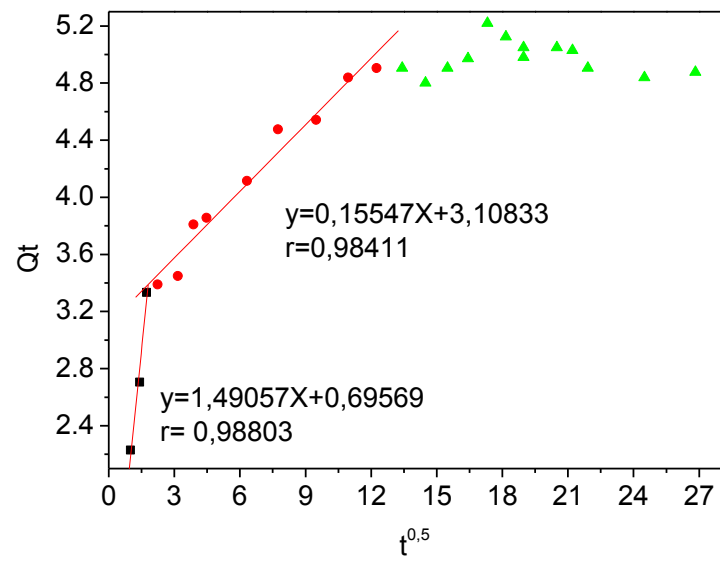


Figura A12 – Modelo de difusão-intrapartícula aplicado aos dados cinéticos do MIP.



ANEXO B

Cromatogramas obtidos dos extratos da matriz alimentícia e espectros de ultravioleta-visível do pico cromatográfico do ácido fólico

Figura B1 – Cromatograma da extração do ácido fólico da matriz alimentícia utilizando KOH e ATCA.

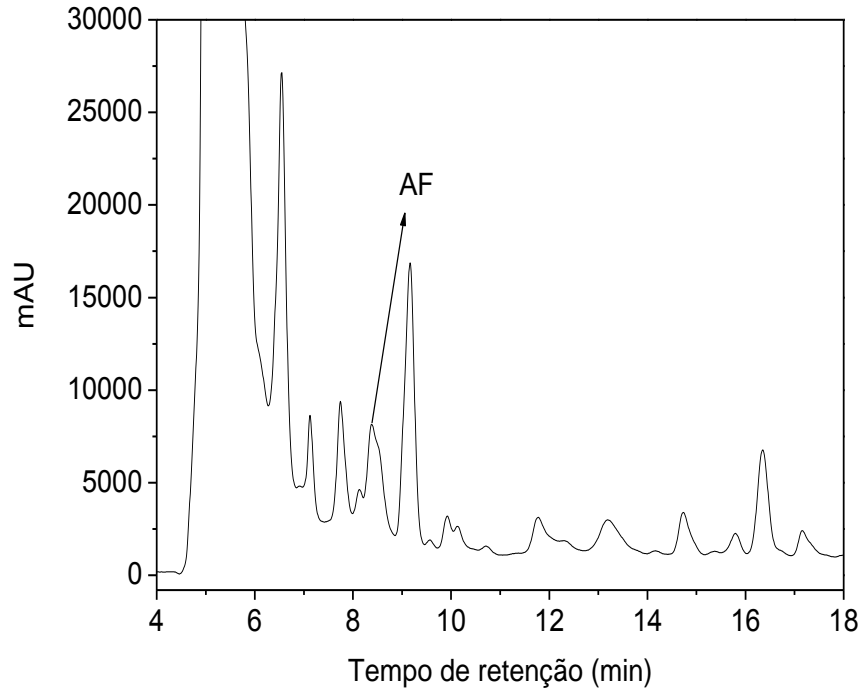


Figura B2 – Espectro ultravioleta visível do pico cromatográfico do ácido fólico para o extrato alimentício obtido utilizando KOH e ATCA.

