

ROSARIO JOSEFINA UZURIAGA SÁNCHEZ

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS COM
POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPS)
PARA A DETERMINAÇÃO DE BIOTINA EM LEITE

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

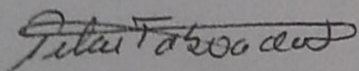
Araraquara-SP
2014

ROSARIO JOSEFINA UZURIAGA SÁNCHEZ

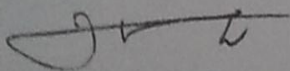
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 02 de setembro de 2014.

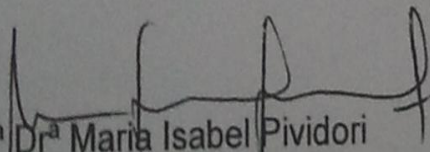
BANCA EXAMINADORA



Prof^{ra}. Dr^a. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof^{ra} Dr^a Hideko Yamanaka
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof^{ra} Dr^a Maria Isabel Pividori
Universitat Autònoma de Barcelona / Barcelona / Espanha

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Rosario Josefina Uzuriaga Sánchez

Nascimento: 03/05/1983

Nacionalidade: Peruana

Naturalidade: Lima -Perú

Estado Civil: Solteira

Filiação: Andrés Uzuriaga e Josefina Sánchez

Endereço: Av. Alberto Toloi 185 apto 32-Bloco 6, Bairro Quitandinha, CEP 14800-060, Araraquara/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação: Bacharel em Química - *Universidad Nacional de Ingenieria*, Lima – Peru. Período: 08/2005 a 12/2011.

2.2 Pós-graduação: Mestrado em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período: 08/2012 a 07/2014.

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

3.1. Uzuriaga, R.S.; Wong, A.; Picasso, G.; Pividori, M.I. e Sotomayor, M.D.P.T. *Síntese de Polímero de Impressão Molecular Magnético seletivo para 1-cloro-2,4 dinitrobenceno um poluente ambiental*. 17º ENQA. Belo Horizonte – MG. Outubro de 2013.

3.2. Rosario Uzuriaga Sánchez, Gino Italo Picasso, Maria Isabel Pividori e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor. *Nanopartículas magnéticas modificadas con polímeros molecularmente impresos (MIPs) con ligación selectiva a la biotina*. Aceito para apresentação em forma de painel no 31º Congresso

Latinoamericano de Química – CLAQ, a ser realizado entre 14 e 17 de Outubro de 2014 em Lima- Peru.

4. PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

- 4.1. Gestão de Qualidade em Laboratórios de ensaio, Norma ISO /IEC 17025 : FIQ UNMSM (22-25 de novembro 2010).
- 4.2. XXV CONGRESO PERUANO DE QUIMICA: SOCIEDADE QUIMICA PERUANA (14 -16 de outubro 2010).
- 4.3. Calizas, Cal Viva y Cal Hidratada: Métodos para análises químicas (12-15 de fevereiro de 2011).
- 4.4. Gestão da Qualidade em Laboratórios de ensaio e sua relação com a Produtividade e o Meio Ambiente (15-18 de setembro del 2011). Faculdade de Ciencias da Universidade Nacional de Engenharia – Lima, Peru.
- 4.5. 17º Encontro Nacional de Química Analítica (Outubro de 2013). Belo Horizonte – MG.

DEDICATÓRIA

Eu Dedico este trabalho...

A Deus por amarme incondicionalmente.

*A meus pais Josefina e Andrés, que sempre me incentivam, apoiam,
e acreditam em mim para seguir em frente.*

*A meus queridos irmãos Marco, Rocio, Milagros, Luis , e a minhas
sobrinhas Regina, Claudia, Gabriela, Andrea ,Maria Paz e Gianella
pelo amor e apoio de sempre.*

*Às outras pessoas da minha família e amigos que torceram pelo
meu mestrado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua fidelidade e infinita misericórdia.

Aos meus pais, de quem muito me orgulho. Vocês são meus maiores exemplos! As palavras são poucas para expressar... mas mesmo assim, eu tento estas: Muito obrigada por tudo! Amo vocês!

A minha orientadora Pilar Taboada, por toda ajuda, paciência, incentivo e confiança. Muito obrigada pela oportunidade concedida, e pelo privilégio de ter sido orientada por você. Obrigada por sempre me incentivar a fazer o meu melhor, e por tudo o que aprendi com você. Muito obrigada por tudo!

Às meus irmãos, Marco ,Luis , Milagros e Rocio, de quem me orgulho muito também, um dia eu alcanço o nível de organização de vocês!

A você Jorge, pela sua amizade, carinho e sua incondicional ajuda.

Aos professores, Hideko Yamanaka e Antonio Pupin Ferreira que participaram do meu exame de qualificação e contribuíram valiosamente com sugestões e ensinamentos.

Aos amigos da UNI , Bryan, Jaime e Javier, pela amizade conquistada através dos anos.

Aos amigos de laboratório, Maricely, Elsa, Ademar, Marcos, Sabir, Mayara, André, Eduardo, Matheus, Diego, Natacha, Tati, Bianca e Rafael.

Aos integrantes do grupo de Eletroanalítica do IQ, pela convivência.

Ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pelas oportunidades e pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho

À CAPES , pela bolsa concedida.

A todos, muito obrigada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fórmula estrutural da Vitamina B ₈ Biotina.	23
Figura 2-	Estrutura cristalina da espinela inversa: magnetita. Fonte: Aquino,2010[33]	25
Figura 3-	Alinhamento dos momentos magnéticos na magnetita. Fonte: Aquino , 2010 [33].	26
Figura 4-	Estrutura dos sólidos ferromagnéticos de acordo com o tamanho de partícula.Adaptado :Castrillón García , 2012.[35]	28
Figura 5-	Curva teórica do campo magnético para nanopartículas superparamagnético,ferrimagnéticas ou paramagnéticas, onde os parâmetros são indicados: campo coercivo (H), magnetização de saturação (M _S) e magnetização remanescente (M _R). Adaptado :Castrillón García , 2012.[35]	29
Figura 6-	Esquema geral de síntese e atuação do MIP. Adaptado : Mahony, 2005 [50].	31
Figura 7-	Princípios da Impressão Molecular. (A) impressão não covalente. (B) impressão covalente/semi-covalente. Fonte:Hayes e Davison,2002 [54].	33
Figura 8-	Representação esquemática dos passos sintéticos em diferentes procedimentos de polimerização.Adaptado :N.Pérez- Moral.[60]	43
Figura 9-	Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida (SPE). Fonte: Vicente,2009 [69].	44
Figura 10-	Esquema do procedimento operacional para os experimentos de adsorção.[76]	48
Figura 11-	Representação esquemática da polimerização em mini-emulsão. Adaptado Valero Navarro, 2011.	61
Figura 12-	Representação esquemática da preparação do polímero molecularmente impresso para biotina sobre nanopartículas magnéticas.	63
Figura 13-	Estrutura da magnetita revestida com grupos Si-OH	66

Figura 14-	Polimerização via radical livre do monômerofuncional ácido metacrílico com AIBN como iniciador radicalar .Fonte.Sellerger 2001.	68
Figura 15-	Esquema proposto para a obtenção do MIP magnético para biotina pelo método core - shell.	69
Figura 16-	Resultados da modelagem molecular entre a biotina e os 20 monômeros apresentados na Tabela 4.	76
Figura 17-	Estrutura química dos monômeros usados neste trabalho	77
Figura 18-	Imagens de MEV para : (a) Magnetita encapsulada , (b) MIP magnético de Biotina.	78
Figura 19-	Microscopias eletrônicas de varredura e seus gráficos da estimativa do diâmetro médio das partículas (a) Nanopartículas de magnetita. (b) Magnetita modificada com TEOS. (c) Magnetita modificada com MPS. (d) Magnetita modificada com polímero impresso para biotina usando ácido acrílico como monômero funcional.	80
Figura 20-	Espectros de infravermelho de (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-TEOS}$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$, (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP}$ e (e) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NIP}$.	82
Figura 21-	Espectros de FTIR do MIP e EDGMA sintetizados com o monômero AA .	83
Figura 22-	Isoterma BET para o MIP e NIP magnético para biotina e MIP e NIP sem magnetita de Biotina.	84
Figura 23-	Modelo da formação morfológica dos poros da rede polimérica do polímeros de impressão molecular.Adaptado : Spivak , 2005.[51]	86
Figura 24-	Magnetometria da amostra vibrante para as diferentes amostras obtidas durante o processo de síntese das magneto-MIP para biotina. Em el gráfico inserido mostra-se a ampliação da curva de histerese obtida para o magneto-MIP.	87
Figura 25-	Eficiência das magneto-MIP sintetizadas, na presença de um campo magnético externo. (a) Antes e (b) Após aplicação de um campo magnético fornecido por um ímã de Ne.	88

- Figura 26-** Espectros de XRD de (a) Fe₃O₄ ;(b) Fe₃O₄ @SiO₂ -TEOS ; e (c) Fe₃O₄ @MIP. 90
- Figura 27-** Cromatograma de extração da biotina.Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄ usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para biotina em 13 minutos. 91
- Figura 28-** Otimização da dosagem do polímero magnético nos experimentos de adsorção, para uma solução de concentração inicial de biotina 10 mg L⁻¹ preparada em água:metanol (1:9 v/v)contendo de 5 até 100 mg de MIP para biotina. 93
- Figura 29-** Efeito do pH na adsorção de biotina pelo MIP-magnético sintetizado com ácido acrílico. Temperatura: 25 °C, massa de adsorvente: 10 mg, volume de solução: 5,0 mL, tempo de contato: 2 h, concentração inicial de analito: 10 mg L⁻¹ preparado em água : metanol (1:9 v/v). 94
- Figura 30-** Efeito do tempo na adsorção de biotina pelo MIP–magnético sintetizado com ácido acrílico. Temperatura: 298 K, massa de adsorvente: 10 mg, volume de solução: 5 mL de solução padrão de biotina preparada em água:metanol (1:9, v/v; pH 7,0), concentração inicial de analito: 10 mg L⁻¹. 95
- Figura 31-** Cromatograma de soluções padrão de biotina de 5 mg L⁻¹ a 100 mg L⁻¹. Inserido: Curva analítica na faixa de concentrações entre 5,0 e 100 mg L⁻¹ em λ de 210 nm. 98
- Figura 32-** Construção das isotermas de adsorção para MIP utilizando os monômeros AAC (ácido acrílico), 1-VI (vinilimidazol) e AM (ácido metacrílico)pela síntese de miniemulsão C_i; Concentração inicial de analito Q: massa de Biotina ligada por grama de MIP utilizado. 98
- Figura 33-** Isotermas de adsorção do magneto-MIP e magneto-NIP do monômero ácido acrílico obtidos por mini-emulsão. Experimentos realizados a 298 K, massa do adsorvente: 10 mg, volume de solução: 5,0 mL, tempo de contato: 2 h. 99
- Figura 34-** Eficiência das magneto-MIP pelo método de miniemulsão sintetizadas, na presença de um campo magnético externo. (a) Antes e (b) Após aplicação de um campo magnético fornecido por 100

um ímã de Ne.

- Figura 35-** Isotermas de adsorção para magneto-MIP sintetizados com os monômeros ácido acrílico (AAC), 1-vinilimidazol (VI) e ácido metacrílico (AM). C_i : Concentração inicial do analito. Q: massa de biotina ligada por grama de MIP utilizado. 101
- Figura 36-** Estrutura química da biocitina, análogo estrutural da biotina. 102
- Figura 37-** Cromatograma da Biotina e Biocitina. Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄: metanol (80:20, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para Biotina 13 min e Biocitina 4.5min. 103
- Figura 38-** Isotermas de adsorção para MIP para biotina, em solução padrão de biotina e de biocitina. 104
- Figura 39-** Isotermas de Freundlich linearizadas usadas para estimar as características de ligação do MIP-biotina, na presença de seu *template* (a) e de seu possível interferente, a biocitina (b). 106
- Figura 40-** Estrutura química da biotina pentilaminada utilizada como análogo estrutural no estudo de seletividade do magneto-MIP-biotina-AA e de seu respectivo NIP. 107
- Figura 41-** Cromatograma da Biotina e Biotina Pentilaminada. Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄: metanol (80:20, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para Biotina 15 min e Biotina Pentilaminada 9min. 108
- Figura 42-** Estrutura química da NHS-SS biotina utilizada como análogo estrutural no estudo de seletividade do magneto-MIP-biotina-AA e de seu respectivo NIP. 109
- Figura 43-** Cromatograma da Biotina e R-NHS-SS-Biotina. Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄: metanol (80:20, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da 110

Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para Biotina 15 min e R-NHS-SS-Biotina 3min.

- Figura 44-** Estrutura química da 1 cloro-2,4 dinitrobenceno utilizada como interferente no estudo de seletividade do magneto-MIP-biotina-AA e de seu respectivo NIP. 112
- Figura 45-** Cromatograma do 1 cloro- 2,4 dinitrobenceno .Medidas realizadas em fase móvel composta por Agua : metanol (30:70, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 260 nm em tempo de retenção 6,5 min. 113
- Figura 46-** Cromatogramas obtidos para padrões de Biotina, tal como descrito na parte experimental. 115
- Figura 47-** Curva de calibração para a Biotina obtida com os dados da Figura 47. 116
- Figura 48-** Cromatogramas comparativos para um padrão de 10 mg L⁻¹ de Biotina e o cromatograma resultante da Aplicação do MIP magnético de biotina como material adsorvente de leite de vaca CRÚ após de 2 - 3 horas de adsorsão 117
- Figura 49-** Cromatogramas comparativos para um padrão de 10 mg L⁻¹ de Biotina e o cromatograma resultante da Aplicação do MIP magnético de biotina em amostra de leite em pó preconcentrada 10 vezes. 117
- Figura 50-** Cromatogramas comparativos para um padrão de 10 mg L⁻¹ de Biotina e o cromatograma resultante da Aplicação do MIP magnetico de biotina em amostra de leite desnatada preconcentrada 10 vezes 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de polímeros impressos molecularmente. Fonte: Tarley e Kubota, 2005.	34
Tabela 2:	Estruturas químicas de reagentes de ligação cruzada comumente usados em sínteses de MIPs. Fonte: Tarley e Kubota, 2005.	36
Tabela 3:	Estruturas moleculares dos iniciadores radicalares empregados na síntese de MIP. Fonte: Tarley e Kubota, 2005.	38
Tabela 4:	Monômeros comumente usados na síntese de MIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais	58
Tabela 5 :	Resultados da porosidade obtidos através da isoterma de adsorção BET para as amostras magneto-MIP e MIP para biotina e seus respectivos NIP.	84
Tabela 6 :	Remoção da biotina depois da lavagem.	
Tabela 7 :	Constantes Cinéticas de Primeira- ordem e Segundo ordem para o MIP magnético de biotina	96
Tabela 8:	Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para Biotina e Biocitina	104
Tabela 9:	Resultados da análise do ajuste de Langmuir para a biotina e a biocitina.	105
Tabela 10:	Resultados da análise do ajuste de Freundlich para biotina e biocitina	106
Tabela 11:	Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para Biotina e Biotina pentilaminada	109
Tabela 12:	Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para Biotina e NHS-SS-Biotina	111

Tabela13:	Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para Biotina e 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.	. 114
Tabela 14	Composição química da leite cru	. 118
Tabela 15:	Recuperação da Biotina para amostras de leite de 10 mg L ⁻¹	. 119

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AIBN	2,2'-azo- <i>bis</i> -isobutironitrila
EDGMA	Etileno glicol dimetacrilato
TEOS	Tetraortosilicato
MPS	3-metacriloxipropiltrimetoxissilano
MIP	Polímero Molecularmente Impresso (<i>Molecularly imprinted polymer</i>)
NIP	Polímero sem impressão molecular (<i>non-imprinted polymer</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
BET	Brunauer, Emmett, Teller
VSM	Magnetometria de amostra Vibrante
DRX	Difração de raios X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
CDBN	1-cloro- 2,4 dinitrobenzeno

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo principal desenvolver um método eficiente para a preparação de nanopartículas magnéticas decoradas/modificadas com polímeros molecularmente impressos (MIPs-magnéticos) para ser empregadas como material adsorvente, visando a determinação de biotina em leite.

O monômero funcional para a síntese do polímero impresso foi selecionado a partir de estudos de modelagem molecular, usando para tanto os programas computacionais HyperChem® 8.0.5 e OpenEye®. Na síntese do MIP para biotina o ácido acrílico foi usado como monômero funcional; etileno glicol dimetacrilato usado como reagente de ligação cruzada, 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrila como iniciador radicalar e metanol como solvente porogênico. Também foi sintetizado um polímero não impresso que serviu como controle para estudos comparativos. O polímero de impressão magnético para biotina e seu respectivo polímero sem impressão molecular, foram sintetizados sobre as nanopartículas magnéticas através do método *core-shell*, usando processo sol-gel com tetra-orto-silicato para permitir a posterior silanização das nanopartículas de ferrita com silano-acrilato. A caracterização dos polímeros de impressão magnéticos para biotina e polímero sem impressão magnéticos foi realizada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, histereses magnética; difração de raios X; microscopia eletrônica de varredura; porosimetria de adsorção de nitrogênio; e por estudos de ligação para avaliar a capacidade de adsorção, a afinidade e seletividade do material obtido, através dos parâmetros obtidos das respectivas isotermas de adsorção. A seguir, o material foi satisfatoriamente aplicado na determinação de biotina em leite cru, leite desnatado e leite em pó usando a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do analito, obtendo-se valores de recuperação média de 87,4%.

Palavras-chave: Biotina, nanopartículas magnética, polímeros impressos, isotermas de adsorção, leite.

ABSTRACT

This work aimed to develop an efficient method for the preparation of magnetic nanoparticles decorated/modified with molecularly imprinted polymers (MIPs magnetic) to be employed as an adsorbent material, for the determination of biotin in milk.

The functional monomer for the synthesis of imprinted polymer was selected from molecular modeling studies, using HyperChem® 8.0.5 and OpenEye®. Thus, in the synthesis of the MIP for biotin, the acrylic acid was used as functional monomer; ethylene glycol dimethacrylate used as crosslinking reagent, 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile as radical initiator and methanol as porogenic solvent. Non-imprinted polymer was also synthesized in order to perform their comparative studies.

The molecularly imprinted polymers of biotin and the respective non-imprinted polymer, were synthesized on the magnetic nanoparticles through the method of core-shell using the process of sol-gel with tetraorthosilicate to allow the subsequent silanization of iron-nanoparticles with 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane. The characterization of the magnetic materials (MIP and NIP) was accomplished by Fourier transform infrared spectroscopy, magnetic hysteresis; X-ray diffraction; scanning electron microscopy and porosimetry nitrogen adsorption. The binding studies from the respective adsorption isotherms were performed to evaluate the adsorption capacity, affinity and selectivity for the material obtained. The material was successfully applied for the determination and quantification of biotin in the raw milk, skimmed milk, and powdered milk using high performance liquid chromatography and the recovery were obtained 87.4%.

Keywords: Biotin, magnetic nanoparticles, imprinted polymers, adsorption isotherms, milk.

SUMARIO

CAPITULO I	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Considerações Gerais	21
1.2. As Vitaminas	22
1.2.1. Biotina	23
1.3. Magnetita	25
1.3.1 Estrutura cristalina	25
1.3.2. Comportamento Magnético	26
1.3.3. Nanopartículas Magnéticas	27
1.4. Polímeros Biomiméticos ou Molecularmente Impressos: <i>MIP</i> (<i>molecularly imprinting polymers</i>)	30
1.4.1. Síntese de polímeros de impressão molecular	32
1.4.2. Métodos de polimerização	38
1.4.2.1. Polimerização em bulk	39
1.4.2.2. Polimerização por precipitação	40
1.4.2.3. Polimerização por suspensão	40
1.4.2.4. Polimerização por enchimento de duas etapas	41
1.4.2.5. Polimerização por <i>core-shell</i>	41
1.4.2.5.1. Polimerização por <i>core-shell</i> usando partículas magnéticas	42
1.5. Emprego dos Mip como materiais adsorventes	43
1.6. Métodos experimentais para a caracterização das propriedades de afinidade de um Mip	48
1.6.1. Modelos de Adsorção	49
1.6.1.1. Modelo de Lagmuir	49
1.6.1.2. Modelo de Freundlich	50
1.6.1.3 Modelo de Lagmuir- Freundlich	51

1.7 Objetivo	53
1.7.1 Objetivo Geral	53
1.7.2 Objetivos específicos	53
	54

CAPITULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL	55
2.1. Aparelhagem e instrumentai e instrumento básica	55
2.2. Reagentes e soluções	56
2.3. Simulação Computacional empregada na escolha do monômero funcional para síntese do MIP para Biotina	59
2.4. Síntese dos magneto-MIP pelo método de mini-emulsão	59
2.4.1. Síntese da magnetita por co-precipitação	59
2.4.2. Procedimento de encapsulamento da magnetita	59
2.4.3. Síntese de MIP	60
2.5. Síntese dos magneto-MIP pelo método <i>core-shell</i>	61
2.6. Reações envolvidas na síntese pelo método de core-shell	64
2.6.1. Obtenção das nanopartículas de magnetita	64
2.6.2. Modificação das nanopartículas de magnetita com TEOS pelo processo sol- gel	65
2.6.2.1 Hidrólise de TEOS por catálise básica	65
2.6.2.2 Condensação do tetra- hidróxido de silício	66
2.6.3 Silanização das nanopartículas magnéticas modificado com TEOS	67
2.6.4 Polimerização do MIP de biotina sobre nanopartículas Magnéticas	67
2.7. Caracterização dos polímeros de impressão molecular MIP e dos correspondentes NIP	69
2.7.1. Caracterização morfológica dos MIP através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	69
2.7.2. Caracterização dos polímeros por espectroscopia no infravermelho (FTIR)	70
2.7.3. Análise por adsorção e desorção de N ₂ (método BET) dos	70

polímeros impressão magnéticos	
2.7.4. Análise de magnetometria de amostra vibrante (VSM)	71
2.7.5. Análise por difração de raios x (DRX)	71
2.7.6 Caracterização dos polímeros por experimentos de afinidade	72
2.8. Aplicação dos magneto-MIP em amostras de leite	73
CAPÍTULO III	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1. Simulações computacionais: Obtenção dos dados teóricos para escolha do monômero funcional	75
3.2. Caracterização dos MIPs sintetizados	77
3.2.1. Caracterização morfológica através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	77
3.2.2. Caracterização química por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR)	81
3.2.3. Análise por adsorção e desorção de N ₂ (método BET) dos polímeros impressão magnéticos	83
3.2.4. Análise de magnetometria de amostra vibrante (VSM)	87
3.3. Extração de analito das cavidades seletivas do magneto-MIP	90
3.4. Caracterização dos polímeros por experimentos de afinidade através da análise de isotermas de adsorção	92
3.4.1 Comparação da eficácia na adsorção das magneto -MIP obtidas mini-emulsão e por <i>core-shell</i> .	97
3.5. Estudos de seletividade do magneto -MIP	101
3.5.1. Seletividade da biotina em relação à biocitina	102
3.5.2. Seletividade da biotina em relação à biotina-pentilaminada	107
3.5.3. Seletividade da biotina em relação à NHS-ss-biotina	109
3.5.4. Seletividade da biotina em relação ao 1cloro 2,4 dinitrobenceno	112
3.6. Aplicação do MIP magnético de biotina como material adsorvente para detecção de leite	114