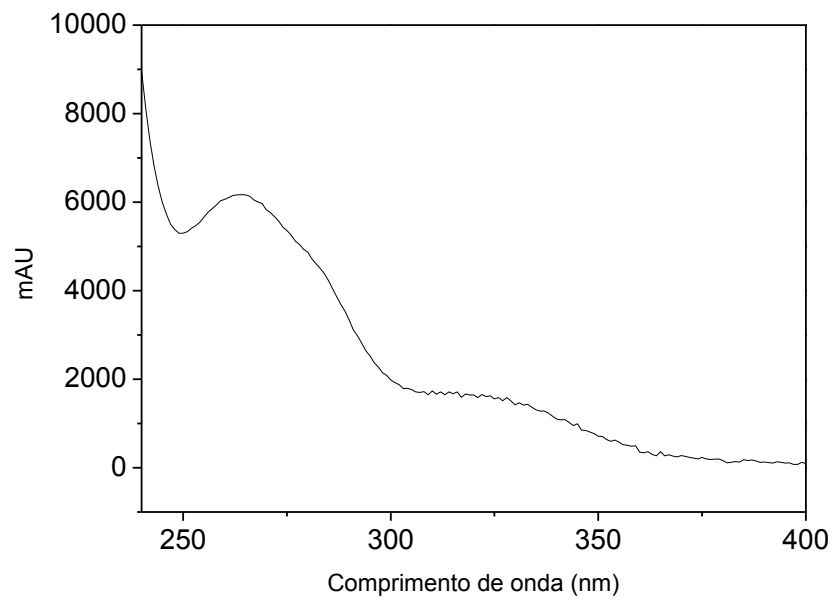


Figura B3 – Cromatograma da extração do ácido fólico da matriz alimentícia utilizando KOH e HCl.

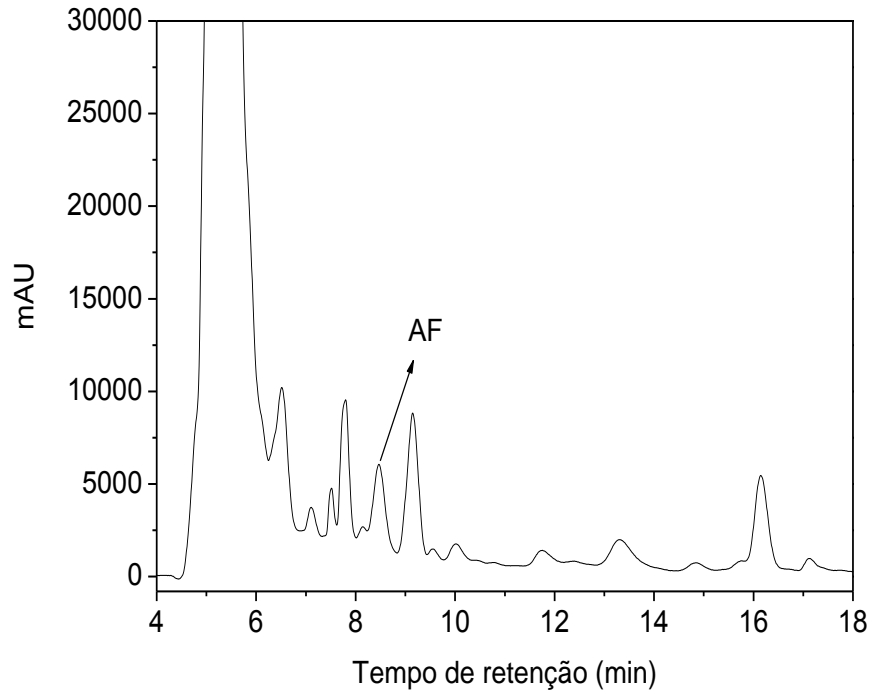


Figura B4 – Espectro ultravioleta visível do pico cromatográfico do ácido fólico para o extrato alimentício obtido utilizando KOH e HCl.

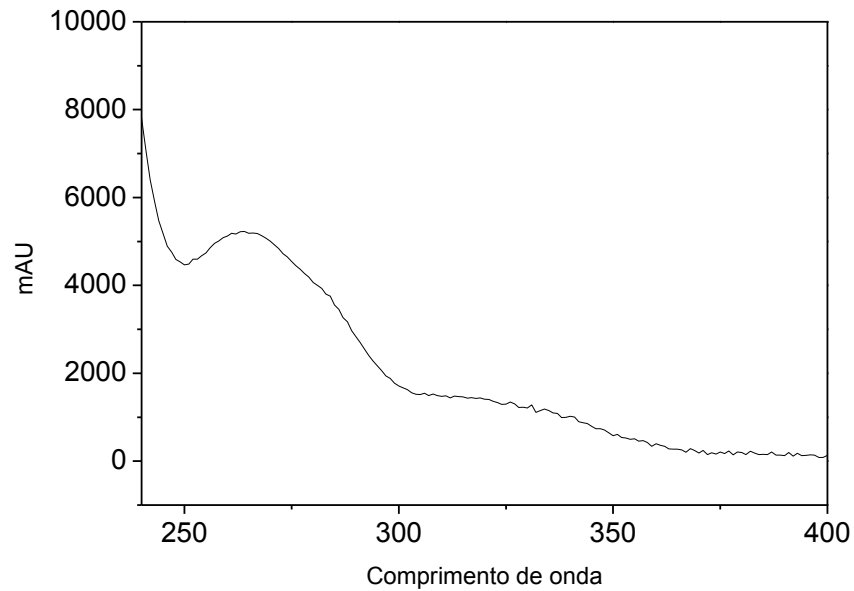


Figura B5 – Cromatograma da extração do ácido fólico da matriz alimentícia utilizando HCl.

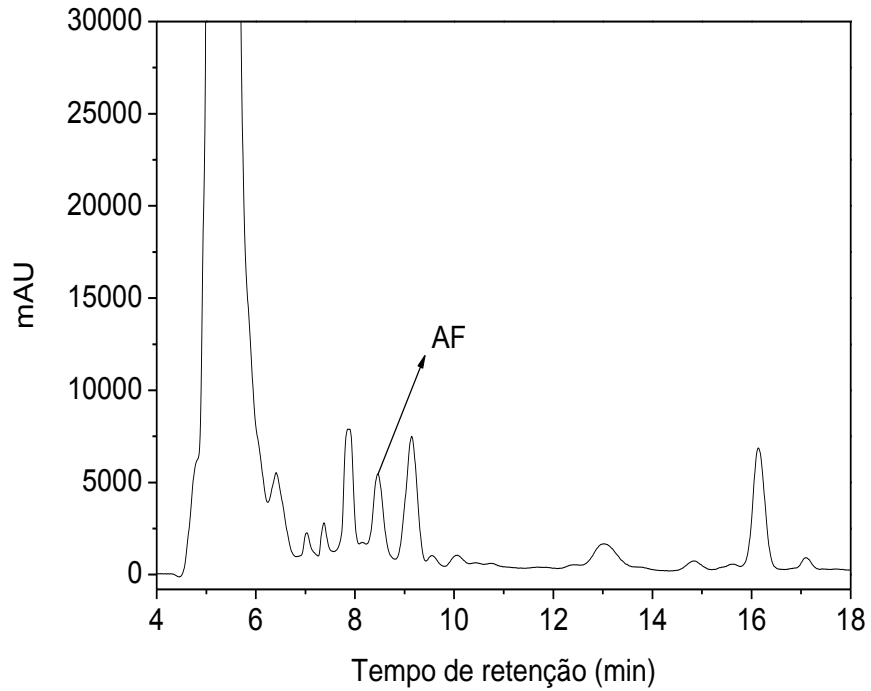


Figura B6 – Espectro ultravioleta visível do pico cromatográfico do ácido fólico para o extrato alimentício obtido utilizando HCl.

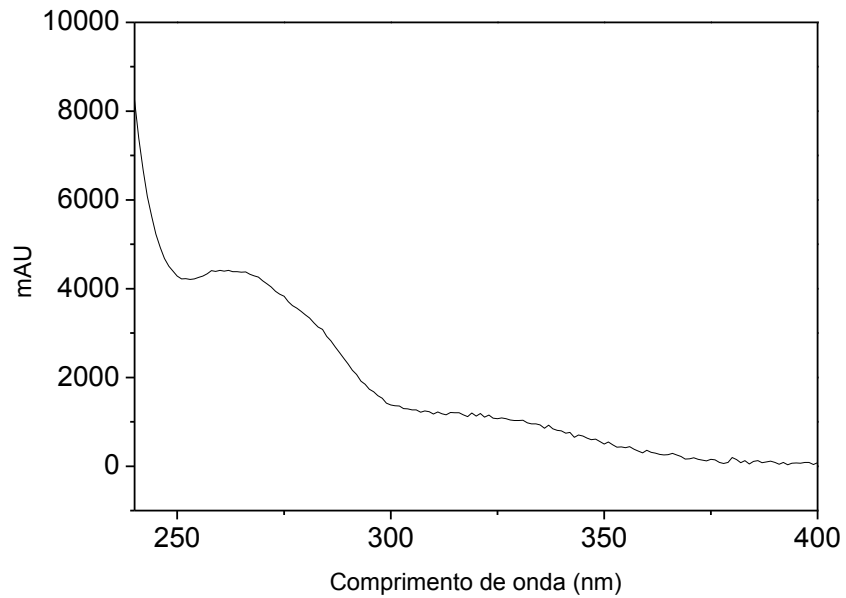


Figura B7 – Cromatograma da extração do ácido fólico da matriz alimentícia utilizando ATCA.