CAPÍTULO IV	120
4. CONCLUSÕES	121
5. REFERÊNCIAS	122

CAPÍTULO 1

1.1. Considerações Gerais

A tecnologia de impressão molecular (MIT) tem desenvolvido polímeros com alta seletividade e afinidade para espécies alvo por materiais de reconhecimento molecular, conhecidos como polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*). A atenção dada a estes materiais tem sido consequência de suas vantagens inerentes como, o baixo custo de síntese e as elevadas estabilidades mecânica e química, além de um reconhecimento altamente seletivo. Assim, aplicação dos polímeros molecularmente impressos (MIP) em bioanálises [1], análises farmacêuticas [2-3], análises de alimentos [4], análises ambientais [5-6], extração de fase sólida [7-9], cromatografia líquida de alta eficiência [10-11] e sensores [12], têm sido relatadas na literatura. No entanto, na síntese dos MIP pelo método de *bulk*, a mais tradicional e amplamente usada, algumas desvantagens têm sido descritas, dentre elas podem ser citadas a obtenção de partículas com tamanho irregular, remoção incompleta do analito (*template*), adsorção fraca, e cinética de ligação lenta [13]. Subsequentemente, foi desenvolvida a tecnologia de impressão superficial para poder eliminar as deficiências dos MIP obtidos pelo método tradicional [14-20]. Assim, recentemente, uma nova síntese por *core-shell* está recebendo ampla atenção, na qual a impressão molecular superficial (*shell*) é realizada sobre nanopartículas supermagnéticas (*core*). O material resultante (magneto-MIP) conserva suas propriedades magnéticas, e, portanto, ainda pode ser facilmente manipulado por

campos magnéticos externos, com a adicional vantagem de possuir em sua superfície um material adsorvente seletivo (MIP) para realizar um reconhecimento com elevada eficiência. Adicionalmente, o tamanho das partículas de magneto-MIP obtidas por *core-shell* é pequeno, proporcionando uma elevada área superficial [21-22]. Além disso, os sítios de reconhecimento situam-se na superfície do material, facilitando a acessibilidade do analito às cavidades seletivas, religando mais rapidamente, e sendo mais facilmente removido, quando comparado aos MIP obtidos pelos métodos de síntese tradicional. Estas vantagens dos magneto-MIP tornam estes materiais atraentes para uma ampla variedade de aplicações em biotecnologia, técnicas de separação e desenvolvimento de sensores. Desta forma, esperando que a quantificação de analitos usando estes materiais seja mais sensível e seletiva, devido ao grande número de sítios de reconhecimento localizados sobre a superfície dos MIP em cada partícula de magneto-MIP [23], e em matrizes altamente complexas, aproveitando a vantagem oferecida pelas partículas magnéticas de poderem ser separadas apenas pela ação de um campo magnético externo, esta dissertação visa à síntese de magneto-MIP altamente seletivos à vitamina B₈, também conhecida como biotina e sua aplicação na detecção em leite.

1.2. As Vitaminas

As vitaminas são um grupo de substâncias de estrutura química variada; sem valor energético próprio; necessárias em pequenas quantidades; e que, muitas vezes, o organismo humano é incapaz de sintetizar, e quando possível, as sintetiza em quantidades insuficientes; pelo que sua ingestão exógena se torna essencial. Embora, sua ingestão ainda que em pequenas doses seja necessária, sua ausência

determinará o fracasso nos processos básicos e fundamentais do metabolismo celular [24].

As vitaminas se dividem em dois grupos em função de sua solubilidade, sendo classificadas em vitaminas lipossolúveis e vitaminas hidrossolúveis [24]. As vitaminas lipossolúveis incluem as vitaminas A, D, E e K, enquanto que as vitaminas hidrossolúveis incluem a vitamina C, ou ácido ascórbico, e as vitaminas do complexo B, entre elas, a tiamina, a riboflavina, a niacina, a piridoxina, a cobalamina, o ácido fólico e a biotina. As vitaminas do complexo B estão constituídas por um grupo de moléculas de estrutura química muito heterogênea com variado peso molecular, que oscila desde 122 Da para a niacina até 1.355 Da para a cianocobalamina. Neste trabalho especificamente será estudada a Vitamina B₈ ou biotina.

1.2.1. Biotina

A Vitamina B₈, ou biotina, é composta por um anel bicíclico de imidazolidona e tetraidrotiofeno ligados a um ácido valérico na cadeia lateral (Figura 1).

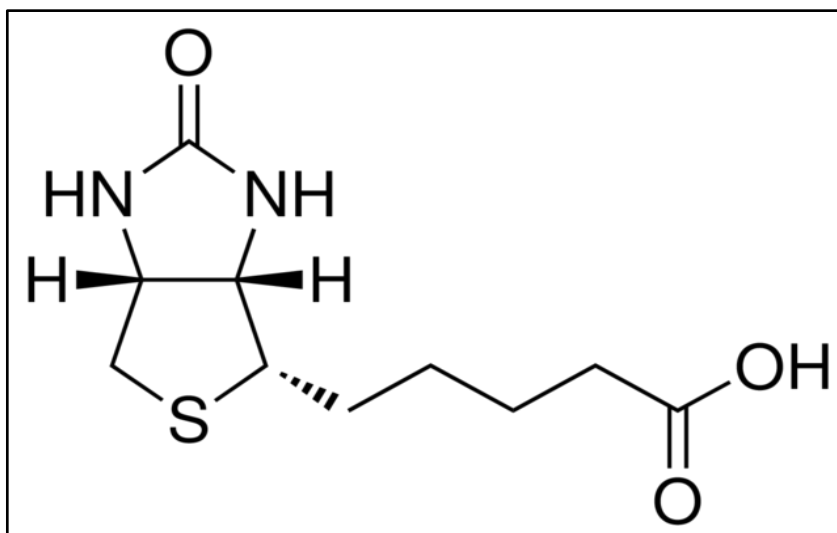


Figura 1: Fórmula estrutural da Vitamina B₈, Biotina.

A nomenclatura química deste composto é *cis*-hexa-hidro- 2-oxo-1,*H*-tieno [3,4-*d*]-imidazol-4-ácido pentanóico. A estrutura molecular da biotina foi elucidada por Kogl em 1937 e Du Vigneaud em 1941, e está caracterizada por três carbonos assimétricos que leva a oito estéreo-isômeros, dos quais apenas a (D+)-Biotina é biologicamente ativa [25-26] . A fórmula empírica é C₁₀H₁₆N₂O₃S (peso molecular de 244,3 g mol⁻¹) e a estrutura molecular foi confirmada em 1943 por Harris [27] que foi o primeiro em alcançar a síntese total desta vitamina [28].

A biotina por ser um ácido fraco tem um valor de pK_a de 4,51 e cristaliza na forma de agulhas incolor, com ponto de fusão de 230-232 °C.

A substância é quase insolúvel em solventes orgânicos; pouco solúvel em água (0,2 g L⁻¹) e em etanol a 95%, v/v (0,8 g L⁻¹); e solúvel em solução alcalina diluída. A biotina é estável ao calor, porém pouco estável à radiação ultravioleta. Em soluções de 9,0 > pH > 4,0 a molécula da biotina também é estável [28].

O corpo humano precisa cerca de 150 µg de biotina por dia, o que normalmente está contido na maioria das dietas. Ainda, sabe-se que o organismo produz biotina através da ajuda alguns microorganismos intestinais [29], fornecendo o total de biotina necessária para o bom funcionamento do organismo.

A biotina é encontrada principalmente ligada a aminoácidos, tais como a lisina, formando a biocitina (biotinil-lisina), que é transportada no sangue ligada a α e β proteínas, como albumina e globulinas. Durante o catabolismo, ocorre a oxidação da biotina, onde a função de tio-éter forma sulfóxidos de biotina [30].

A função bioquímica da biotina é atuar como grupo prostético em reações de transferência de CO₂ mediada por carboxilases, formando uma amida com o grupo ε-amino do resíduo de lisina específica da enzima [31].

A ligação avidina-biotina é altamente estável e irreversível, com constante de afinidade no valor aproximado de 10^{15} , sendo considerada quase uma ligação covalente [30]. Esta interação, não é afetada por alterações extremas de pH, solventes orgânicos ou de agentes denaturantes, é amplamente empregada para monitoramento de muitas substâncias biológicas através de sua interação com substâncias previamente biotinadas [31], sendo a base de muitos imunoenaios e imuno- e genossensores [32].

1.3. Magnetita

1.3.1. Estrutura cristalina

A magnetita (Fe_3O_4) é um óxido de ferro com estrutura cristalina de uma espinela cúbica inversa (Figura 2).

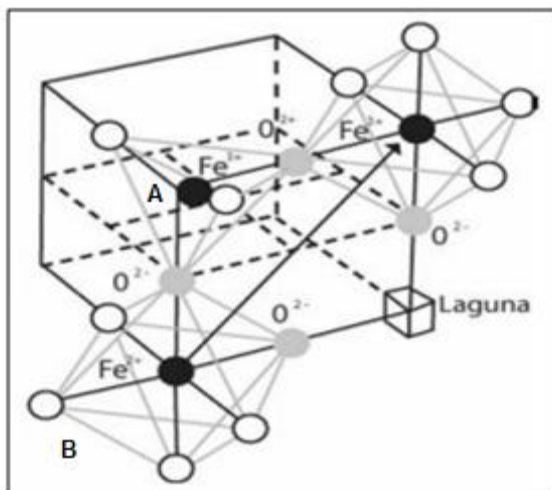


Figura 2: Estrutura cristalina da espinela inversa: Magnetita. Fonte: Aquino, 2010 [33].

Na magnetita, os átomos de oxigênio tem uma estrutura cúbica compacta (face centrada cúbica), formando sítios octaédricos e sítios tetraédricos. Metade dos locais octaédricos (B) são ocupados por Fe^{2+} e a metade por Fe^{3+} . Já os sítios

tetraédricos (A) são ocupados apenas por Fe^{3+} [34]. Os íons ferrosos e férricos das posições octaédricas compartilham elétrons da camada de valência permitindo que a magnetita seja um composto não estequiométrico com alta condutividade [34].

1.3.2. Comportamento magnético

A magnetita é uma cerâmica com baixa coercividade ferrimagnética, que significa ser um material magnético macio. O fator crítico é a distribuição dos momentos de rotação dos íons ferro. Os momentos do spin de todos os íons Fe^{3+} nas posições octaédricas estão alinhados em paralelo uns aos outros; no entanto, são dirigidas no sentido oposto ao dos íons Fe^{3+} das posições tetraédricas, que também se encontram alinhados (Figura 3) [33].

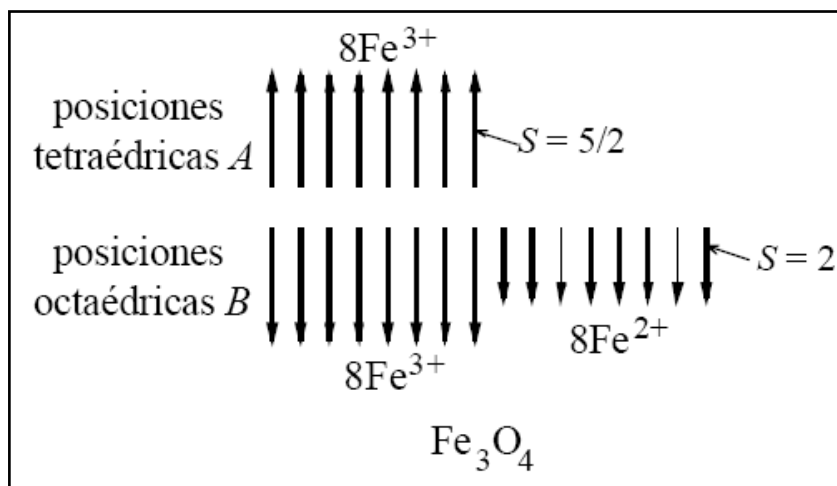


Figura 3: Alinhamento dos momentos magnéticos na magnetita. Fonte: Aquino, 2010 [33].

Isto ocorre como um resultado do acoplamento antiparalelo dos momentos magnéticos dos íons Fe adjacentes. Portanto, os momentos magnéticos de rotação de todos os íons férricos se cancelam mutuamente e não contribuem para a

magnetização do sólido. Contudo, íons Fe^{2+} têm os seus momentos magnéticos que apontam na mesma direção e a resultante total é responsável pela magnetização do material [34].

1.3.3. Nanopartículas de magnetita

O tamanho das partículas é um fator importante no desempenho destes materiais magnéticos, uma vez que uma redução no tamanho afeta os momentos magnéticos resultantes e variam a magnetização, estes induzem ao desordem de arranjos dos spins modificando assim as transições do campo . Assim, percebe-se que as propriedades magnéticas são definidas pelo tamanho, a área da superfície e estrutura cristalina dessas partículas.

Devido a que nos materiais policristalinos, a orientação do cristal é muito diversificada, é possível que o momento magnético de cada cristal seja orientado em diferentes direções, e não exatamente em antiparalelo [35]. Esta diversidade de orientação origina que o aumento da energia magnetostática da partícula crie paredes, separando os cristais em direções paralelas e antiparalelas resultando em diversos momentos magnéticos formando áreas microscópicas conhecidas como domínios (Figura 4) [35].

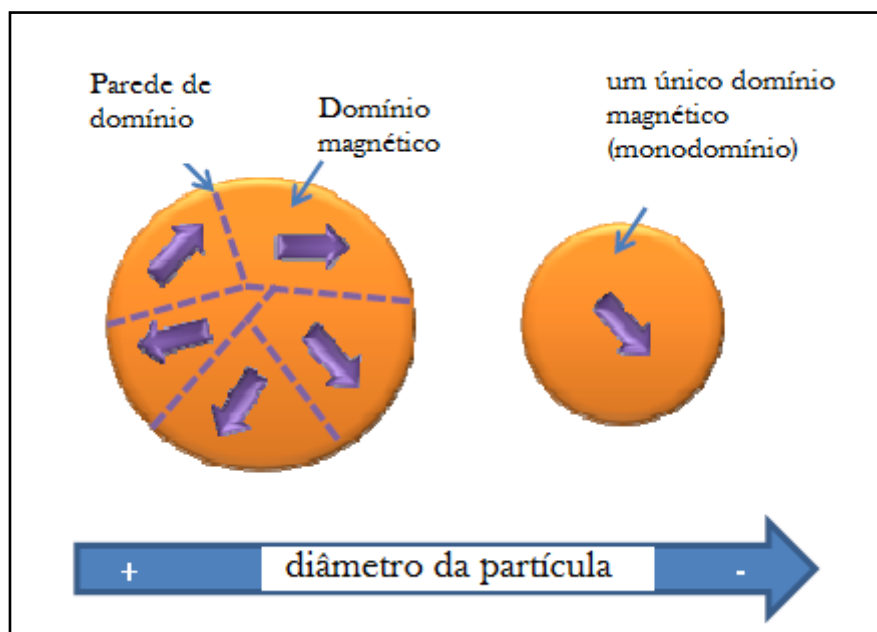


Figura 4: Estrutura dos sólidos ferromagnéticos de acordo com o tamanho de partícula.

Adaptado: Castrillón García, 2012 [35.]

Ao diminuir o tamanho das partículas de magnetita, consequentemente, diminui-se o número de domínios, de modo que, em uma escala nanométrica a partícula pode possuir apenas um domínio, nas quais observa-se perda de magnetismo remanescente e coercitividade, devido à diminuição substancial na magnetização de saturação. Portanto, de acordo com este raciocínio, nanopartículas magnéticas podem ser consideradas como um único cristal de magnetita que possuem domínio único, apresentando com essas propriedades um comportamento superparamagnético [36].

O fenômeno de superparamagnetismo é um efeito que só se produz em materiais com monodomínios, apresentando uma curva de histerese de alta magnetização de saturação e zero de remanência, tal como mostrado na Figura 5.

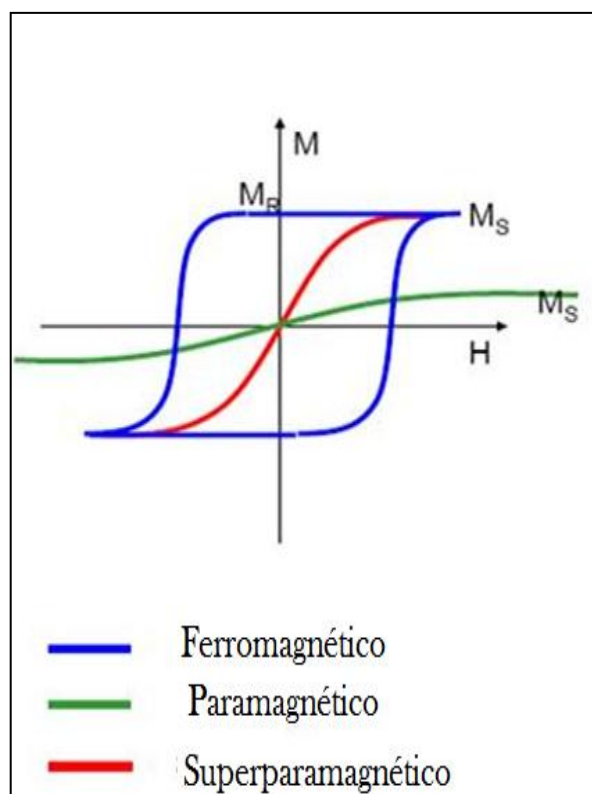


Figura 5: Curva teórica do campo magnético para nanopartículas superparamagnéticas, ferrimagnéticas ou paramagnéticas, onde os parâmetros são indicados como: campo coercivo (H), magnetização de saturação (M_S) e magnetização remanescente (M_R). Adaptado: Castrillón García, 2012 [35].

As curvas de histerese descrevem um ciclo de magnetização, mesmo para materiais sem magnetização, quando é aplicado um campo magnético (H) externo, registrando a variação do magnetismo até alcançar os valores da magnetização de saturação (M_S) que se produz com o alinhamento máximo dos momentos magnéticos com o campo externo. Diminuindo o campo aplicado, a magnetização diminui para o valor de magnetização remanescente (M_R), que apresenta um material em um campo de valor zero. Ao variar a orientação do campo aplicado é removida a magnetização do material. O campo necessário para remover a magnetização de um material depois de ser submetido ao campo magnético externo é chamado de campo coercitivo (H_C) que vai aumentando continuamente até atingir

um valor oposto ao da magnetização de saturação, completando o ciclo que representa a histerese do material [35].

As partículas de magnetita com tamanho entre 5-20 nm apresentam comportamento superparamagnético e são ideais para múltiplas aplicações que vão desde as áreas de eletrônica, mecânica e ótica, até alcançar áreas mais complexas como a biomedicina [37]; onde nanopartículas superparamagnéticas podem ser utilizadas no tratamento de doenças, para o transporte de fármacos por liberação controlada [38]; imobilização e separação magnética de entidades biológicas [39] ou, até no tratamento de tumores por hipertermia [40]. No entanto, poucos estudos têm-se concentrado em explorar a aplicabilidade deste tipo de nanopartículas como suporte para imobilização de polímeros impressos e as suas possíveis aplicações em análises de diversos tipos de amostras com matrizes complexas.

1.4. Polímeros Biomiméticos ou Molecularmente Impressos: MIP (*molecularly imprinting polymers*)

MIP são polímeros sintéticos que apresentam alta seletividade a uma molécula de interesse. Em geral, são facilmente obtidos, podendo ser sintetizados de acordo com sua utilização. Os MIP apresentam características vantajosas de estabilidade, robustez, seletividade, resistência a altas temperaturas e pressões e inércia química a ácidos, bases e solventes orgânicos. Em função destas características, e dada à sua alta seletividade, estes polímeros têm sido bastante empregados no preparo de amostras atuando como adsorventes em técnicas de separação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência [41], eletroforese capilar [42], eletrocromatografia capilar [43], cromatografia em camada delgada [44],

bem como em extração em fase sólida (SPE do inglês “solid phase extraction”) [45] e em microextração em fase sólida [46], sendo adicionalmente muito empregados nas áreas biológica, farmacológica e alimentícia [47-48].

A seletividade dos MIP está diretamente relacionada ao reconhecimento pelo polímero de uma molécula de interesse, a qual foi empregada previamente como molde no processo de sua síntese (Figura 6). O processo de impressão molecular é geralmente realizado com a mistura de um monômero funcional com a molécula de interesse (analito), a qual serve de molde (*template*) para obter/formar as cavidades tridimensionais a serem impressas no polímero. Neste processo, podem ocorrer interações reversíveis entre os grupos funcionais ligantes da molécula molde e os grupos funcionais do monômero principal empregado na síntese. Após esta etapa, um reagente de ligação cruzada e um iniciador radicalar são adicionados para estabilizar as ligações e iniciar a polimerização [41-49].

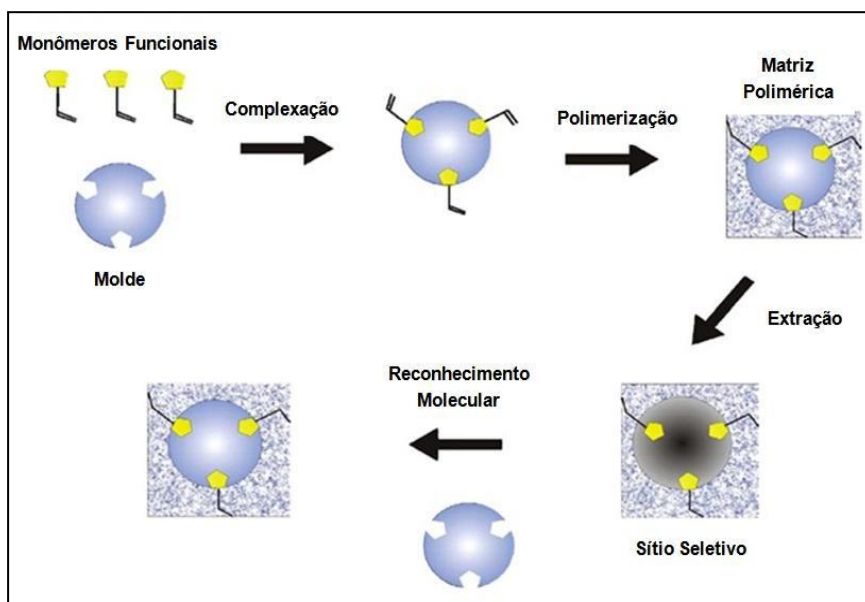


Figura 6: Esquema geral de síntese e atuação do MIP (adaptado de MAHONY, 2005 [50]).