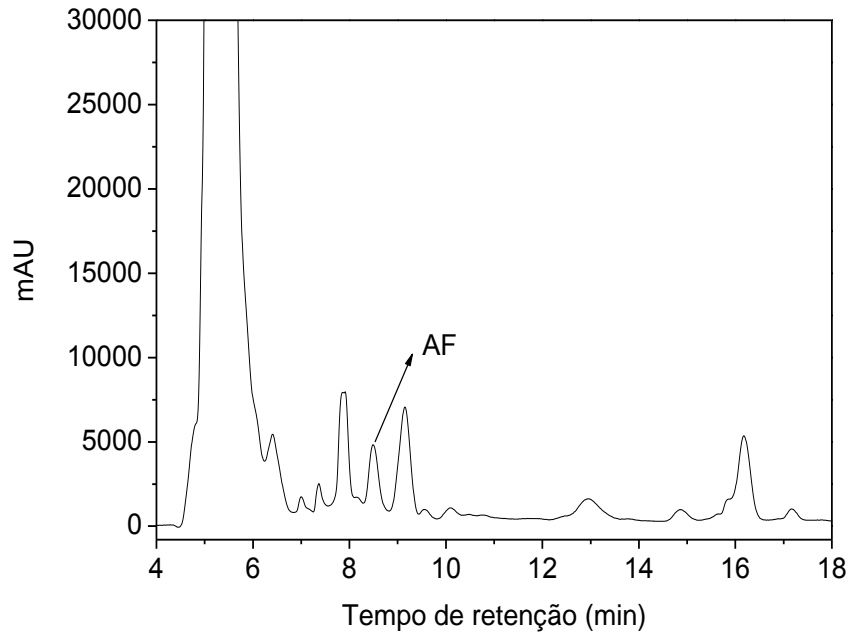
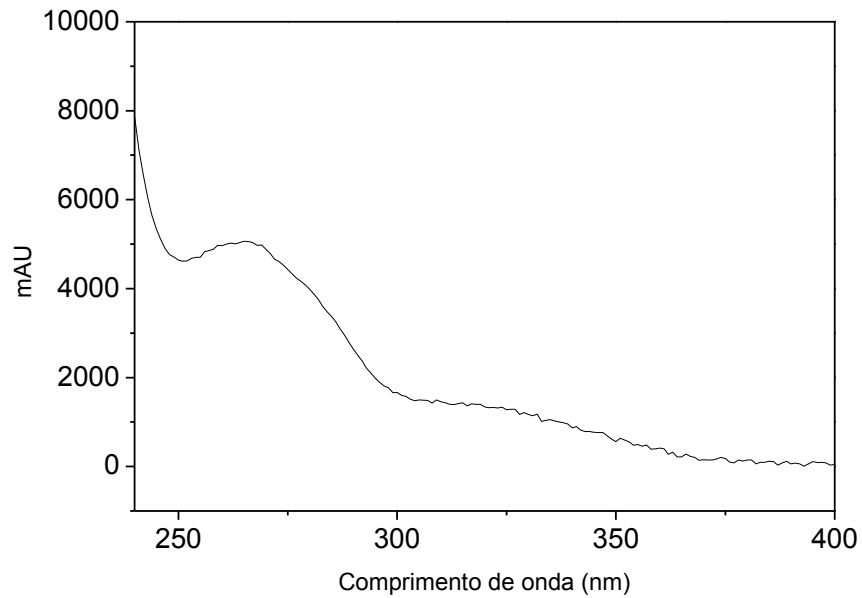


Figura B8 – Espectro ultravioleta visível do pico cromatográfico do ácido fólico para o extrato alimentício obtido utilizando ATCA.