A seletividade dos MIP depende fundamentalmente do processo de síntese e, conseqüentemente, das variáveis envolvidas: monômero funcional, proporções molares entre a molécula molde e monômero funcional, tipo e quantidade de solvente porogênico, quantidades do reagente de ligação cruzada e do iniciador radicalar, tempo e processo de polimerização. Um bom conhecimento do equilíbrio químico entre os compostos envolvidos, da teoria de reconhecimento molecular e de termodinâmica são importantes para que seja obtido um MIP com elevado número de cavidades estrutural e funcionalmente seletivas à molécula alvo.

Desta forma, a otimização dos parâmetros envolvidos na síntese é essencial para a obtenção dos MIP. Adicionalmente, no caso de MIP para moléculas molde para as quais ainda não existe um protocolo de síntese, há a necessidade de se conhecer profundamente todas as variáveis envolvidas e suas interdependências [51]. De fato, para um dado analito, o monômero funcional, o reagente de ligação cruzada, o solvente porogênico e o iniciador radicalar, são de extrema importância na síntese do respectivo MIP.

1.4.1. Síntese de polímeros de impressão molecular

O princípio da impressão molecular é baseado em três etapas principais:

A pré-polimerização, que consiste na interação do monômero funcional mais adequado para a síntese, e o analito em estudo. Nesta etapa ocorre a formação de um complexo estável “monômero funcional – *template*”. O monômero funcional determina o tipo de ligação nos sítios impressos do polímero. Sua escolha depende da natureza do analito, ou seja, o monômero deve corresponder à funcionalidade da molécula molde e as suas interações devem ser fortes o suficiente para realizar a formação dos sítios de ligação, mas também, fracas o suficiente para permitir a

retirada do molde de maneira a não destruir as cavidades de reconhecimento formadas. Como a interação analito-monômero é governada por um processo em equilíbrio, quantidades superiores de monômero em relação à molécula molde (geralmente razões molares 4:1) devem ser empregadas com o intuito de se deslocar o equilíbrio para uma maior formação de complexos analito-monômero [42-52-53]. Misturas de monômeros funcionais também podem ser usadas para prover cavidades mais específicas no polímero; entretanto, podem ocorrer co-polimerização e complexação do molde durante a síntese [53]. Desta forma, a escolha do monômero funcional, ou, de uma mistura de monômeros deve ser cuidadosa. A interação entre o analito e monômero funcional pode ser por meio de ligações covalentes ou não covalentes (Figura 7). Na ligação não covalente a interação pode ser por ligações de ponte de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica, transferência de carga ou por interação hidrofóbica [54].

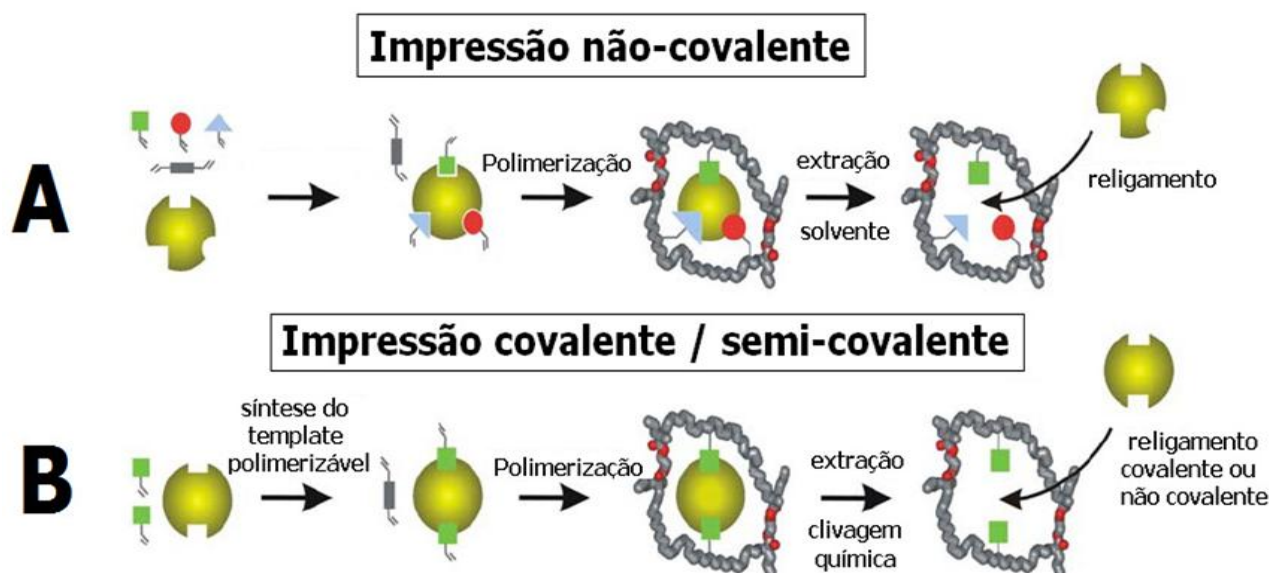
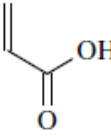
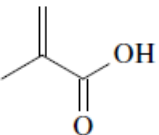
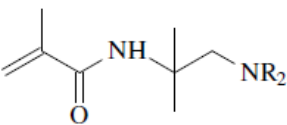
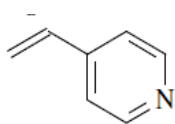
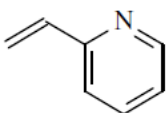
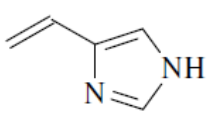
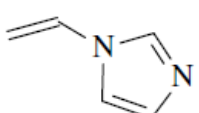
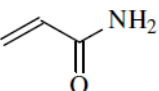


Figura 7: Princípios da Impressão Molecular. (A) impressão não covalente. (B) impressão covalente/semi-covalente. Fonte: Hayes e Davidson, 2002 [54].

A Tabela 1 apresenta alguns monômeros funcionais usados na síntese de MIP descritos na literatura para diversos analitos [52].

Tabela1. Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de polímeros impressos molecularmente. Fonte: Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005 [52].

Monômero funcional	Estrutura química	Interação com o analito
Ácido acrílico		Iônica e ponte de hidrogênio
Ácido meta-acrílico		Iônica e ponte de hidrogênio
Amino-metacrilamida		Iônica
4-Vinilpiridina		Iônica, ponte de hidrogênio e transferência de carga
2-Vinilpiridina		Iônica, ponte de hidrogênio e transferência de carga
4-Vinilimidazol		Iônica, ponte de hidrogênio e coordenação de metais
1-Vinilimidazol		Iônica, ponte de hidrogênio e coordenação de metais
Acrilamida		Ponte de hidrogênio

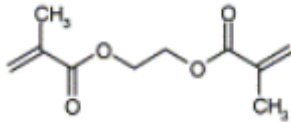
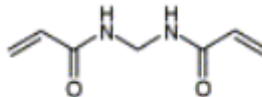
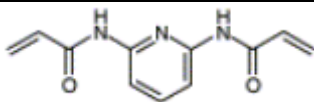
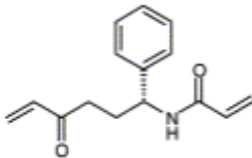
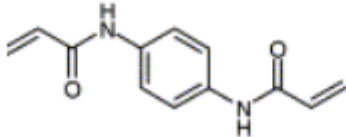
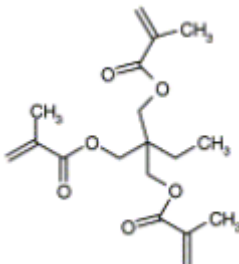
Na segunda etapa, inicia-se a polimerização na presença de um agente de ligação cruzada ou monômero estrutural, o qual é o reagente que realiza a união dos

monômeros funcionais para a formação do polímero, fornecendo a rigidez ao MIP. Um dos reagentes mais utilizados é o etileno-glicol-dimetacrilato (EGDMA), que desempenha diversas funções, tais como: controlar a morfologia da matriz polimérica (macro porosa, gel, micro-gel), estabilizar as ligações impressas (ligações molde-monômero funcional) e conferir estabilidade mecânica ao polímero. Este reagente é geralmente colocado em excesso (cerca de 80%), e seu caráter funcional deve corresponder ao do monômero funcional, principalmente quando são empregadas misturas de monômeros [53].

Consta da Tabela 2 os reagentes de ligação cruzada mais utilizados na síntese de MIP [52].

Para que se inicie a reação de polimerização do reagente de ligação cruzada em torno do complexo “*template*-monômero funcional” é necessário acrescentar um iniciador radicalar (Tabela 3) ao meio. O iniciador radicalar é, por sua vez, o reagente que fornece radicais livres na polimerização. Através da sua decomposição térmica ou fotolítica, os primeiros radicais são formados. A polimerização então se inicia quando estes interagem com as moléculas do reagente de ligação cruzada e seu término ocorre após o fechamento de toda a cadeia polimérica. O controle da polimerização é basicamente ditado pela velocidade de formação destes radicais, pelo ajuste de temperatura ou radiação UV, e pela composição química dos compostos envolvidos [55].

Tabela 2. Estruturas químicas de reagentes de ligação cruzada comumente usados em sínteses de MIP [52].

Agentes de ligação cruzada	Estrutura química
Etileno glicol dimetacrilato	
<i>N,N'</i> -metileno diacrilamida	
2,6-(<i>bis</i> -acrilamido)-piridina	
<i>N,O</i> - <i>bis</i> -acrilatoíla-L-fenilalaninol	
<i>N,N'</i> -fenilendiácrlamida	
<i>p</i> -divinilbenzeno	
Trimetilpropano-trimetacrilato (TRIM)	

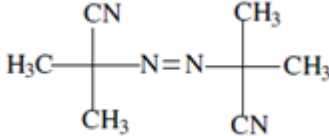
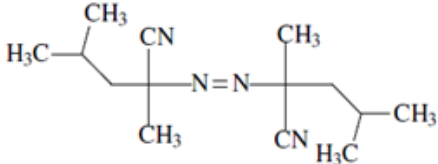
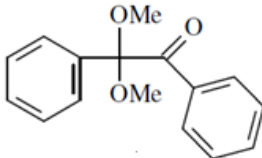
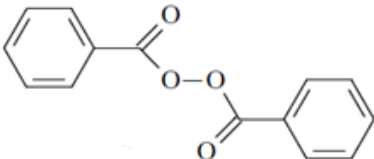
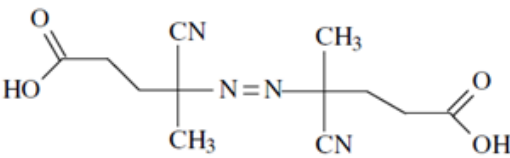
A estabilidade da temperatura é muito importante para obter um polímero bem estruturado. Variações bruscas na temperatura podem acarretar a formação descontrolada de radicais, bem como interferir na quantidade de nanocavidades impressas comprometendo o desempenho dos MIP. O iniciador radicalar mais empregado tem sido o 2,2'-azo-*bis*-iso-butironitrila (AIBN), porém outros podem ser

utilizados como o azo-*bis*-iso-dimetilvaleronitrila (ABDV) e o ácido 4,4'-azo-*bis*(4-cianopentaenóico) sendo sua escolha dependente da temperatura de síntese a ser empregada e do analito.

Na terceira etapa o polímero resultante é moído (se necessário), peneirado e submetido a uma lavagem com solvente para extração do analito, obtendo-se assim o polímero de impressão molecular. Durante o processo de quebra e trituração do polímero, alguns sítios seletivos formados são parcialmente destruídos, o que diminui a capacidade seletiva de retenção do polímero impresso [53].

O solvente de reação é um parâmetro importante na síntese de MIP que tem como finalidade solubilizar os reagentes da síntese, além de contribuir na formação adequada de poros e por essa razão, eles são conhecidos como solventes porogênicos. Adicionalmente, é conhecido que o aumento do volume do solvente porogênico na síntese do MIP aumenta a área superficial do polímero [53].

Tabela 3. Estruturas moleculares dos iniciadores radiculares empregados na síntese de MIP [52].

Iniciadores radiculares	Estrutura química
2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN)	
Azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV)	
Dimetilacetal de benzila	
Peróxido de benzoíla (BPO)	
Ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico)	

1.4.2. Métodos de polimerização

O método de polimerização usado influi na morfologia do polímero obtido, onde se pode obter partículas esféricas mono ou polidispersas [56], partículas com tamanho de poro controlado [57], agregados aleatórios de partículas [58], blocos [59], entre outros. É importante mencionar que o método de polimerização também pode afetar o reconhecimento dos analitos por parte do polímero obtido. Assim, por exemplo Pérez-Moral e Mayes [60] demonstraram que o método de polimerização

usado na síntese de polímeros de impressão molecular, influenciaram no reconhecimento do propranolol, usado como analito. Os procedimentos usados por estes autores para a preparação dos MIP foram a polimerização em *bulk*, em suspensão, por precipitação, e por emulsão em tolueno/água. Alcançando, neste caso, o melhor reconhecimento quando foi usado o polímero obtido por precipitação.

Com base nisto, a continuação são descritos os métodos de polimerização mais utilizados na preparação de polímeros de impressão molecular no campo da química analítica.

1.4.2.1. Polimerização em *bulk*

A síntese em *bulk* foi o primeiro método usado na preparação dos MIP [61]. O método consiste na polimerização em meio homogêneo, de uma mistura contendo, o analito (*template*), monômero funcional, agente de ligação cruzada, iniciador radicalar e solvente porogênico, a qual se somete a uma polimerização, que pode ser iniciada tanto termicamente, como por radiação ultravioleta. Uma vez concluída a polimerização, se obtém um bloco de polímero que se tritura e peneira para obter partículas micrométricas amorfas e com tamanho relativamente controlado. Uma vez, obtido o polímero triturado, o analito é extraído das cavidades geradas pela impressão molecular do analito, liberando os sítios de ligação seletiva no MIP.

O principal inconveniente desta metodologia reside na necessidade de triturar e peneirar o polímero até obter o tamanho de partícula desejada, devido a que no processo podem ser destruídas as cavidades seletivas, assim como material é perdido durante este procedimento.

1.4.2.2. Polimerização por precipitação

Esta metodologia é análoga à polimerização em *bulk*, realiza-se também em meio homogêneo misturando os reagentes, porém usando um volume muito maior de solvente. Como consequência, as cadeias poliméricas em formação não são capazes de ocupar o volume total do solvente, produzindo uma dispersão de partículas esféricas de MIP dispersas na solução [61-64].

Entre as principais vantagens deste processo de polimerização, além da obtenção das partículas esféricas, está o alto rendimento de polimerização, uma vez não é necessário submeter o polímero obtido às etapas de triturado e tamizado. Adicionalmente, tem sido comprovado experimentalmente que partículas obtidas através deste método tem grande capacidade de religação da molécula e uma distribuição mais homogênea dos sítios de ligação seletiva (cavidades).

1.4.2.3. Polimerização por suspensão

Na polimerização por suspensão, se combinam um meio orgânico hidrofóbico no qual se encontra a mistura de polimerização, e um meio dispersante que pode ser orgânico ou aquoso e imiscível com o anterior. O uso de uma fase aquosa é muito menos frequente, já que pode seriamente dificultar a interação entre o analito e o monômero funcional. Assim, os dispersantes mais usados são líquidos perfluorados, devido ao seu elevado caráter hidrofóbico. A mistura de ambos meios é agitada, sendo geradas microgotas em suspensão nas quais ocorrem a polimerização [64].

A principal vantagem deste procedimento é que permite controlar o tamanho das partículas obtidas, já seja mediante a adição de um estabilizante (polivinil-álcool ou líquidos iônicos), ou pelo controle da velocidade de agitação [65-67].

1.4.2.4. Polimerização por inchamento (*swelling*) de duas etapas

O método de polimerização por inchamento em duas etapas foi inicialmente descrito em 1994 por Hosoya [68]. Este método se baseia na síntese de partículas esféricas de látex (suspensão coloidal) em meio aquoso, e posterior inchamento das mesmas pela formação de uma microemulsão mediante a adição de dibutilftalato como agente plastificante. A seguir, as partículas de látex são colocadas na mistura de pré-polimerização e, desta forma, se sintetiza uma camada de polímero em sua superfície. Este método produz partículas monodispersas de tamanhos na faixa entre 2 e 50 μm . Os principais inconvenientes são, a complexidade das sínteses e a interação por pontes hidrogênio desfavorecidas entre analito e monômero funcional [61].

1.4.2.5. Polimerização por *core-shell*

A polimerização por *core-shell* (núcleo – revestimento) é um realizado processo em duas etapas que começa com a preparação de um núcleo (*core*) que pode ser preparado a partir de uma grande variedade de materiais, por exemplo, estireno, divinilbenzeno (DVB), acrilato de alquila, vidro entre outros. As partículas de polímero são monodispersas e podem variar em tamanhos que vão desde 30 nm até 1 μm de diâmetro. A seguir, o núcleo é utilizado na segunda fase, quando é

misturado com outro monômero ou mistura de monômeros antes da polimerização (processo descontínuo) ou, no caso de um processo semicontínuo, o monômero é adicionado dentro de um recipiente reacional que contém sob condições controladas as partículas de núcleo previamente obtidas. O tamanho, a morfologia e as propriedades físico-químicas das partículas de polímero de núcleo-revestimento pode ser controlada pela composição e estrutura dos monômeros e as condições de reação usadas [61].

1.4.2.5.1. POLIMERIZAÇÃO POR CORE-SHELL USANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

A introdução de propriedades magnéticas nos polímeros de impressão molecular em qualquer um de seus formatos como nanopartículas, micropartículas, em *bulk*, etc., converte aos MIP em materiais híbridos. Isto é possível adicionando à polimerização do MIP, partículas magnéticas, de forma tal, que estas fiquem no núcleo do material, após a síntese do polímero impresso em sua superfície. Uma das vantagens é recuperar o material da solução sem uso técnicas de separação, as quais requerem um maior custo energético, tal como a centrifugação [69], aproveitando apenas o caráter magnético do material obtido.

Na Figura 8, mostra-se um esquema dos possíveis métodos de síntese de MIP, descritos nas sessões anteriores.

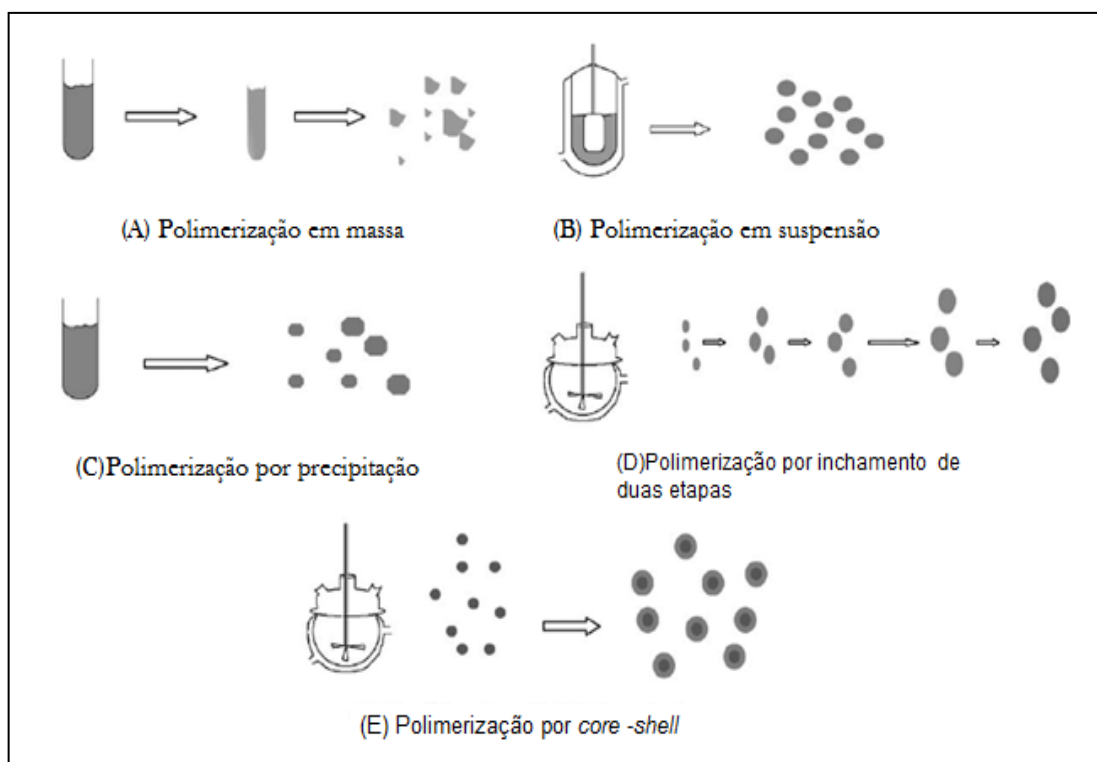


Figura 8: Representação esquemática dos passos sintéticos em diferentes procedimentos de polimerização. Adaptado: N. Pérez-Moral [60].

1.5. Emprego dos MIP como materiais adsorventes

A extração em fase sólida (SPE) é um método amplamente empregado na extração e concentração de analitos, quando os mesmos estão presentes em baixos níveis de concentração; na remoção de compostos interferentes em matrizes complexas; e na mudança do meio de solubilização de um analito antes de sua análise cromatográfica [70].

Os materiais adsorventes utilizados na SPE podem apresentar baixa seletividade em uma matriz complexa, pois neste caso, substâncias interferentes de polaridade similar ao analito podem ser retidas e pré-concentradas [70]. O emprego

de MIP como material adsorvente na técnica de extração em fase sólida recebe a designação de extração em fase sólida com impressão molecular (*Molecular Imprinting Solid-Phase Extraction*, MISPE) [71] e é uma alternativa real ao uso de adsorventes baseados em sílicas funcionalizadas.

No geral, um procedimento de extração em fase sólida consiste na percolação da amostra no material adsorvente disposto em cartuchos, onde a espécie de interesse fica retida seletivamente quando do uso do MIP (Figura 9) [69].