ANEXO C

Cromatogramas da etapa de lavagem do cartucho

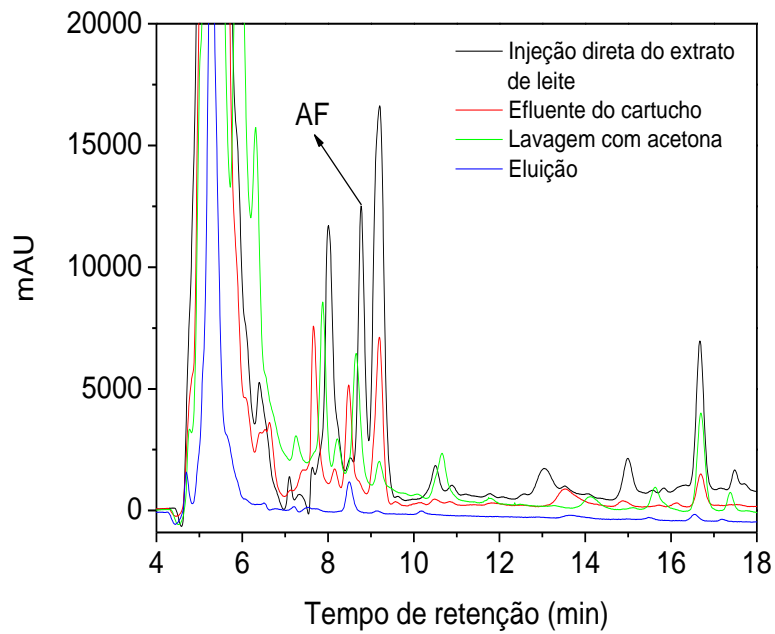
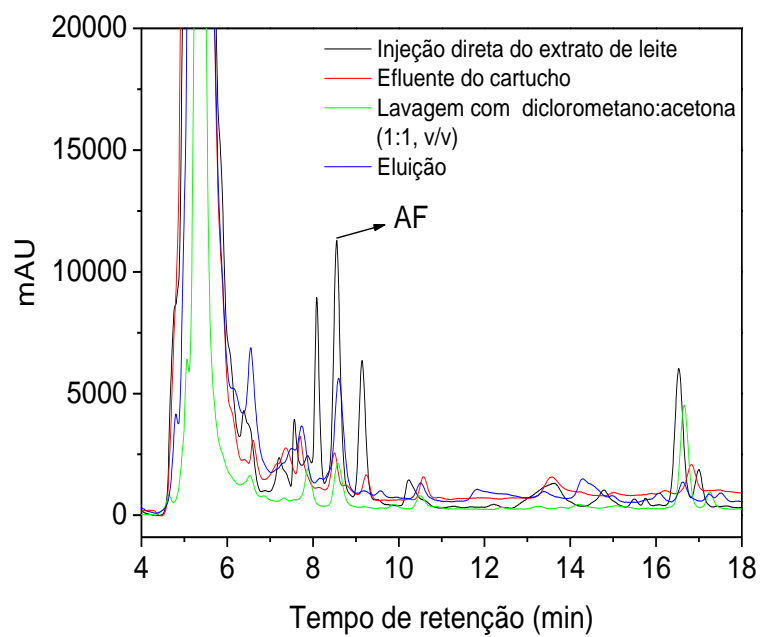
Figura C1 – Cromatogramas das etapas MISPE com lavagem do cartucho com acetona.**Figura C2** – Cromatogramas das etapas MISPE com lavagem do cartucho com diclorometano:acetona (1:1, v/v).

Figura C3 – Cromatogramas das etapas MISPE com lavagem do cartucho com clorofórmio.

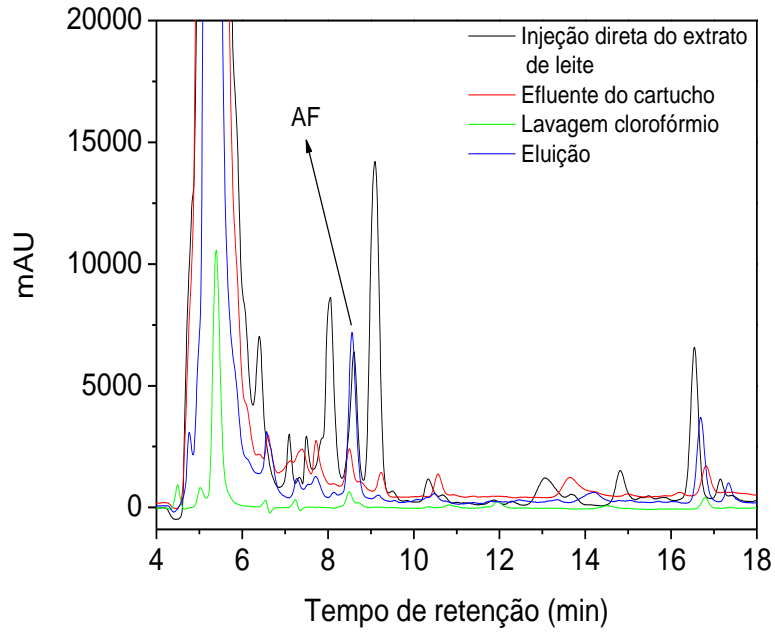


Figura C4 – Cromatogramas das etapas MISPE com lavagem do cartucho com diclorometano:etanol (1:1, v/v).