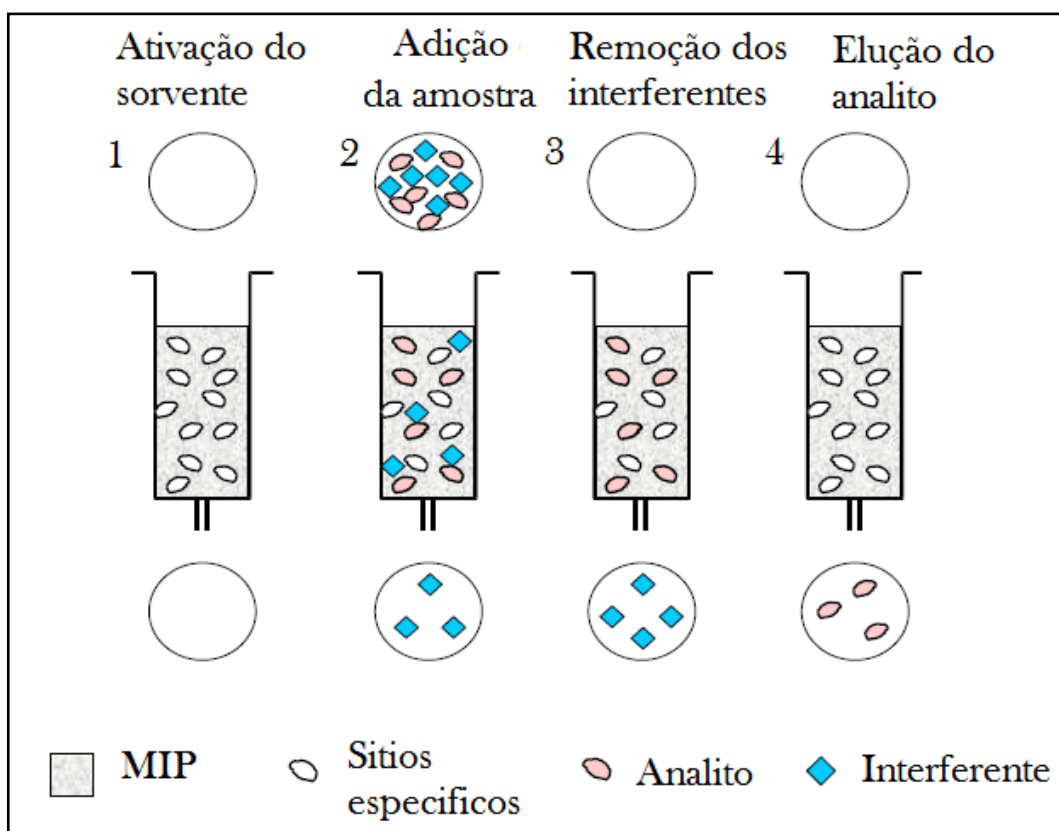


Figura 9: Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida (SPE) Fonte: Vicente, 2009 [69].

Em seguida, ao se analisar amostras complexas, faz-se necessário efetuar uma etapa de limpeza (*clean up*) com um solvente adequado, no intuito de extrair as espécies interferentes ligadas ao polímero por interações não específicas. Nesta

etapa, a espécie de interesse não pode, nem deve ser, co-eluída. A etapa final é efetuada mediante a eluição do analito na ausência dos interferentes [72-73]. Nestes procedimentos, etapas de *clean up* e de pré-concentração são, quando possível, executadas simultaneamente, o que confere também aos MIP características de materiais pré-concentradores.

Para avaliar o desempenho dos MIP em técnicas de separação devem-se considerar duas características importantes: A capacidade seletiva do MIP na presença de interferentes; e o efeito de impressão do MIP para uma molécula molde (*template*) em relação a um polímero não impresso, conhecido como NIP ("Non-imprinted polymer") [73].

A capacidade de adsorção do MIP (Q , mmol g⁻¹) é calculada com base na diferença de concentração analito (biotina) antes e depois da adsorção em um volume constante de solvente (metanol, neste caso) e uma massa constante de polímero (MIP ou NIP), de acordo com a seguinte equação (1):

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)V}{M} \quad (1)$$

Onde C_0 é a concentração inicial do analito (mmol L⁻¹); C_e é a concentração após a adsorção; V é o volume da solução (mL); e M é a massa de MIP ou NIP (g). A quantidade de adsorção aumenta com o aumento da concentração do analito, o que representa a saturação dos sítios ativos de ligação do polímero.

O teste de seletividade é crucial para avaliação da funcionalidade de um MIP, uma vez que, este teste avalia a formação dos sítios seletivos, pois, ao expô-lo em contato com um analito com estrutura similar, o MIP deve se ligar preferencialmente

ao analito de interesse (biotina) enquanto que o NIP deve-se ligar igualmente aos dois, visto que não possui a nanocavidade seletiva [74].

A seletividade de um MIP surge da diferença entre a energia livre de adsorção de um substrato versus outro. A energia livre de ligação de uma molécula (molde, analito ou interferente) pelo MIP é determinada pela equação de Gibbs (equação 2) [75]:

$$\Delta G = -R T \ln K_p \quad (2)$$

Onde, K_p é o coeficiente de partição da molécula no MIP dividido pela molécula na solução, ou seja (equação 3):

$$K_p = \frac{Q}{C_e} \quad (3)$$

A seletividade de uma molécula versus outra é quantificada pela razão entre os dois coeficientes de partição K_{p1} e K_{p2} (para o substrato 1 e 2, respectivamente), esta razão é denominada fator de separação (equação 4) [74].

$$\alpha = \frac{K_{p1}}{K_{p2}} \quad (4)$$

Para comparar o efeito de impressão de compostos diferentes (MIP e NIP), os efeitos de partição encontrados para cada composto devem ser normalizados. Isto é realizado por meio do fator de impressão I (equação 5). O valor de I é obtido da razão entre o coeficiente de partição de uma molécula em um polímero impresso, K_p^{MIP} , e o coeficiente de partição em um polímero não impresso, K_p^{NIP} , utilizando-se

para isso a mesma molécula e o mesmo monômero funcional no polímero impresso e não impresso. Neste caso, se $K_p^{MIP} \gg K_p^{NIP}$, melhor será o desempenho seletivo do MIP.

$$I = \frac{K_p^{MIP}}{K_p^{NIP}} \quad (5)$$

O fator de impressão obtido para o analito sempre deve ser superior a 1 e, obviamente, maior que aqueles obtidos para os interferentes. Para se determinar a seletividade de um polímero, toma-se a razão do fator de impressão para os dois diferentes substratos, I_1 para o substrato 1 e I_2 para o substrato 2, desta maneira obtém-se o fator de seletividade (S), conforme a equação 6 [74].

$$S = \left(\frac{I_1}{I_2} \right) \quad (6)$$

1.6. Métodos experimentais para caracterização das propriedades de afinidade de um MIP

Uma das estratégias para avaliar as propriedades de afinidade de um MIP, se baseia em dados experimentais obtidos no equilíbrio da interação entre o analito e o polímero, os quais posteriormente serão usados para gerar as correspondentes isotermas de adsorção. Geralmente, este procedimento se realiza através da incubação em série de quantidades conhecidas de analito em volume fixo de solução e de massa de MIP, tipicamente usa-se entre 2 a 3 mg de polímero por cada

mL de solução; durante um período de tempo necessário para alcançar o equilíbrio termodinâmico da adsorção [76], o qual deve ser previamente estudado.

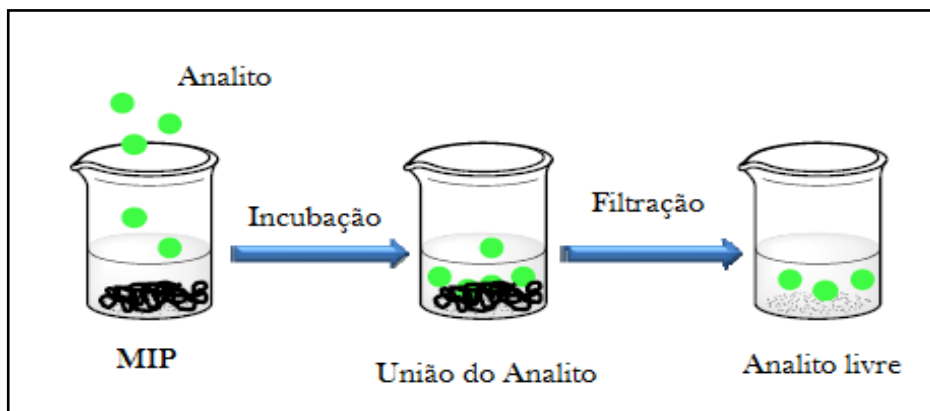


Figura 10: Esquema do procedimento operacional para os experimentos de adsorção para Mips convencionais [76].

O tempo de incubação para a maioria dos ensaios é o tempo necessário para que se produza um 90% de religação do analito. A seguir, após ter sido alcançado o equilíbrio, separa-se o polímero da solução por filtração ou centrifugação, extraíndo-se cuidadosamente o sobrenadante, no qual é quantificada a concentração livre remanescente de analito [76], obtendo por diferença a quantidade de analito adsorvido no polímero.

1.6.1. Modelos adsorção

Existem diferentes modelos de isotermas de adsorção para caracterizar as propriedades da interação de um MIP com seu analito. De fato, a capacidade e habilidade de ligação de diferentes MIP e/ou NIP, podem ser comparadas pela simples sobreposição de suas respectivas isotermas de adsorção, obtidas sob as mesmas condições experimentais. Assim mesmo, se for necessária uma análise

mais detalhada das propriedades da ligação, esta pode ser realizada pela comparação dos parâmetros físico-químicos, como a constante de associação, obtidos pela isoterma, cujo modelo matemático melhor se ajuste com os dados experimentalmente obtidos.

De todos os modelos de isothermas existentes, os mais aplicados aos MIP, por serem aqueles que se ajustam de uma forma mais satisfatória aos dados experimentais, são os modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir–Freundlich [77].

1.6.1.1. Modelo de Langmuir

A teoria de Langmuir é baseada em que a adsorção tem lugar em sítios homogêneos do polímero. Esta teoria assume que, quando uma molécula de analito ocupa um sítio, nenhuma outra adsorção pode ocorrer nesse mesmo sítio. Portanto, alcançará o valor de saturação quando não possa haver mais possibilidade de adsorção de moléculas, por terem sido ocupados todos os sítios ativos de ligação [77].

No modelo de Langmuir a adsorção é um processo reversível, com a espécie adsorvida formando uma simples camada de moléculas, que não se movimentam na superfície do adsorvente, podendo somente ser dessorvidas. Neste modelo o processo é dinâmico e a adsorção ocorre até que a taxa de adsorção se iguale a taxa de dessorção obedecendo a seguinte equação (7): [77]

$$Q = \frac{Q_{m\acute{a}x}K_A C_e}{1 + K_A C_e} \quad (7)$$

Onde K_A é a razão entre a constante de adsorção e a constante de dessorção, sendo uma função da entalpia e da temperatura, C_e é a concentração de analito remanescente na solução após os experimentos de religação. Para determinação das constantes $Q_{m\acute{a}x}$ e K_A , a equação de Langmuir (equação 7) pode ser linearizada, ficando a expressão matemática mostrada na equação (8) a seguir:

$$\frac{C_e}{Q} = \frac{1}{K_A Q_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{Q_{m\acute{a}x}} C_e \quad (8)$$

A qual é comumente usada para encontrar os parâmetros físico-químicos da interação entre o MIP e seu analito.

1.6.1.2. Modelo de Freundlich

É a isoterma que mais comumente se ajusta aos experimentos de religação usando MIP. Foi apresentada em 1926 por Freundlich [77] como uma isoterma de adsorção empírica para a adsorção não ideal de moléculas sobre superfícies heterogêneas, assim como para quando são geradas multicamadas na superfície do adsorvente. De acordo com este modelo, o calor de adsorção em cada sitio de ligação é diferente, devido a heterogeneidade superficial [78].

O modelo de Freundlich é estritamente empírico, e é descrito conforme segue na equação 9:

$$Q = K_F C^{1/n} \quad (9)$$

Onde K_F e n são constantes. K_F é uma constante dependente da temperatura e da entalpia do sistema. Similarmente, daquilo realizado para o modelo de Langmuir, os termos podem ser rearranjados de maneira a linearizar a equação (9) ficando como mostrado na equação (10) a seguir:

$$\text{Log } Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (10)$$

1.6.1.3. Modelo de Lagmuir-Freundlich

A isoterma Lagmuir-Freundlich (L-FI) tem sido bem sucedida na modelagem do comportamento de adsorção de muitos sistemas heterogêneos. O modelo foi introduzido para os polímeros impressos pelo grupo de Umpleby [77]. Como o nome indica, a isoterma L-FI é uma composição dos modelos de Langmuir e de Freundlich, e tem-se mostrado mais adequado para modelar o comportamento dos polímeros de impressão molecular, que os modelos de Langmuir ou de Freundlich por separado.

Ao contrário das isotermas de Langmuir ou de Freundlich, a isoterma de Lagmuir-Freundlich é capaz de modelar as características de ligação destes polímeros em baixas e altas concentrações, para sistemas heterogêneo e homogêneos [77]. L-FI descreve uma relação específica entre a concentração de equilíbrio limite (B) e livre (F) em sistemas heterogêneos (Equação 11), usando três coeficientes N_T , a e m .

$$B = \frac{N_T a F^m}{1 + a F^m} \quad (11)$$

Onde, N_t é o número total de sítios de ligação, a está relacionada com a afinidade de ligação média K_0 . Através de $K_0 = a^m$, pode ser obtido o valor de m , que é o índice de heterogeneidade, sendo que o valor de m varia de zero a um. Valores mais próximos de zero indicam sítios mais heterogêneos.

1.7. Objetivo

1.7.1. Geral

O objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas magnéticas decoradas com polímeros molecularmente impressos para detecção de biotina em leite.

1.7.2. Objetivos específicos:

- 1.7.2.1. Síntese, otimização da síntese e caracterização de nanopartículas com alto poder magnético.
- 1.7.2.2. Modificação das nanopartículas magnéticas com MIP para biotina, através de polimerização em sílica por *core-shell* ou por miniemulsão com monômeros funcionais.
- 1.7.2.3. Avaliação da eficiência do magneto-MIP, através de estudos de seletividade frente a outras moléculas com estrutura análoga à biotina e frente ao polímero controle NIP (*Non-imprinted polymer*).
- 1.7.2.4. Avaliação do potencial de aplicação das magneto-MIP na extração de biotina em amostras de leite (cru, desnatada e em pó) a qual se adicionou com biotina.

CAPÍTULO 2

2- PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Aparelhagem e instrumentação básica

As medidas de volume foram efetuadas com micropipetas Eppendorf® (10 – 100 µL) e (100 – 1000 µL). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em balança analítica (Mettler-Toledo®) que possui calibração externa e tara automática, possibilitando pesagens rápidas e precisas.

O pH das soluções tampão foi medido com pH-metro da Thermo Scientific® (Orion 3 Star pH, Benchtop – USA) empregando um eletrodo de vidro combinado.

As vidrarias empregadas neste trabalho foram previamente lavadas com uma solução de HCl 10% (v/v) por 24 h e posteriormente enxaguadas com água deionizada ($> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida de um sistema de purificação Milli-Q ((Direct-0,3)).

2.2. Reagentes e soluções

Os reagentes usados para este trabalho foram de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada obtida do sistema descrito em 2.1.

No desenvolvimento do trabalho foram utilizados os seguintes reagentes biotina e biocitina da Sigma-Aldrich®, biotina pentilaminada e (R)-NHS-SS-biotina adquiridos da Thermo Scientific EZ-Link®; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, NaOH, NH_4OH , ácido oleico, dodecil sulfato de sódio, metacrilato de metila, persulfato de potássio, bisfenol A, acetonitrila, diisocianato de 4-difenilmetano, floroglucinol, tetra-etil-

orto-silicato (TEOS), metacriloxi propil trimetoxissilano (MPS), ácido acrílico (AC), ácido metacrílico (AMA), 1-vinilimidazole (1VI), agente de ligação cruzada etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), e como iniciador radical 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrila (AIBN, 98% sigma), todos da Sigma-Aldrich®. Os solventes usados foram dimetilformamida, acetonitrila, tolueno, metanol e ácido acético da VETEC®. Para a extração da biotina em leite foi utilizado ácido sulfúrico da Synth®; e para a preparação da fase móvel usada pelo HPLC foi utilizado fosfato de potássio (KH₂PO₄), da Mallincrodt® e ácido fosfórico da Synth®.

2.3. Simulação Computacional empregada na escolha do monômero funcional para síntese do MIP para biotina

Para a obtenção de MIP altamente seletivos, é reconhecido que a interação entre o monômero funcional e o *template* é um dos fatores cruciais na síntese satisfatória destes materiais. Desta forma, as simulações computacionais realizadas focaram-se na obtenção da informação que indicasse a maior afinidade entre a biotina e diversos monômeros comercialmente disponíveis e que são comumente empregados nas sínteses de MIP para diferentes analitos. Para isto, foram empregados os seguintes programas [51,79].

1) HyperChem® 8.0.5: Utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIP.

2) OpenEye® (pacote de *softwares*) contendo os programas: A) *VIDA 3.0.0*: Utilizados para visualizar as moléculas modeladas para conferir possíveis erros de ligações entre átomos. B) *Omega2*: Gera diversos confôrmeros das

moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros da biotina, sendo escolhidos 3 ao acaso para realizar os testes simulatórios. C) *Szybki 1.2.2*: Programa que leva a molécula até seu estado de menor energia e, portando, mais estável.

3) Autolt 3.3.6.0: Aplicativo que utiliza linhas de comandos (*scripts*) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos.

4) Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital PACkage) 2009: Utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde calculando a energia liberada, resultando assim a afinidade entre os mesmos. MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semi-empírica para os cálculos de aproximação.

$$E = E_{AB} - (E_A + E_B) \quad (11)$$

Onde; E_{AB} representa a energia total do sistema contendo uma molécula de biotina com a energia E_A e uma molécula do monômero com a energia E_B [79].

Assim, foram avaliados os 20 monômeros mostrados na Tabela 4 os quais foram nomeados de MP1 a MP20 para fins de simplicidade de análise dos resultados.

Tabela 4. Monômeros comumente usados nas sínteses de MIP e escolhidos para realizar as simulações computacionais.

Sigla	Monômero
MP1	<i>bis</i> -acrilamida de <i>N,N</i> -metileno
MP2	Ácido imidazol-4-acrílico
MP3	Etil-éster de imidazol-4-acrílico
MP4	Ácido acrílico
MP5	Acrilamida (AA)
MP6	Acroleína
MP7	Alilamina
MP8	Acrilonitrila
MP9	Etileno glicol dimetacrilato
MP10	2-(cianoetilamino)etilmetacrilato
MP11	Ácido metilenosuccínico
MP12	Ácido metacrílico (AMA)
MP13	3-divinilbenzeno
MP14	4-divinilbenzeno
MP16	1-vinilimidazol
MP17	2-vinilpiridina (2-VP)
MP18	4-vinilpiridina
MP19	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico
MP20	2-hidroxietil metacrilato

2.4. Síntese dos magneto–MIP pelo método de mini-emulsão

2.4.1. Síntese da magnetita por co–precipitação

Para a obtenção das nanopartículas magnéticas foi utilizada a síntese por co-precipitação. Para tal, 0,01 mol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,02 mol de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada, com agitação mecânica e em atmosfera de nitrogênio a 80 °C [80]. O pH da mistura reacional foi mantido entre 9 e 12 com o auxílio de uma solução de NaOH (2,5% m/v). Após a reação ter sido finalizada o precipitado foi separado do sobrenadante por um ímã de neodímio (5 x 5 x 50 mm) e finalmente lavado com água. A magnetita obtida foi misturada com ácido oleico na proporção de 1/3 (m/m), respectivamente, e lavada com água e etanol. A seguir a magnetita- ácido oleico foi armazenada em dessecador durante 3 dias para completa remoção da umidade.

2.4.2. Procedimento de encapsulamento da magnetita

Previamente à modificação das partículas magnéticas com o MIP para biotina, as mesmas deveram ser encapsuladas em matriz polimérica de forma tal, a oferecer uma superfície adequada à formação do MIP em sua superfície. Para tal, o método proposto por Valero-Navarro e colaboradores [81] foi seguido. Assim, 2,0 g de nanopartículas de magnetita – ácido oleico foram misturadas com 4 mL de solução de n-hexano/clorofórmio (1:1, v/v), e em seguida, foram adicionadas a 450 mL de água deionizada contendo 337,5 mg de dodecil sulfato de sódio (SDS). Esta mistura foi mantida em gelo durante 10 minutos e em seguida, sonicada durante 20 minutos. A emulsão resultante foi transferida lentamente e com agitação mecânica

para um frasco de gargalo duplo contendo 1,5 mL de uma mistura 40:60 (m/m) de AA (ácido acrílico) e de EDMA (etilenoglicol dimetacrilato). O material resultante foi agitado durante uma hora, e a seguir misturado com 180 mg de persulfato de potássio (KPS). Para iniciar a polimerização, a mistura foi aquecida a 65 °C em uma atmosfera suave de nitrogênio durante 24 horas, o produto resultante foi lavado 6 vezes com água deionizada, 5 vezes com acetona e 5 vezes com clorofórmio. Obtendo-se o MIP revestido com o copolímero AA/EDMA.

2.4.3. Síntese de MIP

Para a síntese dos MIP, foram utilizados como reagentes: Biotina ou seus derivados (0,20 mmol), bisfenol A (0,70 mmol), acetonitrila, diisocianato de difenilmetano-4 (MDI) (0,82 mmol) e floroglucinol (0,33 mmol). A mistura foi dissolvida em tetraidrofurano (8 mL) e, finalmente misturados com as nanopartículas de magnetita encapsuladas em MMA/EDMA (16 mg) em béquer de 50 mL.

A formação do MIP foi realizada sob agitação mecânica e isento de luz (o vidro foi protegido com papel de alumínio) durante 2 dias. Após a polimerização a mistura resultante foi lavada com acetona durante 2 dias. O NIP (polímero de controle) foi preparado da mesma maneira, porém sem a adição do analito. A remoção do analito bem como dos reagentes remanescentes da síntese foram feitas através de extrator soxhlet com solução de metanol/ácido acético 9:1 (v/v) em intervalos de 48 horas. Por fim, os polímeros foram secos a 60 °C e estocados à temperatura ambiente [81].

O processo completo e esquemático da síntese dos MIP-magnéticos para biotina pode ser visualizado na Figura 11.

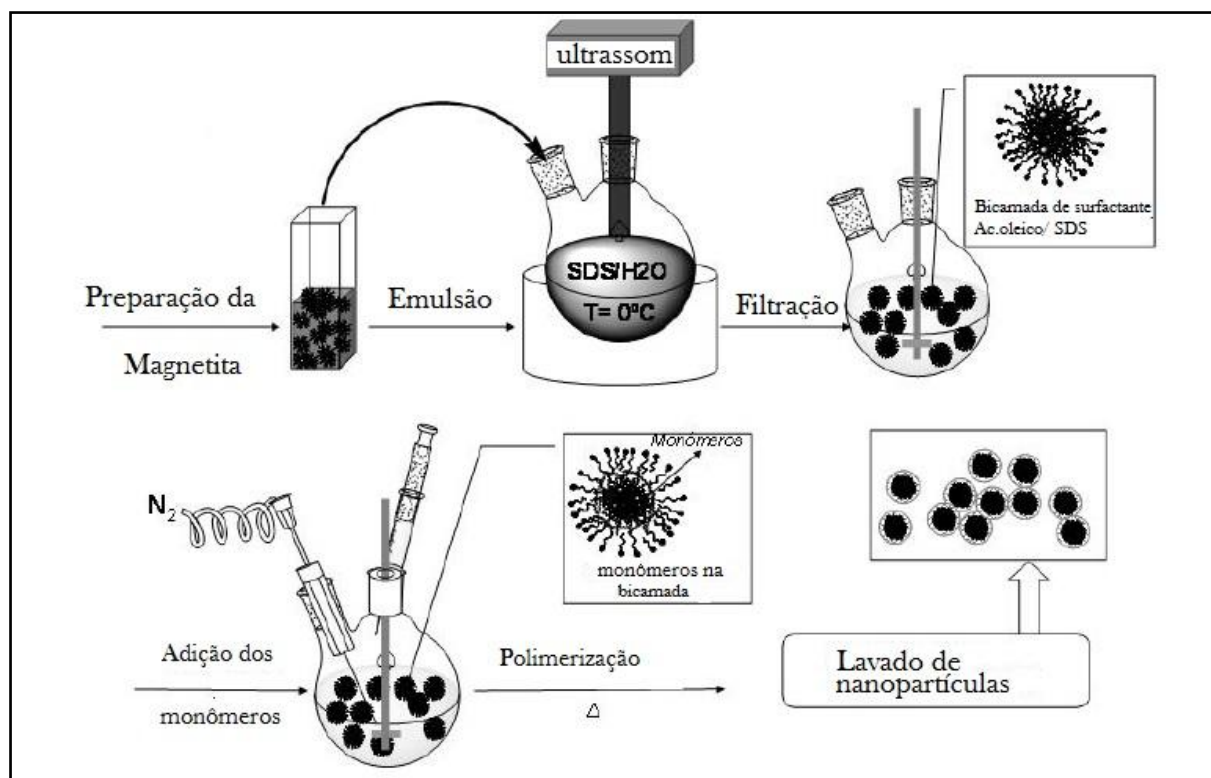


Figura 11: Representação esquemática da polimerização em miniemulsão.

Adaptado: (Valero Navarro, 2011)

2.5. Síntese dos magneto-MIP pelo método *core-shell*

Após preparar a magnetita já explicada anteriormente, porém sem a adição de ácido oleico [80], estas foram tratadas através do processo sol-gel com tetra-etil-orto-silicato (TEOS) de forma a introduzir grupos silanos na superfície da magnetita e permitir sua posterior silanização. Para tal, 300 mg de magnetita foram dispersos em 40 mL de etanol e 4 mL de água ultrapura. A mistura foi sonicada durante 15 minutos, seguido pela adição de 5 mL de NH₄OH a 28% (v/v) e 2 mL de TEOS, deixando reagir por 12 h à temperatura ambiente com agitação constante. Finalmente, o produto obtido foi lavado com água ultrapura [82]. Na seguinte etapa, a silanização da

magnetita-TEOS foi realizada com 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano (MPS), que permitiu introduzir um derivado metacrílico (metacriloxi-) na superfície da magnetita, com a finalidade de realizar a posterior polimerização do MIP para biotina. Neste caso, a porção metacrílica do MPS servirá como um agente reticulante (co-polímero) para a polimerização do MIP. Para isto, 250 mg de magnetita-TEOS foram dispersas em 50 mL de solução a 10% (v/v) de MPS preparada em tolueno, e deixadas reagindo durante 12 horas com agitação constante. A seguir, o material silanizado (**core**) foi lavado com água ultrapura [82]. Por último, a preparação do MIP (**shell**) foi realizada pelo método de precipitação. Para tal, em um balão de vidro de 50 mL e de três bocas foram misturados a biotina (0,2 mmol), o ácido acrílico (0,08 mmol) e 30 mL de etanol (que foi usado como solvente porogênico). A mistura foi deixada reagir durante 12 horas a 25 °C. A seguir, adicionaram-se 200 mg de nanopartículas de magnetita silanizadas com o MPS e mantida sob agitação constante durante 3 horas. Após este tempo, adicionaram-se a mistura 4 mmol de EDGMA, que também serviu como agente reticulante, junto com a porção metacrilato do MPS (ligado à magnetita) e 0,05 mmol de AIBN usado como iniciador radicalar. A mistura foi sonicada por 10 min e o nitrogênio permaneceu borbulhando-se pelas 24 horas em que durou a reação, de maneira a impedir que o oxigênio interferisse na polimerização. O balão foi selado com Parafilme® e devido à biotina sofrer degradação por irradiação UV foi escolhido a polimerização térmica a 60 °C [82]. O polímero resultante é um sólido marrom, que não precisou ser separado através da moagem. A remoção do analito bem como dos reagentes remanescentes da síntese foram feitas através de extrator soxhlet com solução de metanol/ácido acético 9:1 (v/v) em intervalo de 72 horas. Por fim, os polímeros foram secos a 60 °C e estocados à temperatura ambiente.

Uma ilustração esquemática para o processo de impressão molecular da biotina sobre as partículas magnéticas está apresentada na Figura 12.

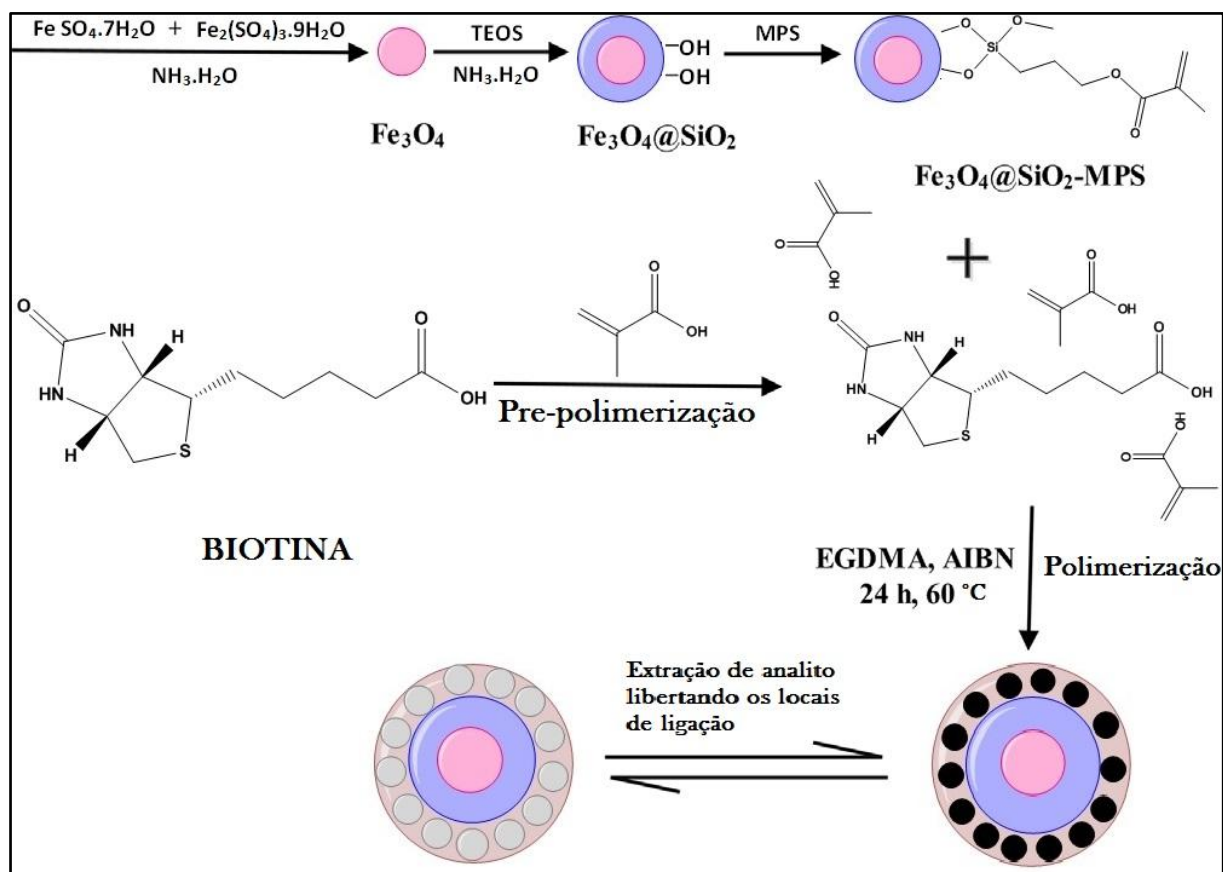
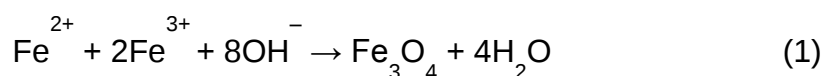


Figura 12. Representação esquemática da preparação do polímero molecularmente impresso para biotina sobre nanopartículas magnéticas.

2.6 Reações envolvidas na síntese pelo método de *core-shell*

2.6.1. Obtenção das nanopartículas de magnetita

Nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas através do método de co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} que pode ser seguida de uma oxidação parcial de Fe^{+2} ou de uma redução parcial de Fe^{+3} . A oxidação se produz pela adição de uma base (agente oxidante), a qual desprotona os ligantes do aquocomplexo de ferro, formando ligantes hidroxila, para posteriormente produzir a condensação e formação do óxido. A magnetita precipitada, de coloração preta, é dada pela reação química (1):



A precipitação completa de Fe_3O_4 acontece entre pH 9 e 14, mantendo a proporção molar entre Fe^{3+} e Fe^{2+} de 2:1. O controle de tamanho, forma e composição das nanopartículas é dependente do tipo de sal utilizado (cloreto, sulfato, nitrato, etc.) neste caso, foram utilizados sais de sulfato de ferro [83].

Uma temperatura de reação incorreta poderia contaminar o produto com outros óxidos de ferro indesejáveis, como por exemplo, a maghemita ou hematita. Neste sentido, a qualidade da síntese será pela característica magnética, que será apresentada no item 3.3.4., desta Dissertação.

Além disso, a temperatura também influi no crescimento das partículas, quanto maior é a temperatura de aquecimento, as partículas crescem más no tempo de reação. Em relação ao tempo de aquecimento, quanto maior tempo se mantenha

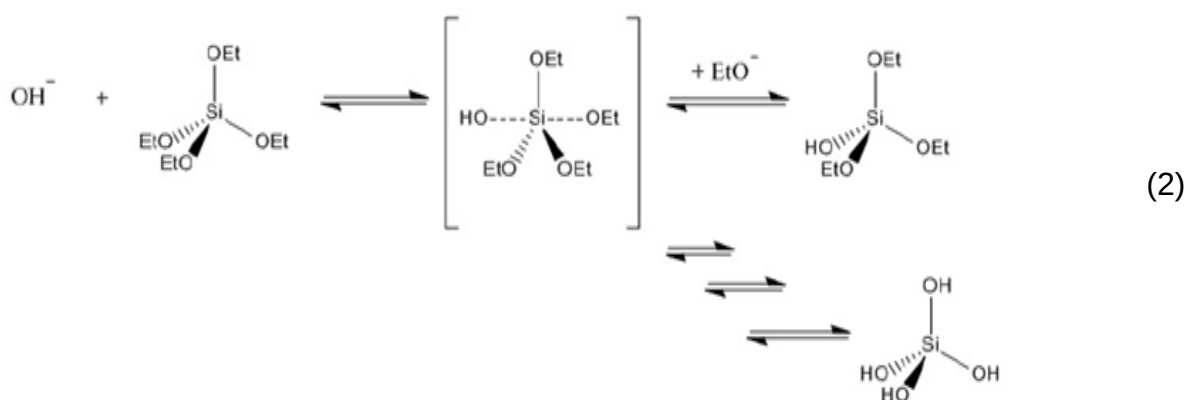
a dissolução dos sais de ferro, as partículas também apresentarão um maior tamanho devido à acumulação de partículas sobre os núcleos originados [84].

Assim, o tamanho das partículas obtidas seguindo a síntese por co-precipitação descrita na parte experimental foram avaliados com experimentos realizados por microscopia eletrônica de varredura descritos no item 3.3.1., desta Dissertação, mostrando que seguindo este procedimento realmente obtiveram-se nanopartículas magnéticas.

2.6.2. Modificação das nanopartículas magnéticas com TEOS pelo processo sol-gel

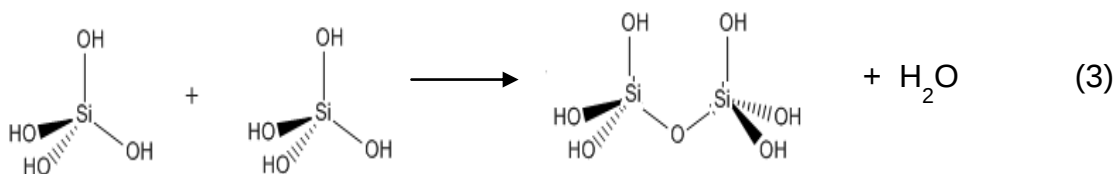
2.6.2.1. Hidrólise de TEOS por catálise básica

Para obter as nanopartículas magnéticas revestidas com sílica para posterior silanização e polimerização do MIP, utilizou-se o processo de sol-gel, que tem como primeira etapa a hidrólise do alcóxido tetra-orto-silicato (TEOS) catalisada em meio alcalino (reação 2), e liberando seu álcool correspondente, formando assim várias moléculas de tetra-hidróxido de silício ($\text{Si}(\text{OH})_4$) [87].



2.6.2.2. Condensação do tetra-hidróxido de silício

A seguir os grupos silanóis (Si-OH) polimerizam por condensação formando estruturas tridimensionais unidas entre si, por ligações de siloxano (Si-O-Si) com eliminação do água (reação 3) [85].



Esta polimerização provoca a ligação dos grupos siloxanos sobre a superfície das nanopartículas magnéticas através dos oxigênios disponíveis nestas, ficando revestidas, tal como esquematizado na Figura 13.

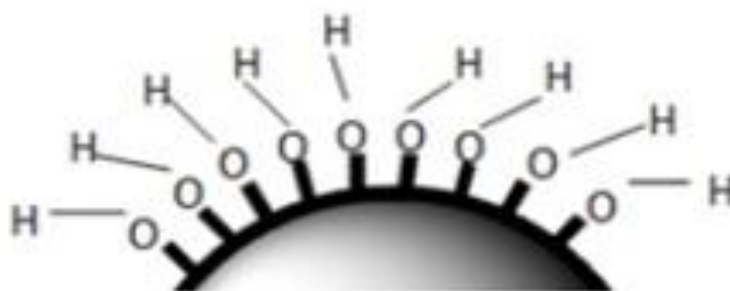
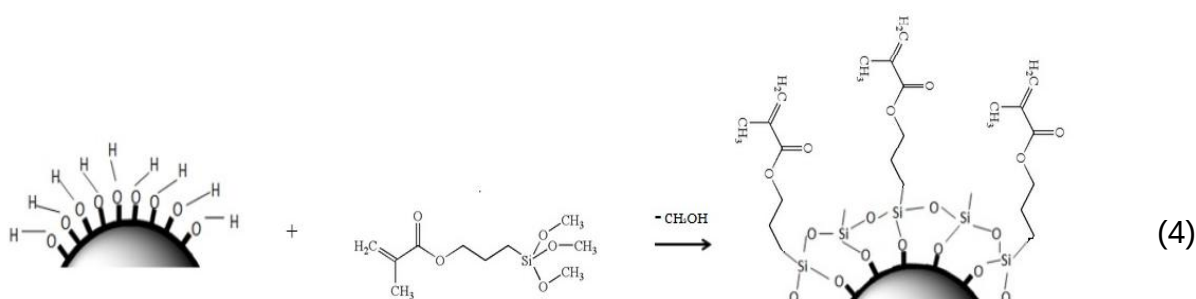


Figura 13: Estrutura da magnetita revestida com grupos Si-OH.

2.6.3. Silanização das nanopartículas magnéticas modificadas com TEOS

Após obter as nanopartículas de magnetita revestidas com grupos silanóis, foi possível realizar sua funcionalização com o silano 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano (MPS) por meio de uma silanização. Desta maneira, sendo o produto resultante um silicato metacrílico com eliminação de metanol (reação 4) [85].



2.6.4. Polimerização do MIP seletivo a biotina sobre nanopartículas magnéticas

Para sintetizar o MIP para biotina sobre as nanopartículas magnéticas previamente silanizadas, foi seguido o procedimento descrito no item 2.5. Para tal, é importante ressaltar que a interação entre o analito (biotina) e o monômero funcional (ácido acrílico, AA) escolhido pela simulação computacional, interagiram por pontes de hidrogênio, e que o reagente de ligação cruzada (EGDMA) atua como um monômero estrutural uma vez que ele cria uma estrutura polimérica tridimensional que preserva os grupos do monômero funcional em uma posição fixa e complementar à molécula molde, garantindo rigidez e estabilidade aos sítios de ligação, por isto, o EGDMA deve ser utilizado em excesso em relação à quantidade de monômero funcional, a

fim de que a estabilidade mecânica do material seja garantida. Com base nisto, foi utilizada a relação molar entre a molécula molde : monômero funcional : monômero estrutural de 1:4:20, uma vez que a mesma tem sido rotineiramente empregada em impressão molecular [52-53].

Adicionalmente, neste caso, o silano metacrílico foi também utilizado como co-polímero da reação, podendo-se ligar com o monômero funcional (AA) ou o EDGMA, de modo que as nanopartículas magnéticas fiquem no núcleo na polimerização do MIP .

A iniciação do processo de polimerização somente é possível quando radicais livres estão presentes no meio reacional [52]. Neste sentido, a presença do iniciador 2,2'-azo-bis-iso-butyronitrila (AIBN) fez-se necessária uma vez que esta substância sofre reação de homólise por irradiação UV ou por aquecimento a 60 °C, para gerar os radicais livres necessários, conforme mostra a Figura 14.

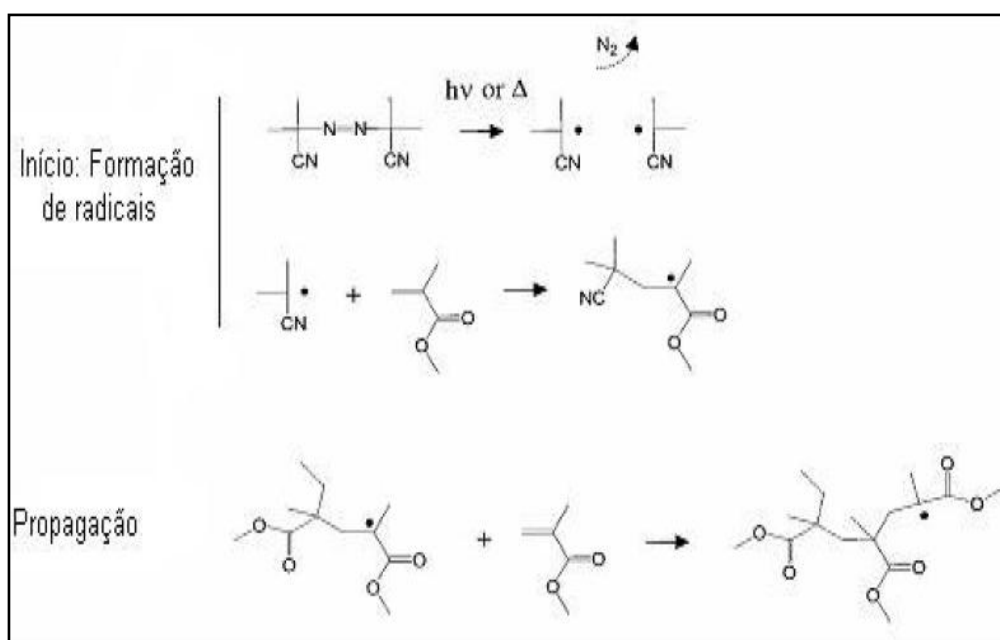


Figura 14. Polimerização via radical livre do monômero funcional ácido metacrílico com AIBN como iniciador radicalar. Fonte Sellerger , 2001.

Desta maneira, os grupos vinílicos do monômero ácido acrílico, do co-polímero do silano, e o monômero estrutural (EDGMA) que possuem pares de elétrons que podem ser facilmente atacados pelos radicais livres do iniciador radicalar poderão dar andamento à polimerização (Figura 15) do MIP para biotina.

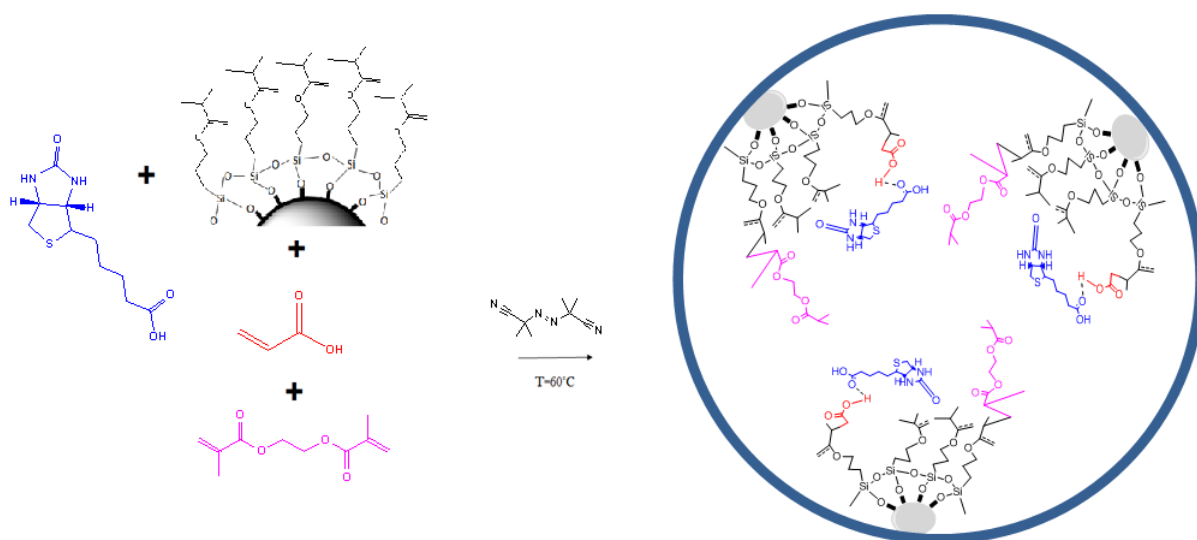


Figura 15. Esquema proposto para a obtenção do MIP magnético para biotina, obtido pelo método de *core-shell*.