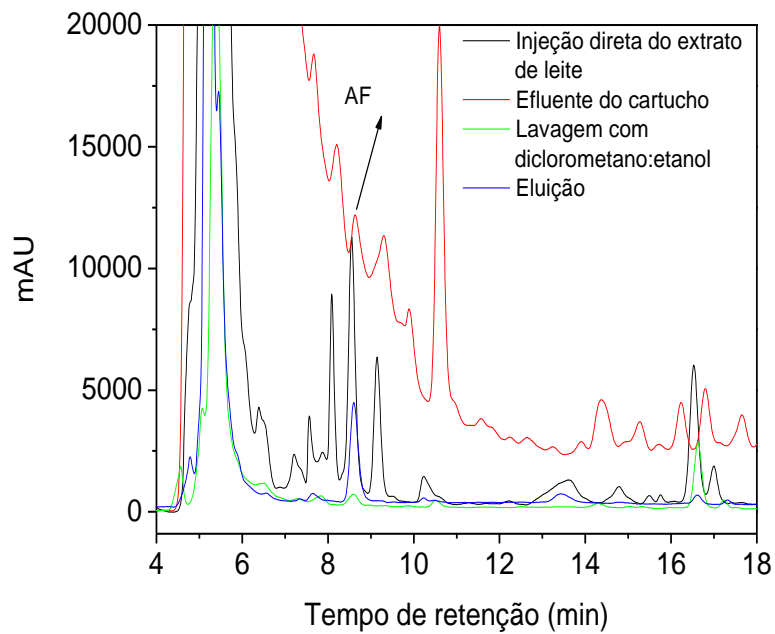


Figura C5 – Cromatogramas das etapas MISPE com lavagem do cartucho com ácido acético 0,1 mol L⁻¹.

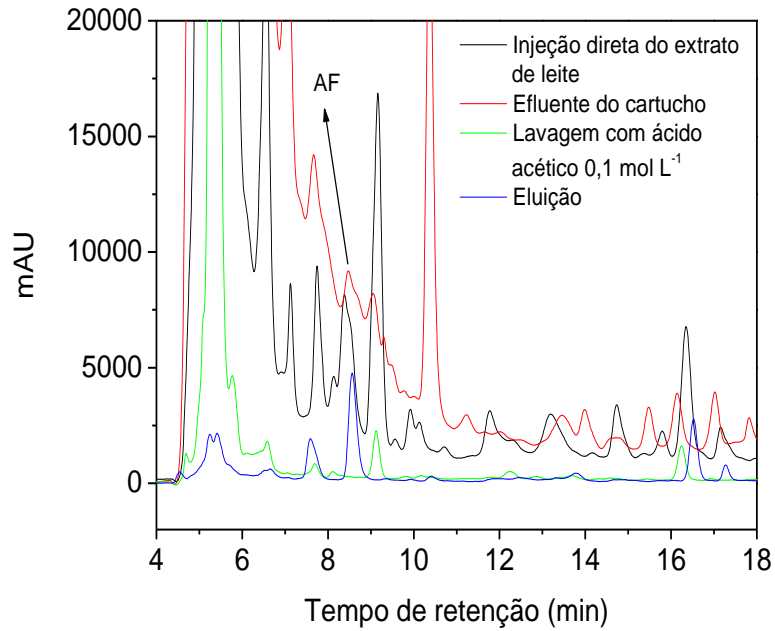


Figura C6 – Cromatogramas das etapas MISPE com lavagem do cartucho com diclorometano.

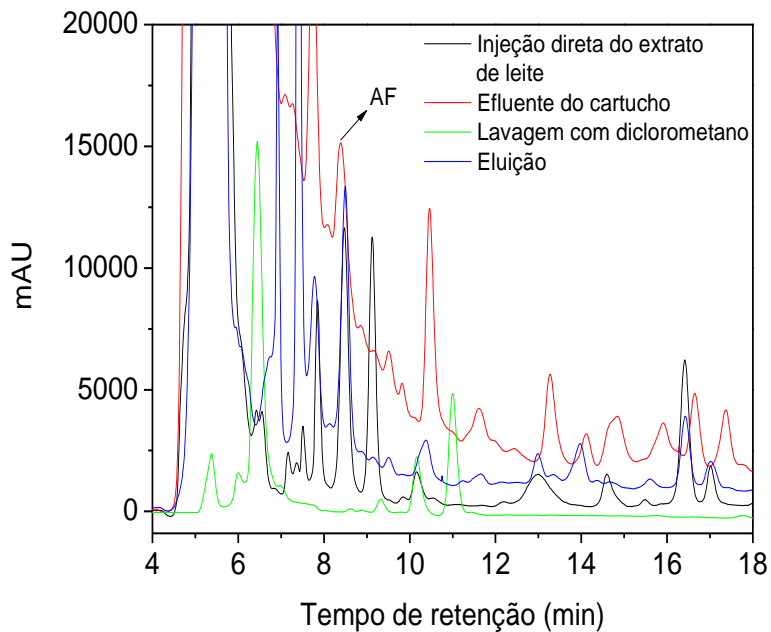


Figura C7 – Cromatogramas das etapas MISPE com lavagem do cartucho com hexano.