2.7. Caracterização dos polímeros de impressão molecular MIP e dos correspondentes NIP

2.7.1. Caracterização morfológica dos MIP através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para isto, as medidas foram realizadas em um equipamento MEV da JEOL modelo JSM 7500F. As amostras primeiramente foram dispersas em álcool

isopropílico, logo foram colocadas no STUB do equipamento que continha um substrato de silício, para dar devido contraste. A seguir, foi adicionada cola de grafite, e os STUB colocados no porta-amostra do microscópio eletrônico de varredura, para realizar as medidas.

2.7.2. Caracterização dos polímeros por espectroscopia no infravermelho

As análises de caracterização dos polímeros por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no instituto de química da UNESP, utilizando o equipamento Varian[®] 660-IR FT-IR Spectrometer, com aplicação direta na amostra.

2.7.3. Análise por adsorção e desorção de N₂ (método BET) dos polímeros impressão magnéticos

Para a medição da área superficial específica e do tamanho dos poros usou-se o equipamento Micromeritics GEMINI-VII, serie t, do *Laboratorio de Investigación de Físicoquímica* da Faculdade de Ciências da *Universidad Nacional de Ingeniería* em Lima – Peru. O equipamento permite o registro da isoterma de adsorção em todo o intervalo de pressões parciais utilizados (P/P_0). Foi utilizado nestes experimentos N₂ como gás de análise (gás N₂, 99% AGA Thermolene[®]). A área da isoterma BET, foi calculada no intervalo de pressão (P/P_0) entre 0,05 e 0,33 que corresponde à adsorção de uma monocamada. Os pontos de equilíbrio foram

medidos pelo programa GAS MICROMERITICS totalizando 50 pontos, com um tempo de equilíbrio em cada ponto de 7 s. Antes da adsorção, as amostras foram degaseificadas sob vácuo, durante 2 h a 80 °C, a fim de remover a água e as impurezas da superfície.

2.7.4. Análise de magnetometria de amostra vibrante (VSM)

Para a caracterização magnética foi usada o equipamento LakeShore VSM série 7300 do Centro Atômico Bariloche, Divisão de Resonancias Magnéticas, Argentina. As análises VSM foram realizadas a fim de estudar as propriedades magnéticas dos magneto-MIP e das etapas da síntese. Curvas de histerese de todos os materiais foram obtidas, mostrando a saturação remanente e o campo coercitivo.

2.7.5. Análise por difração de raios X (DRX)

Para a identificação cristalográfica da magnetita pela técnica DRX usou-se o equipamento DIFFRAC PLUS XRD Commander, da SIEMENS modelo D5000, instalado no departamento de Físico-Química do IQ/CAr. Tal equipamento é composto por dois goniômetros (é um instrumento de medida em forma semicircular ou circular graduada em 180° ou 360°, utilizado para medir ou construir ângulos), sendo um para medidas de difratometria em amostras sólidas, com geometria BRAGG – BRENTANO, θ -2 θ , radiação Cu K α , com detector de cintilação e monocromador de grafite que eleva a sensibilidade através da otimização da

relação entre pico e linha base, e o outro para medidas de difração com tratamento térmico, utilizando detector PSD (Pulse Shape Discrimination) multicanais, trabalhando com ângulos de varredura entre 10 e 80° a uma velocidade de 0,04° s⁻¹ para os magneto-MIP.

2.7.6 Caracterização dos polímeros por experimentos de afinidade

Para a realização dos estudos de afinidade, através da capacidade de retenção da biotina pelo magneto-MIP, foram usadas cinco soluções padrão de analito. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente pela mistura de 10 mg de polímero (material adsorvente magnético) e 5,0 mL das diferentes soluções de concentração conhecida de biotina variando as concentrações entre 5 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹. Para isto, a mistura foi agitada mecanicamente por 120 min, e separada por um ímã de neodímio e, o sobrenadante filtrado em membrana Milipore® 0,45 µm e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para estas análises foi utilizado um sistema cromatográfico da Shimatzu® com detector UV e injeção automática. As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático com fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄ : metanol (80:20, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®. O fluxo foi mantido em 1 mL min⁻¹ à temperatura ambiente (25 °C) e detecção UV a 210 nm [86]. As soluções de concentração conhecida de biotina para estes experimentos de afinidade foram preparadas em 3 mL de água quente e completando o volume com etanol até 10 mL, obtendo concentrações finais variando entre 5,0 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹

As soluções padrão de biotina e dos interferentes usadas na cromatografia foram preparadas com a mesma proporção de 1:9 (água quente e metanol). Desta forma, foi possível determinar a quantidade de biotina ligada no polímero (Q , mmol g⁻¹) subtraindo a concentração livre de biotina (C) da concentração inicial (C_0), considerando o volume de solvente e a massa de polímero, tal como descrito na equação 1. Com estes valores foi possível obter as isotermas de adsorção apresentadas no 3º Capítulo desta Dissertação.

2.8. Aplicação dos magneto-MIP em amostra de leite

Para a análise de amostras de leite usando os magneto-MIP, amostras de leite cru, obtida diretamente de uma fazenda; leite desnatado e leite em pó, obtidas do comércio local, foram propositalmente contaminadas com biotina em uma concentração de 0,5 mg g⁻¹. Para isto, 2 g de leite foram misturados com 1 mg de biotina, foram adicionados 100 mL de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹ e agitados durante 30 minutos a 120 °C. A mistura foi deixada esfriar à temperatura ambiente e o pH ajustado entre 6 e 7, utilizando uma solução de NaOH 2 mol L⁻¹. Finalmente, a mistura foi filtrada, quando necessário [87].

CAPÍTULO 3

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Simulações computacionais: Obtenção dos dados teóricos para escolha do monômero funcional

Foram realizadas simulações computacionais para avaliar a interação da biotina com os 20 monômeros propostos, as quais foram realizadas em duplicata com a finalidade de obter resultados confiáveis e comparáveis. Para cada monômero foram empregados três conformêros diferentes para avaliar de forma mais precisa as possibilidades de interação entre as diferentes conformações do monômero e o analito. Cada simulação durou em média 26 horas.

A energia de interação entre a Biotina e os monômeros está apresentada na Figura 16 onde se verificam as forças atrativas ($E < 0$) entre a biotina e os diversos monômeros.

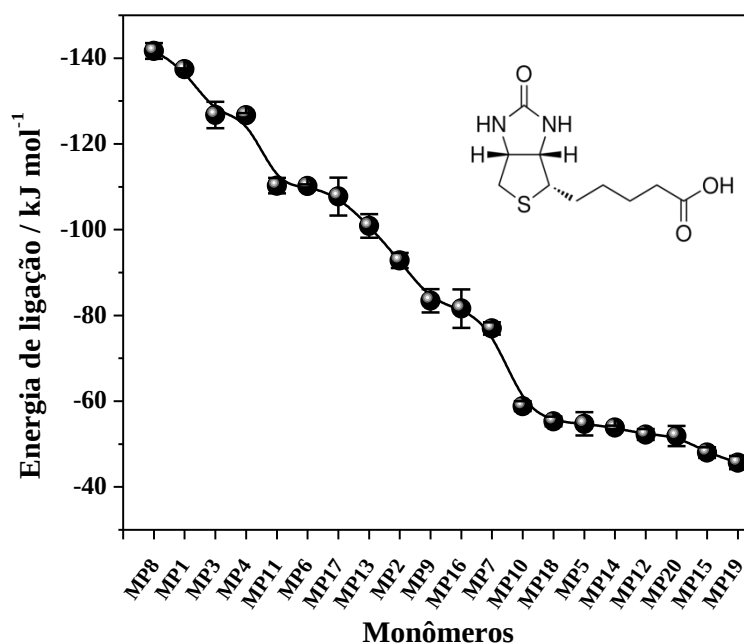


Figura 16. Resultados da modelagem molecular entre a biotina e os 20 monômeros apresentados na Tabela 4.

Os monômeros **8** (acrilonitrila); **1** (N,N'-Metilenobisacrilamida), **3** (étil éster de imidazol-4-ácido acrílico) e **4** (ácido acrílico) são os mais adequados para interação com a biotina visto que apresentaram maiores energias de interação. Já os monômeros **15** (estireno) e **19** (2-acrilamida-2-metil-1-ácido propanossulfônico) apresentaram o pior resultado, uma vez que a energia de ligação é menos negativa e com isto, a interação será menos espontânea.

Os resultados da simulação computacional aparentemente são satisfatórios, visto que, como na estrutura da biotina existem átomos de nitrogênio e enxofre, é explicável a afinidade por monômeros que possuam características ácidas, o que explica a forte interação entre a molécula de biotina e os monômeros **8** e **4** comparado com os monômeros **20**, **15** e **19**.

Para comprovar a eficácia da simulação computacional, foram sintetizados três polímeros distintos, variando-se entre eles somente o monômero. Para tal, foram escolhidos para serem utilizados na síntese desses MIP, um monômero da

classe com maior energia de interação (4, ácido acrílico), um monômero intermediário (16, 1-vinilimidazol), um monômero da classe de menor energia de interação (12, ácido metacrílico) (figura 17). Deste modo foi possível avaliar o quanto os dados da modelagem molecular são representativos e eficientes.

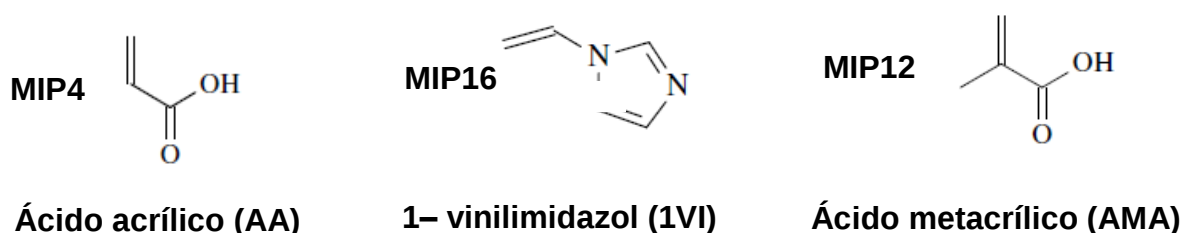


Figura 17. Estrutura química dos monômeros usados neste trabalho.

3.2. Caracterização dos MIP sintetizados

3.2.1. Caracterização morfológica através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Conforme descrito na sessão experimental foram sintetizados vários MIP com os monômeros MIP4, MIP16 e MIP12, seguindo o resultado da simulação computacional, assim como foram empregados diversos métodos de sínteses para modificação das nanopartículas magnéticas, a mini-emulsão e por *core-shell*.

Pode-se observar que usando a síntese por mini-emulsão, as partículas de magnetita encapsulada encontram-se muito aglomeradas e não possuem forma esférica uniforme (Figura 18a). Já na Figura 18b) que corresponde ao MIP magnético para biotina, observa-se que ele não apresenta aparência uniforme nem esférica, e que possui algumas imperfeições devido à distribuição da magnetita entre

as partículas do polímero. Assim, o tamanho de partícula não é possível ser medido [88].

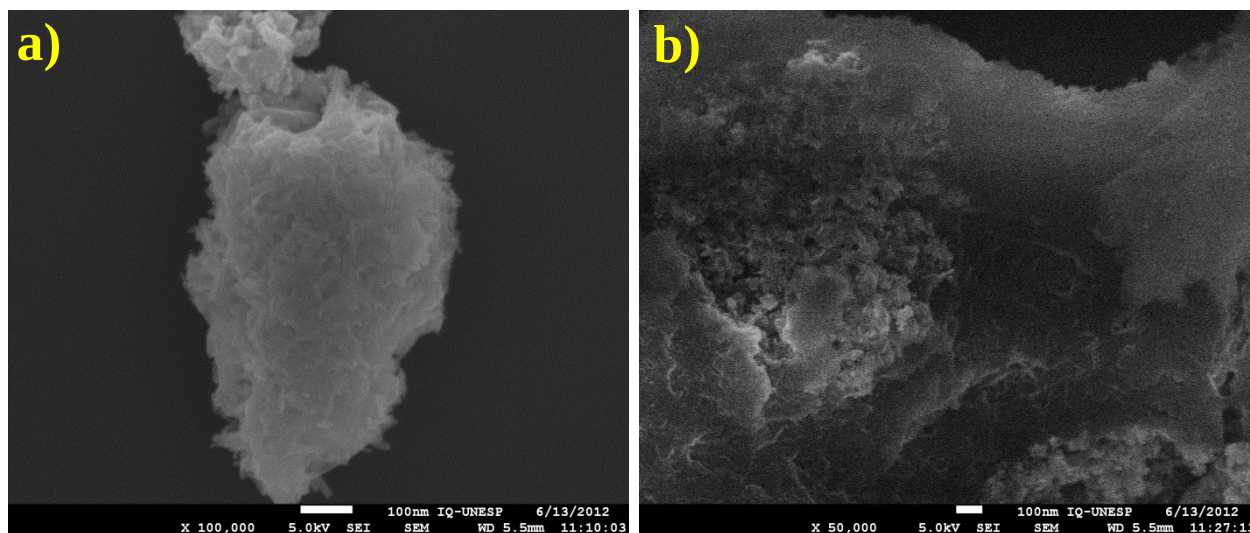
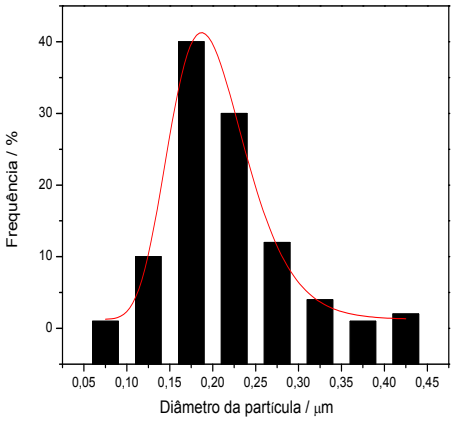
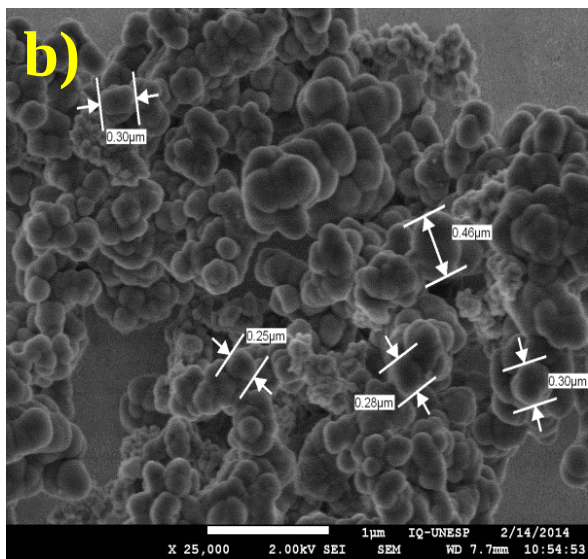
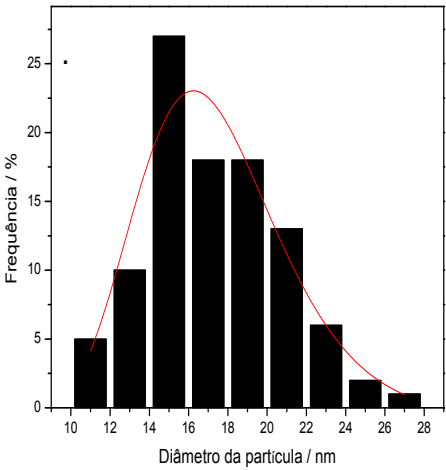
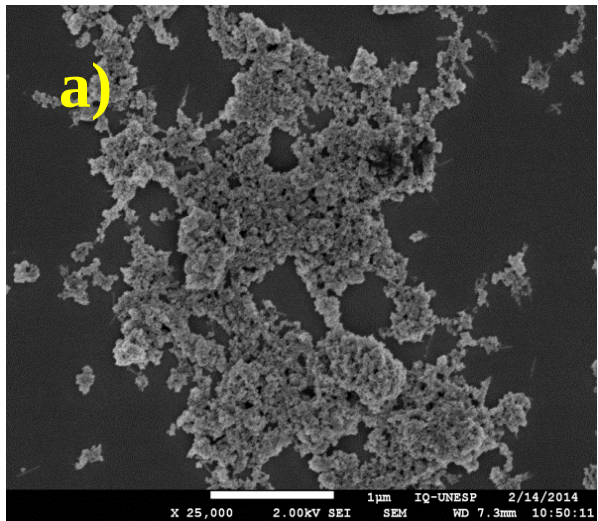


Figura 18: Imagens de MEV para: (a) Magnetita encapsulada e (b) MIP magnético para biotina.

Na síntese por *core-shell* se pode observar na Figura 19(a) que as nanopartículas magnéticas sintetizadas, embora que aglomeradas, apresentam-se uniformes e esféricas. Em seu respectivo histograma de distribuição do tamanho de partícula, pode-se observar uma maior quantidade em um diâmetro médio de 17 nm. Na Figura 19(b) em seu respectivo histograma observam-se partículas esféricas de diâmetro médio de 197 nm, indicando que o processo sol-gel de introdução de grupos silanos na superfície da magnetita foi bem sucedido. Na Figura 19c) se observa que as partículas magnéticas foram revestidas totalmente com o silano MPS, aparentemente mantendo sua forma esférica e apresentando um diâmetro médio de 565 nm. Finalmente, na Figura 19d) se observa a aparência do magneto-MIP para biotina. Neste caso observa-se que são obtidas partículas aglomeradas de forma esférica, apresentando um diâmetro médio de 990 nm, o qual se explica pelo método de polimerização usado, que foi o de precipitação, por isso não há

necessidade da moagem do produto obtido [89], entretanto, devido ao revestimento da polimerização com o MIP o aumento do tamanho das partículas foi inevitável.



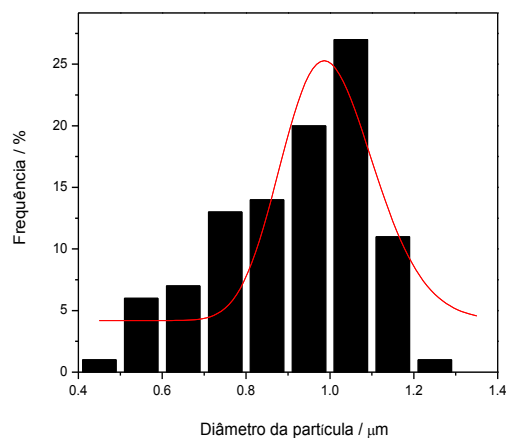
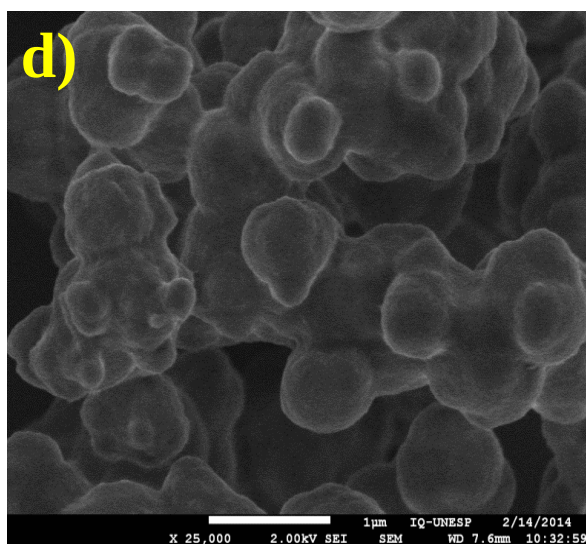
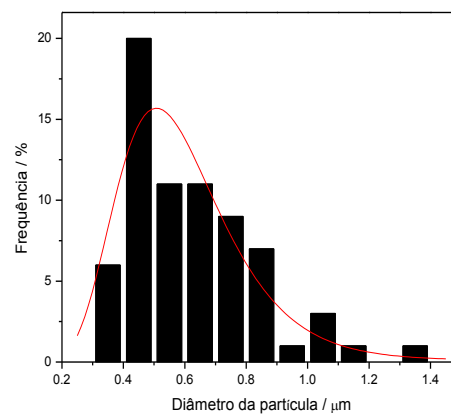
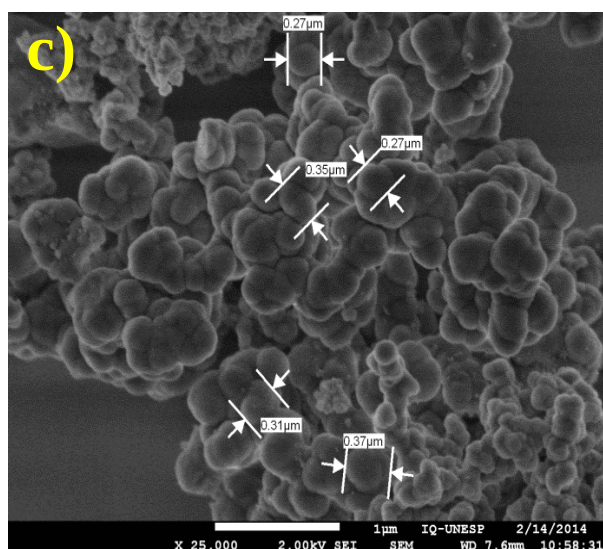


Figura 19: Microscopias eletrônicas de varredura e seus gráficos da estimativa do diâmetro médio das partículas. (a) Nanopartículas de magnetita; (b) magnetita modificada com TEOS; (c) magnetita modificada com MPS e (d) magnetita modificada com polímero impregnado para biotina usando ácido acrílico como monômero funcional.

3.2.2. Caracterização química por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os produtos de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-TEOS}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NIP}$ foram caracterizados também por espectroscopia FTIR (Figura 20). O pico a 574 cm^{-1} é atribuído ao estiramento da ligação Fe–O na Figura 20(a). Em comparação com os dados de infravermelho do Fe_3O_4 sem modificar (21a), no espectro da curva 20b, observam-se picos característicos do grupo Si–O–Si em 1093 cm^{-1} e do grupo–OH em 1628 cm^{-1} e 3405 cm^{-1} indicando a formação de revestimento de sílica sobre a superfície do Fe_3O_4 . Como pode ser visto a partir do terceiro gráfico (curvas 20c), o pico do grupo C=O a 1700 cm^{-1} indica que a silanização com MPS foi realizada com sucesso na superfície do $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-TEOS}$, os picos do grupo C=O a 1254 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , e da ligação C–H do grupo metilo a 2987 cm^{-1} indicam que a camada de ácido acrílico foi formada com sucesso na superfície de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Além disso, as curvas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP}$ (curva 20d) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NIP}$ (curva 20e) apresentam os mesmos picos característicos, sugerindo a remoção completa do *template* (biotina). Estes resultados demonstram que os revestimentos de MIP e NIP na superfície $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ foram realizados de forma satisfatória [90].