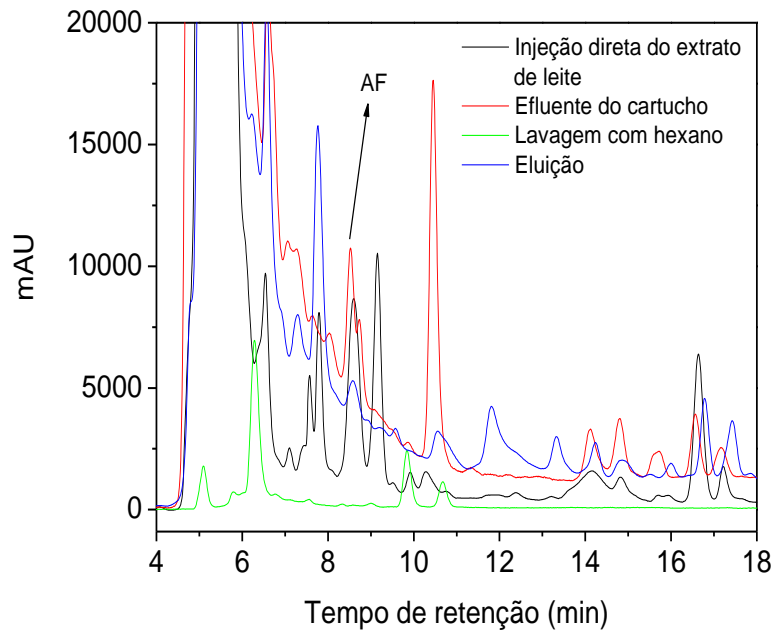
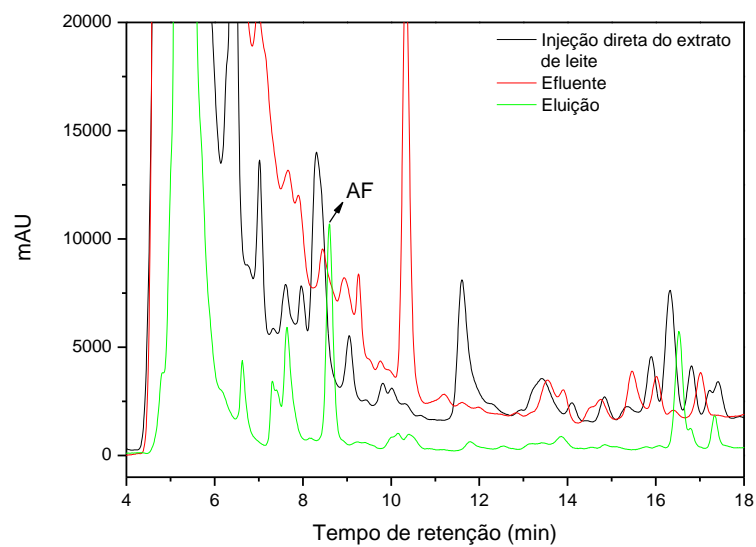


Figura C8 – Cromatogramas das etapas MISPE sem lavagem do cartucho.



ANEXO D

Cromatogramas da etapa de eluição do cartucho

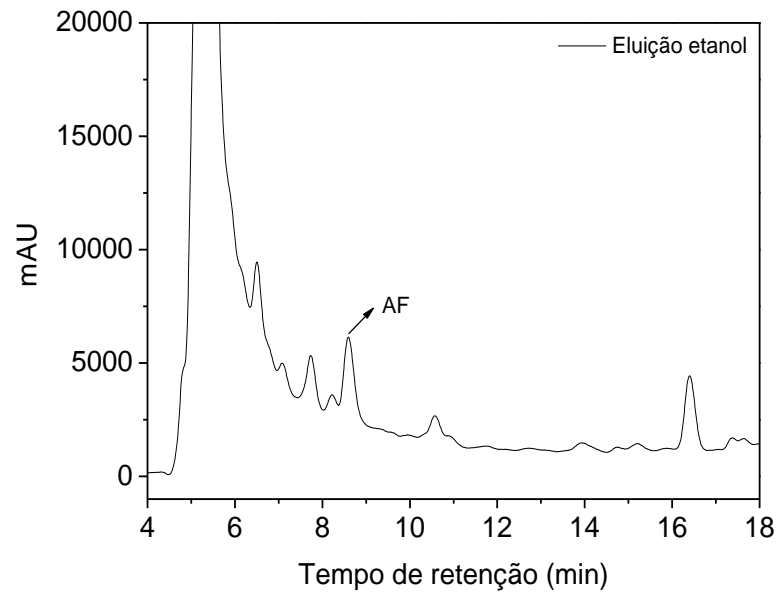
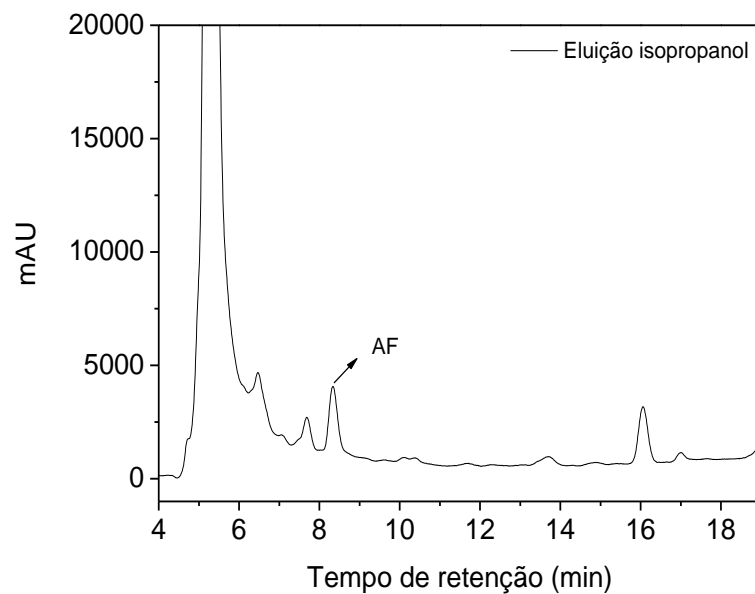
Figura D1 – Cromatogramas da etapa de eluição do procedimento MISPE com etanol.**Figura D2** – Cromatogramas da etapa de eluição do procedimento MISPE com isopropanol.