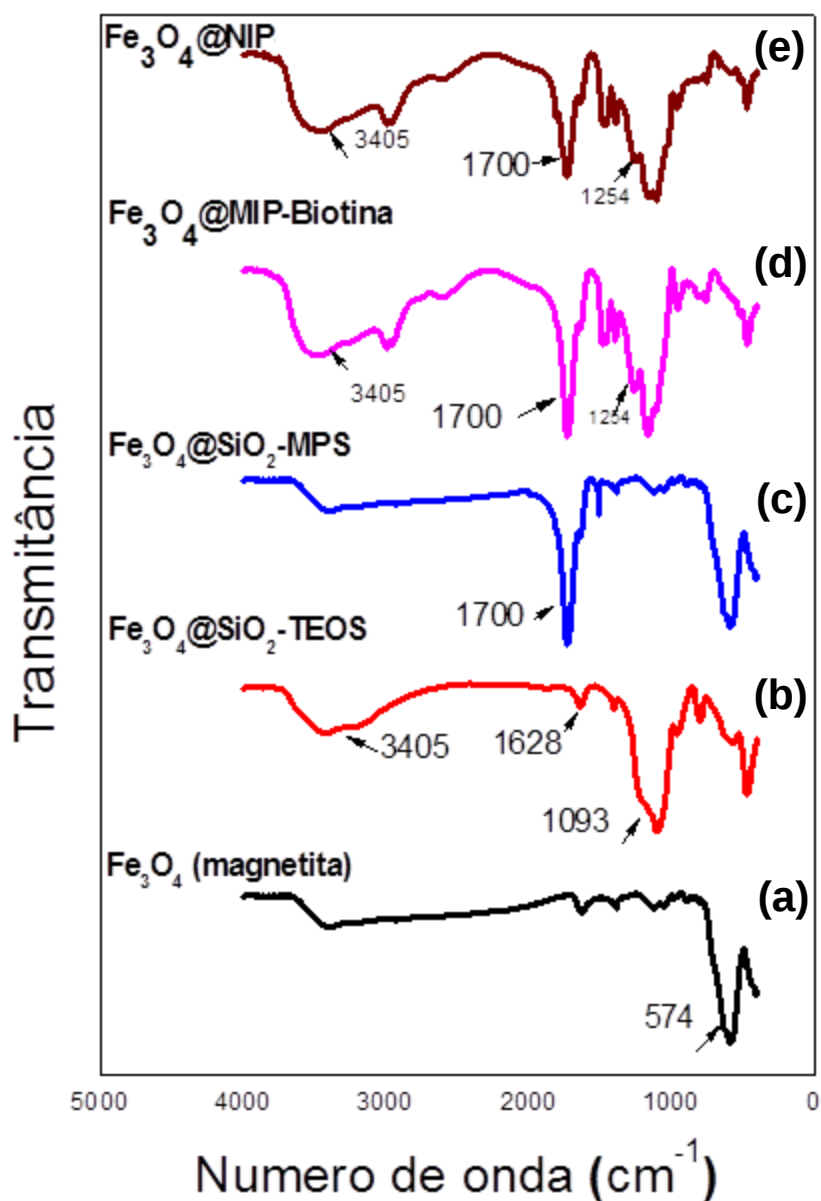


Figura 20: Espectros de infravermelho de (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-TEOS}$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$, (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP}$ e (e) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NIP}$.

Pode-se observar também a ausência do sinal em $1670\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ proveniente do estiramento de grupos vinila dos monômeros, que desaparecem em todos os polímeros sintetizados (Figuras 21) devido à quebra das ligações $\text{C}=\text{C}$ no processo de polimerização, dando origem a ligações simples.

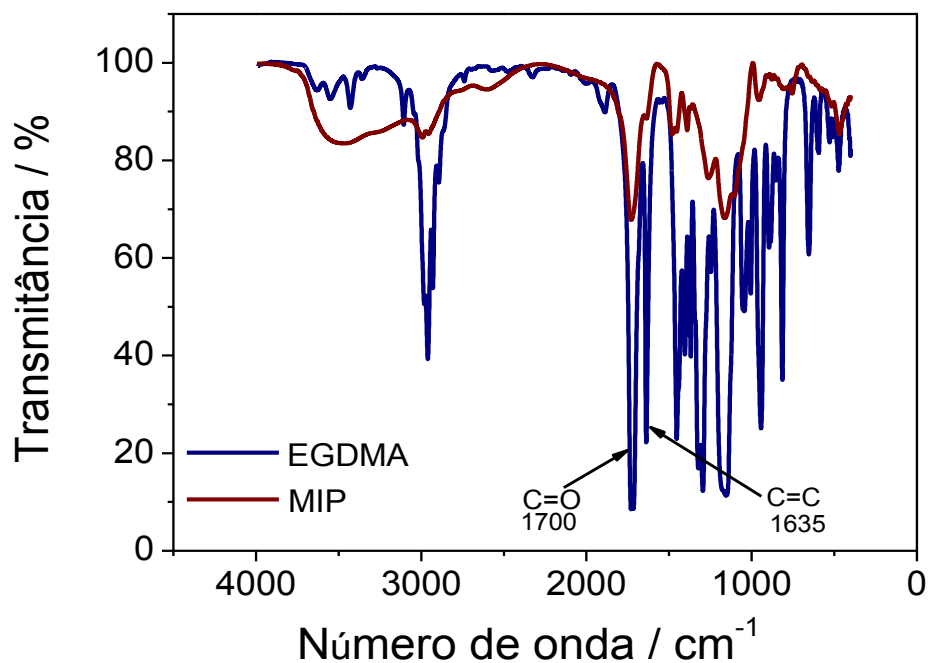


Figura 21. Espectros de FTIR do e EDGMA e do MIP sintetizado com o monômero AA.

3.2.3. Análise por adsorção e dessorção de N₂ (método BET) dos polímeros impressão magnéticos

Com a finalidade de investigar, se a síntese do magneto-MIP para biotina foi bem sucedida, um parâmetro físico que pode dar um indicio disto, é a medida da área de superficial (Figura 22). Uma vez que, uma área superficial maior equivale à maior porosidade do material, sugerindo a formação de cavidades no polímero impresso.

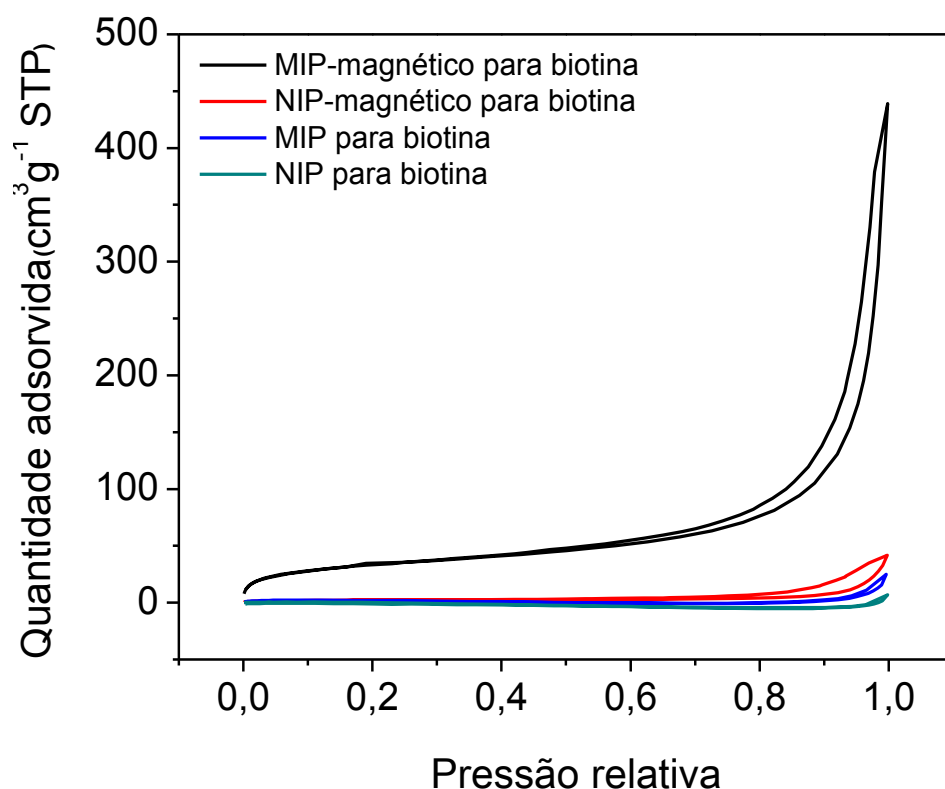


Figura 22: Isoterma BET para o MIP e NIP magnético para biotina e MIP e NIP sem magnetita de Biotina

Tabela 5. Resultados da porosidade obtidos através da isoterma de adsorção (BET) para as amostras de magneto-MIP e MIP para biotina e seus respectivos NIP.

Amostra	Área superficial / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Tamanho diâmetro médio de poro / Å
MIP – magnético	119,97	48,5
NIP- magnético	7,68	42,8
MIP sem magnetita	5,53	3,73
NIP sem magnetita	0,43	-

Na Tabela 5, observa-se que o MIP–magnético possui uma área superficial 15,6 vezes maior que a área superficial do NIP–magnético. Isto pode ser explicado pelo maior número de poros introduzidos no polímero impresso, devido às cavidades

seletivas do MIP. Analogamente, o MIP sem magnetita é 12,9 vezes mais poroso que seu correspondente NIP, os quais também foram sintetizados pelo método de precipitação, tal como realizada na última etapa da obtenção dos polímeros magnéticos no procedimento *core-shell*.

Quando comparadas as porosidade entre os materiais magnéticos e não magnéticos, a elevada porosidade daqueles magnéticos pode ser explicada pela maior quantidade de partículas formadas, uma vez que o material nanométrico permite que maior quantidade de MIP seja sintetizado na superfície da matriz magnética. Já o aumento no tamanho do poro, provavelmente se deva ao uso de tolueno, como solvente porogênico, o qual possui baixa constante dielétrica, permitindo uma maior interação entre o analito e o monômero funcional e entre o analito e o co-polímero MPS imobilizado na sílica.

A morfologia dos MIP, mostrado na Figura 23, é caracterizada, de modo geral, a partir de núcleos que se formam em torno do iniciador que cresce entre 10 e 30 nm de diâmetro e, em seguida, se agrega a outros núcleos para formar microesferas com diâmetros entre 100 e 200 nm. Essas microesferas agregam-se a grupos maiores (clusters), formando o corpo do polímero. A porosidade e área superficial resultantes nos MIP são originados a partir de espaços vazios irregulares localizados entre os clusters das microesferas (macroporos, que apresentam diâmetro superior a 50 nm), ou a partir do espaço intersticial de um determinado cluster de microesferas (mesoporos, que apresentam diâmetro entre 2 e 50 nm), ou mesmo dentro das próprias microesferas (microporos, com diâmetros inferiores a 2 nm).

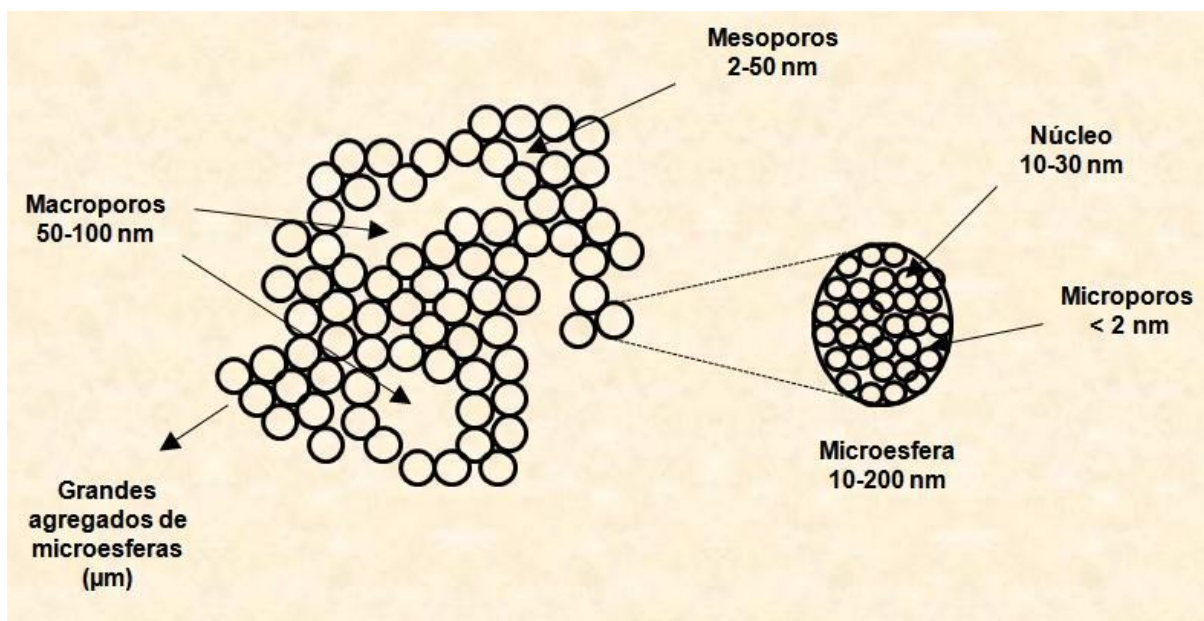


Figura 23: Modelo da formação morfológica dos poros da rede polimérica dos polímeros de impressão molecular. Adaptado de SPIVAK, 2005 [51].

Os valores típicos para a área superficial de polímeros impressos estão na faixa de 100 a 400 m² g⁻¹. Para a distribuição de tamanho dos poros, há tanto macroporos e mesoporos na faixa de 2 a 100 nm, e microporos de 0,6 a 2 nm de diâmetro [91]. De acordo com os dados experimentalmente obtidos, todos os polímeros podem ser considerados como mesoporosos, uma vez que apresentam uma área superficial entre 10 e 500 m² g⁻¹ e poros com diâmetro médio entre 2 e 50 nm.

3.2.4. Análise de magnetometria de amostra vibrante (VSM)

Outro parâmetro importante para caracterizar os materiais magnéticos sintetizados é a conservação de sua propriedade magnética, mesmo após sua modificação com o material polimérico seletivo (MIP). Para tal, foi usado a Magnetometria da Amostra Vibrante (VSM, *vibrant sample magnetometry*), e o ciclo de histerese magnética das amostras secas à temperatura ambiente é mostrado na Figura 24.

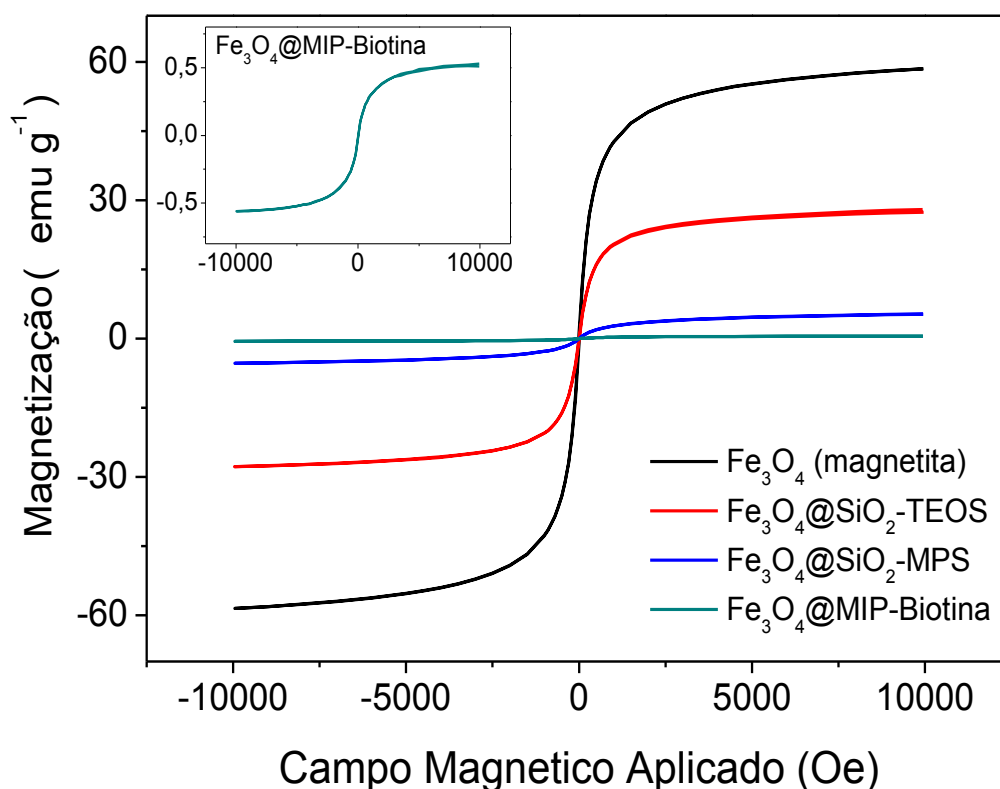


Figura 24: Magnetometria da amostra vibrante para as diferentes amostras obtidas durante o processo de síntese das magneto-MIP para biotina. No gráfico inserido mostra-se a ampliação da curva de histerese obtida para o magneto-MIP.

É evidente que nos estudos realizados não se observa histerese, nem magnetização remanescente (os gráficos são perfeitamente simétricos) e nem de coercitividade (o ponto meio dos gráficos está em zero), sugerindo que as amostras

sejam superparamagnéticas [92]. Os valores obtidos à temperatura ambiente da magnetização de saturação foram 58,5; 27,8; 5,35 e 0,55 emu g⁻¹ para magnetita (Fe₃O₄), Fe₃O₄@SiO₂-TEOS, Fe₃O₄@SiO₂-MPS e Fe₃O₄@MIP-Biotina, respectivamente. Os valores para a magnetização de saturação da Fe₃O₄@MIP-Biotina foram reduzidos em mais de 100 vezes em comparação com o Fe₃O₄ puro, porém mesmo assim o material obtido permaneceu fortemente magnético. Assim, na temperatura ambiente e na presença de um eficaz transportador magnético (ímã de Neodímio) ocorre a separação eficiente das magneto-MIP, tal como mostrado na Figura 25.

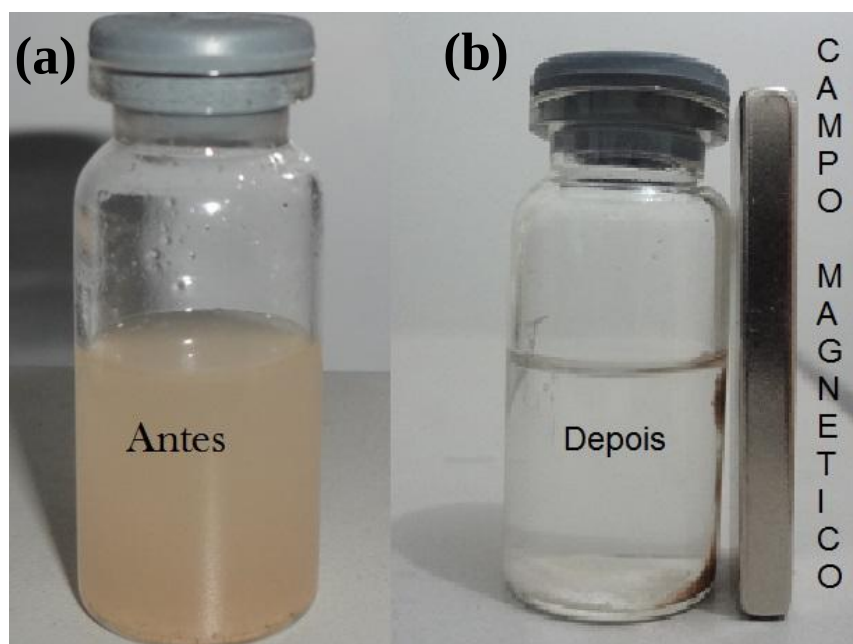


Figura 25: Eficiência das magneto-MIP sintetizadas, na presença de um campo magnético externo. (a) Antes e (b) Após aplicação de um campo magnético fornecido por um ímã de Ne.

3.2.5. Análise por difração de raios X (DRX)

Outra técnica que foi usada para a caracterização do material sintetizado foi a difração de raios X (XRD). Para tal, a Figura 26, mostra os diversos padrões de difração obtidos para a magnetita (a); $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{--TEOS}$ (b); e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP}$ (c); na faixa de 2θ entre 10 e 80°. Na Figura 26 observam-se, com perfil característico de nanopartículas, seis picos característicos para Fe_3O_4 (2θ) = 30,38°; 35,58°; 43,14°; 53,48°; 57,08° e 62,66° para as três amostras. Estes picos correspondem aos planos 2 2 0; 3 1 1; 4 0 0; 4 2 2; 5 1 1 e 4 4 0; respectivamente. E estão em concordância com o banco de dados de magnetita do Centro JCPDS - Internacional para os dados de difração (JCPDS cartão: 19-629) [92]. Os padrões de difração de raios X mostram a presença dos picos de difração específicos correspondentes ao óxido de ferro sintetizado e modificado. Entretanto, não é possível diferenciar a presença de maghemita (Fe_2O_3) junto com a magnetita. A qual poderia ter sido formada pela oxidação de Fe_3O_4 para Fe_2O_3 durante os processos da síntese e/ou modificação da magnetita. Entretanto, esta dificuldade em diferenciar estes dois compostos, não é importante neste caso, pois ambos possuem propriedades magnéticas semelhantes.