Figura D3 – Cromatogramas da etapa de eluição do procedimento MISPE com acetato de etila.

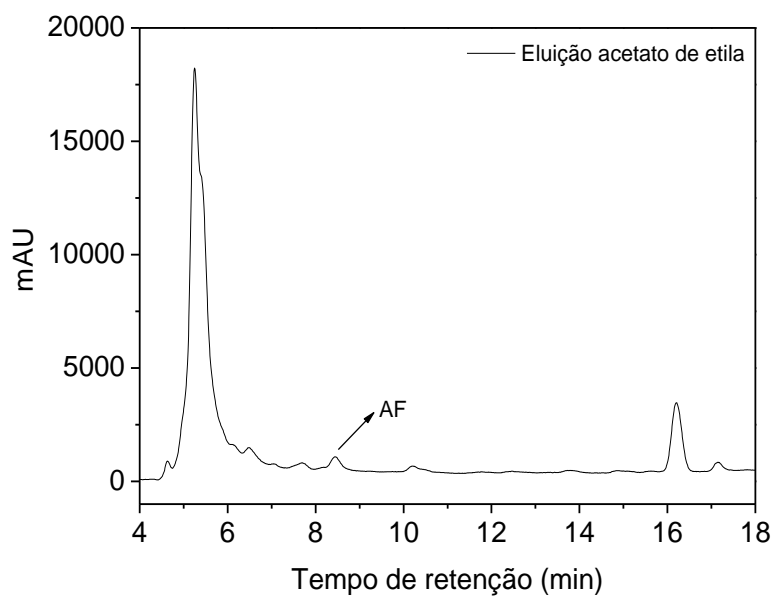


Figura D4 – Cromatogramas da etapa de eluição do procedimento MISPE com acetonitrila:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 2,8 (15:85, v/v).

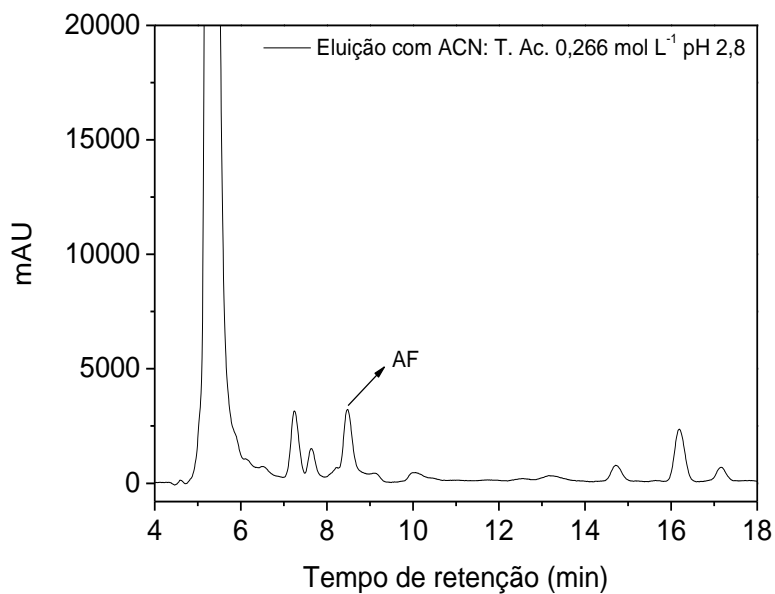


Figura D5 – Cromatogramas da etapa de eluição do procedimento MISPE com acetonitrila:tampão acetato 0,266 mol L⁻¹ pH 5,7 (15:85, v/v).