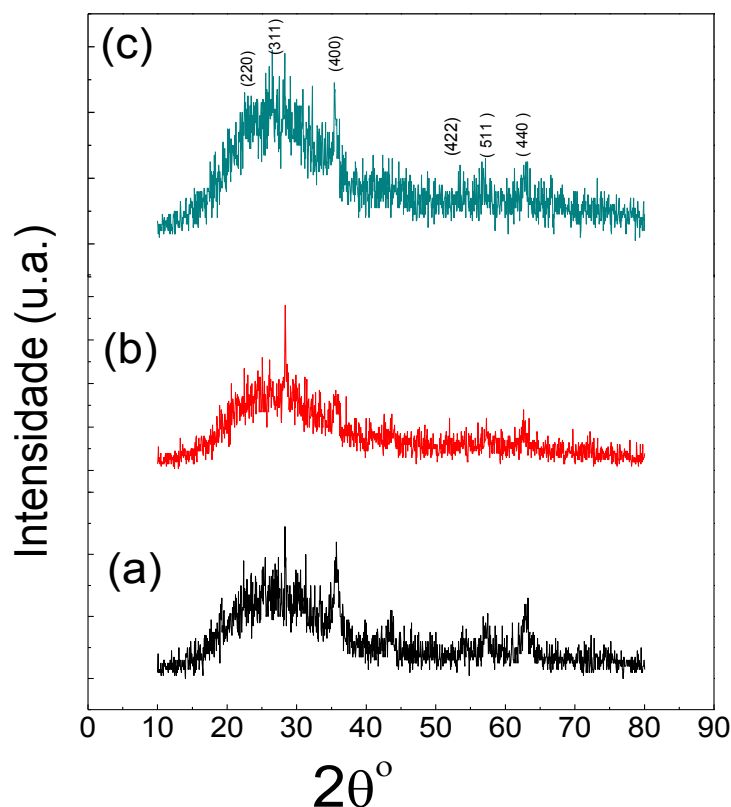


Figura 26: Espectros de XRD de (a) Fe_3O_4 ; (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-TEOS}$; e (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP}$

3.3. Extração de analito das cavidades seletivas do magneto-MIP

Para formação das nanocavidades seletivas para biotina, é muito importante que a extração da molécula do interior do polímero impresso seja realizada sob condições que evitem a destruição da conformação química e estrutural das nanocavidades.

Para isto, como já mencionado na parte experimental, os MIP foram colocados em papel de filtro e percolados com uma solução de metanol : ácido acético (9:1, v/v) utilizando-se um sistema de extração soxhlet.

O solvente foi trocado a cada 24 h durante quatro, e no ultimo dia, foi usado apenas metanol para eliminar o resíduo de ácido acético. A cada troca de solvente foi analisada a solução de extração, sendo a biotina quantificada utilizando cromatografia liquida de alta eficiência. Na Figura 27 se pode verificar a eliminação completa do analito após o quarto dia de refluxo, uma vez que, não foi identificada a biotina no solvente de extração.

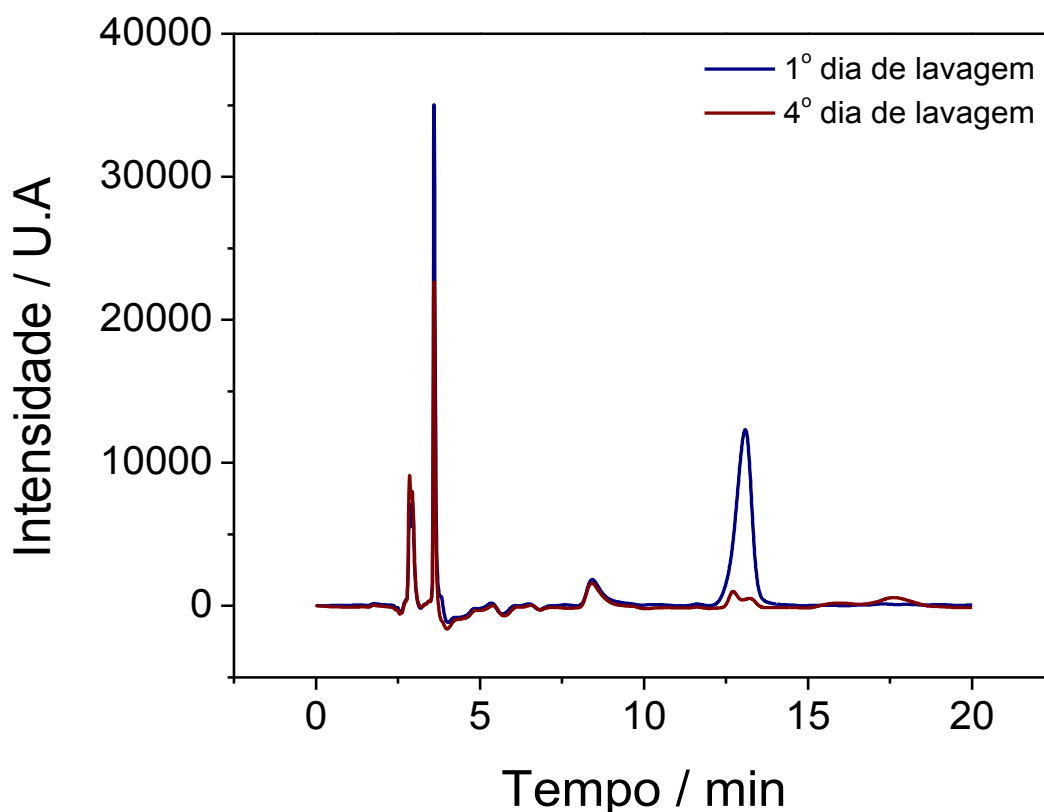


Figura 27: Cromatograma da extração da biotina .Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄ : metanol (80:20) usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para Biotina.

Tabela 6. Concentração de biotina obtida depois das lavagens

Dia de lavagem	Concentração encontrada da Biotina (mg L⁻¹)
1º dia	98,9
4º dia	1,11

3.4. Caracterização dos polímeros por experimentos de afinidade através da análise de isotermas de adsorção

Depois de verificada a síntese bem sucedida dos magneto-MIP por *core-shell*, a seguir foi avaliada a eficácia do material no reconhecimento da biotina. Para tal, foram realizados experimentos de afinidade (ligação/adsorção), visando otimizar os parâmetros que permitirão obter as melhores condições para o reconhecimento da biotina. Estes experimentos incluíram o estudo da quantidade de polímero, o pH de adsorção da biotina, o tempo de adsorção. Uma vez otimizados estes parâmetros foram construídas as isotermas de adsorção para nanopartículas, usando os monômeros funcionais previamente descritos ácido acrílico (AA), 1-vinilimidazol (1-VI) e ácido metacrílico (AM).

Nos estudos de otimização da dosagem de magneto-MIP, foi avaliada a capacidade de adsorção do polímero em função da massa de MIP usada nos experimentos (Q). Como observado na Figura 28, o valor de Q aumentou rapidamente com o aumento da dose até 10 mg de polímero. Depois desse valor a capacidade de adsorção começou a diminuir mantendo-se relativamente constante

após 50 mg de polímero. Assim, 10 mg foi escolhido para os experimentos posteriores.

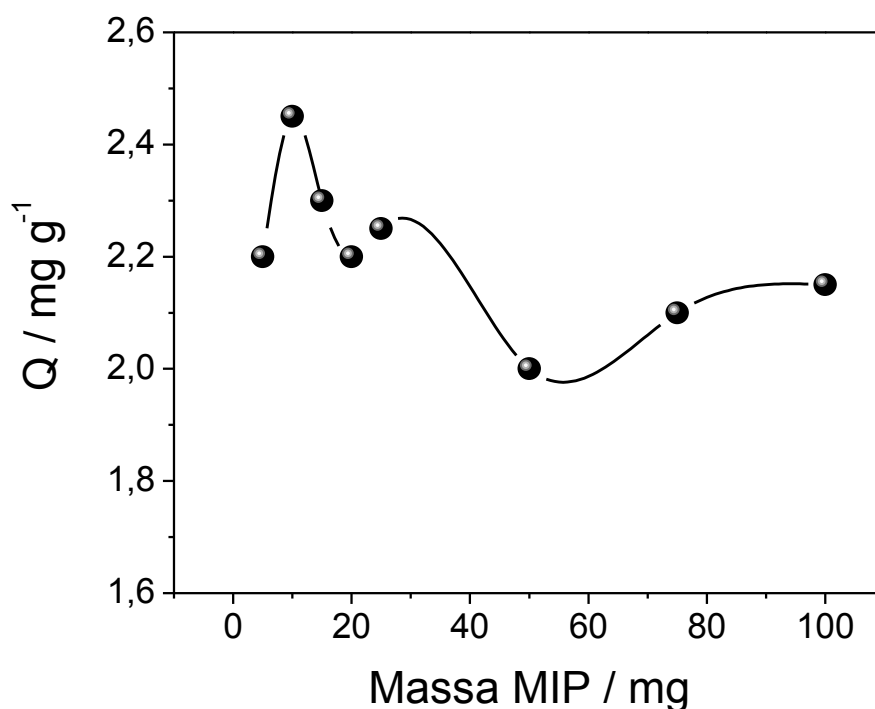


Figura 28: Otimização da dosagem do polímero magnético nos experimentos de adsorção, para uma solução de concentração inicial de biotina 10 mg L⁻¹ preparada em água:metanol (1:9 v/v).

Para a otimização do pH da solução, os experimentos de adsorção foram realizados da seguinte maneira, a biotina foi dissolvida em 1,0 mL de água quente, e a seguir completado o volume até 10,0 mL com metanol para se obter 5 frascos com a mesma concentração de 10 mg L⁻¹. Sobre cada uma destas soluções foram adicionados 10 mg de magneto-MIP, e usando HCl ou NaOH, 0,02 mol L⁻¹ o pH dessas soluções foi ajustado entre 2 e 14 . As misturas foram deixadas sob agitação por 2 h, visando atingir o equilíbrio da interação e obter a maior quantidade de analito adsorvida no polímero.

Os resultados mostraram que na faixa de pH entre 4 e 9 (Figura 29) ocorre a maior adsorção da biotina pelo MIP. Mostrando um leve aumento em pH 7, o qual foi utilizado nos experimentos posteriores.

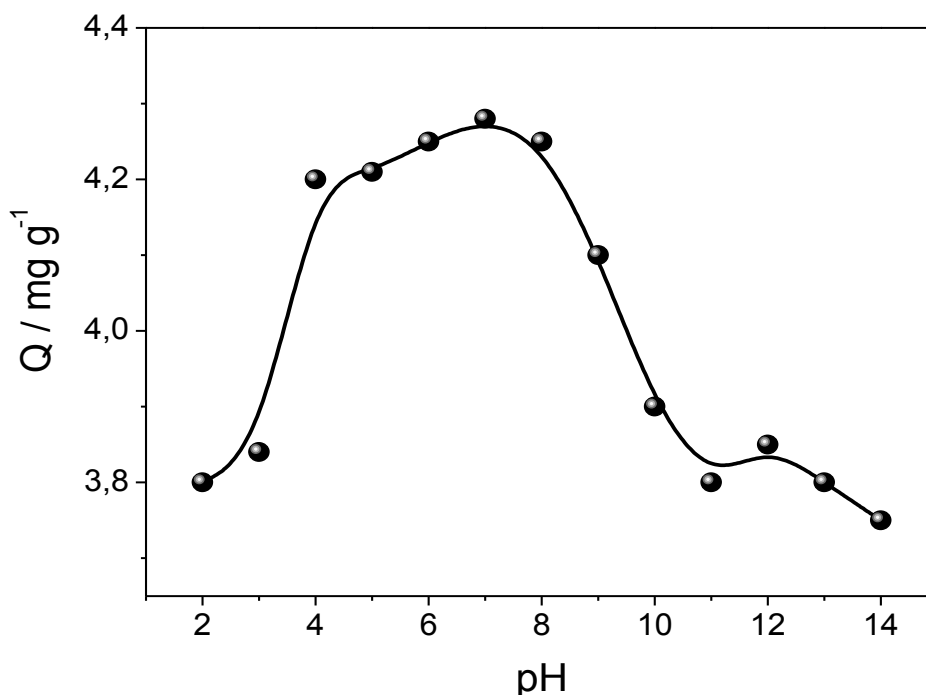


Figura 29: Efeito do pH na adsorção de biotina pelo MIP-magnético sintetizado com ácido acrílico. Temperatura: 25 °C, massa de adsorvente: 10 mg, volume de solução: 5,0 mL, tempo de contato: 2 h, concentração inicial de analito: 10 mg L⁻¹ preparado em água : metanol (1:9 v/v).

A biotina não é solúvel em água fria, por isso se dissolve melhor em água quente e em soluções alcalinas, sendo muito estável. Entretanto, a biotina é susceptível à oxidação em meio ácido do átomo de enxofre do anel tiofeno com a subsequente formação de sulfóxido de biotina e de biotina sulfonada, por esta razão, não é recomendável o uso de soluções ácidas.

Uma vez avaliado o pH, foi estudada a influência do tempo de adsorção e dessorção na capacidade de retenção do MIP-magnético (Figura 30). Neste estudo

foram usados os parâmetros até aqui otimizados; 10 mg de polímero em contato com 5,0 mL de solução padrão 10 mg L^{-1} contendo biotina a pH 7,0.

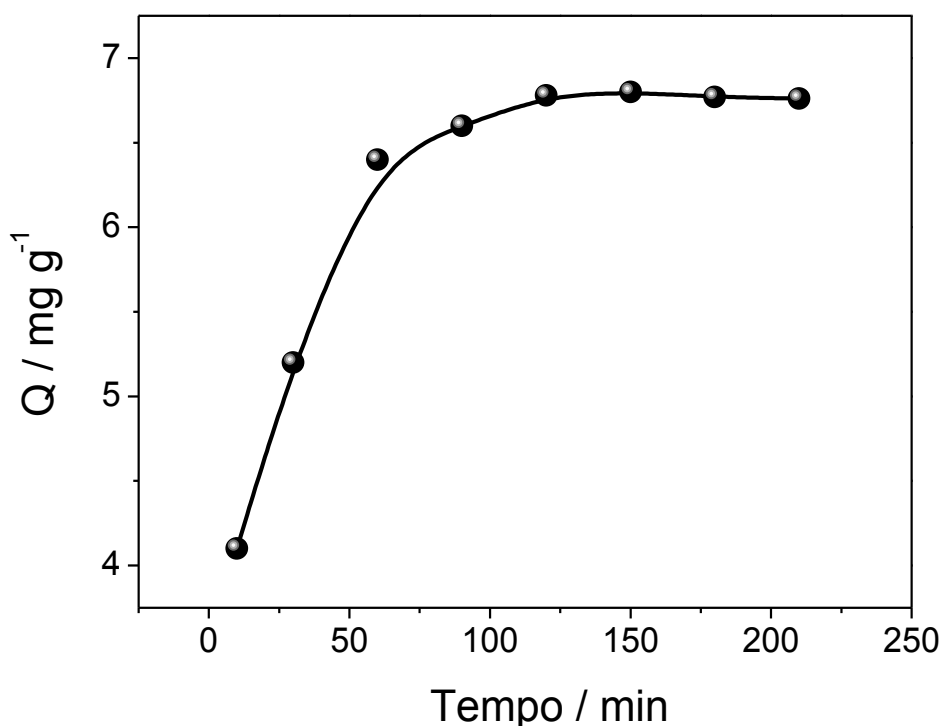


Figura 30: Efeito do tempo na adsorção de biotina pelo MIP–magnético sintetizado com ácido acrílico. Temperatura: 298 K, massa de adsorvente: 10 mg, volume de solução: 5 mL de solução padrão de biotina preparada em água:metanol (1:9, v/v; pH 7,0), concentração inicial de analito: 10 mg L^{-1} .

Os resultados mostram que a quantidade de biotina ligada ao MIP–magnético aumenta inicialmente com o tempo de extração, até atingir um máximo em 120 min, onde é obtida uma maior capacidade de retenção no MIP, mantendo-se constante após este período. Desta maneira, 120 min foi adotado como o tempo para estudo da capacidade de retenção (estudos de afinidade).

A cinética da adsorção é importante porque controla a eficiência do processo. Para investigar a cinética de adsorção da biotina no MIP, foram testados os modelos de cinética de primeira ordem e de segunda ordem. O processo de adsorção do MIP

seguindo uma cinética de segunda ordem foi confirmado com base no melhor ajuste das duas equações linearizadas, através dos coeficientes de correlação (R). Os dados cinéticos se calcularam usando as equações mediante o uso das equações 12 e 13 e estão mostrados na Tabela 7.

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (12)$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad (13)$$

Nas equações, Q_t (mg g^{-1}) representa a quantidade adsorvida de biotina no tempo t e Q_e (mg g^{-1}) em equilíbrio; k_1 (min^{-1}) e k_2 ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$) são as constantes de velocidade de primeira e pseudo-segunda ordem, respectivamente.

As constantes de velocidade de adsorção junto com a regressão linear e coeficientes de correlação se apresentam na Tabela 7.

Tabela 7. Constantes cinéticas de primeira e segunda ordem para o MIP magnético de biotina.

Cinética	Equação linear	K	Q_e (mg g^{-1})	R
Primeira ordem	$y = -0,0488X + 1,85$	0,0488	6,356	0.9292
Segunda ordem	$y = 0.142X + 1,05$	0,141	7,060	0.9990

Como pode ser observado, pelos dados da tabela acima, a cinética de segunda ordem se ajusta melhor aos dados obtidos, e que a adsorção é a etapa limitante da velocidade [90].

3.4.1 Comparação da eficácia na adsorção das magneto-MIP obtidas por mini-emulsão e por *core-shell*

Nos experimentos de religação, a concentração de biotina livre na solução (C_e) foi determinada pela interpolação dos dados na curva de calibração previamente obtida (gráfico inserido na Figura 31). Então foi possível determinar a quantidade de biotina ligada no polímero (Q) subtraindo a concentração livre de Biotina (C_e) da concentração inicial (C_i), permitindo desta forma, construir as isotermas de adsorção apresentadas na Figura 32.

Pode-se observar pelo gráfico da Figura 32 que se obteve a maior adsorção de biotina com o MIP sintetizado com ácido acrílico (AA), seguido pelo MIP preparado com 1-Vinilimidazol (1-VI) e ácido metacrílico (AM), respectivamente. Fornecendo dados coerentes com aquele previsto pela simulação computacional, a qual no geral, tem fornecido bons resultados em nosso grupo de pesquisa.

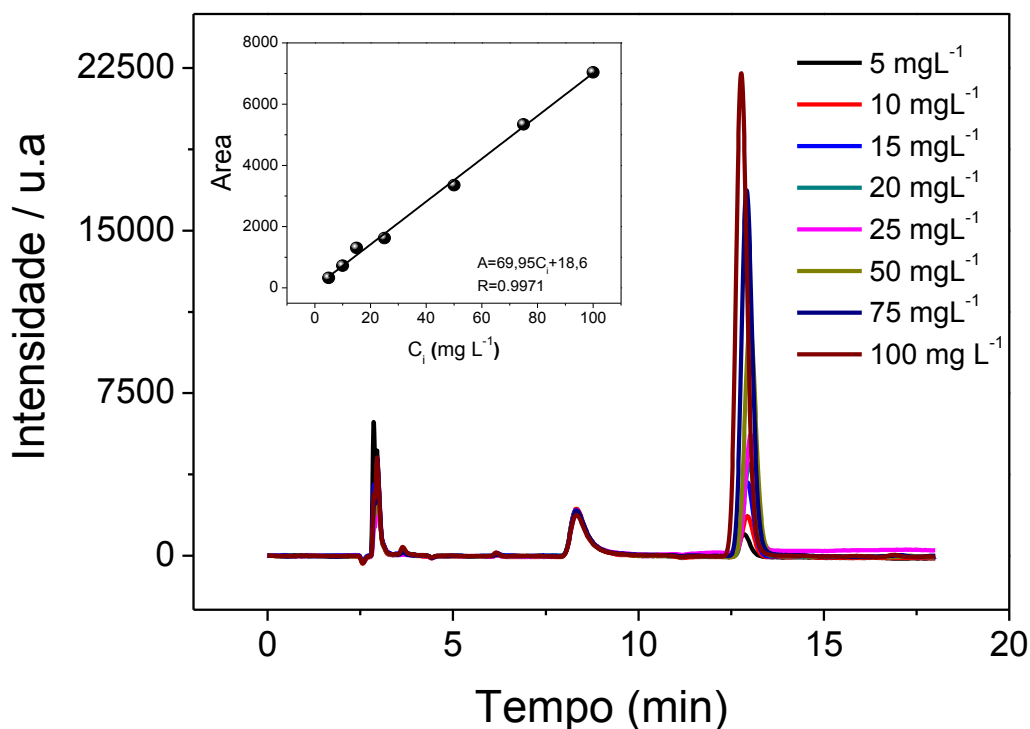


Figura 31: Cromatograma de soluções padrão de biotina. Inserido: Curva analítica na faixa de concentrações entre 5,0 e 100 mg L⁻¹ em λ de 210 nm.

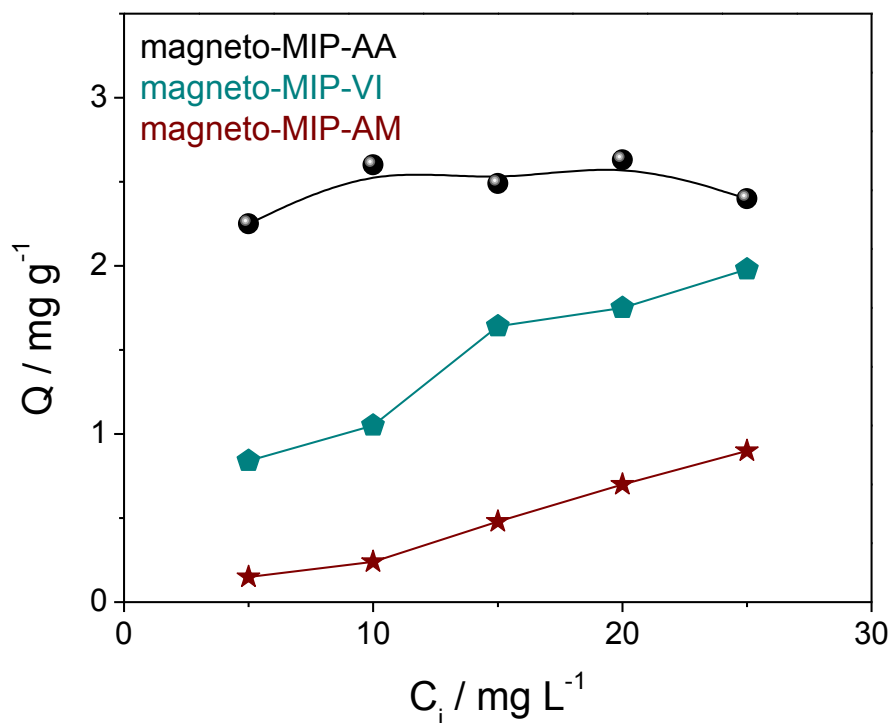


Figura 32: Construção das isotermas de adsorção para MIP utilizando os monômeros AA, 1-VI e AM, obtidos pela síntese de mini-emulsão. C_i : Concentração inicial de analito, Q : massa de biotina ligada por grama de MIP utilizado.

Quando comparado o MIP sintetizado com AA e seu correspondente NIP, pode ser observado na Figura 33 que o MIP adsorve 2,5 vezes mais que o polímero não impresso.

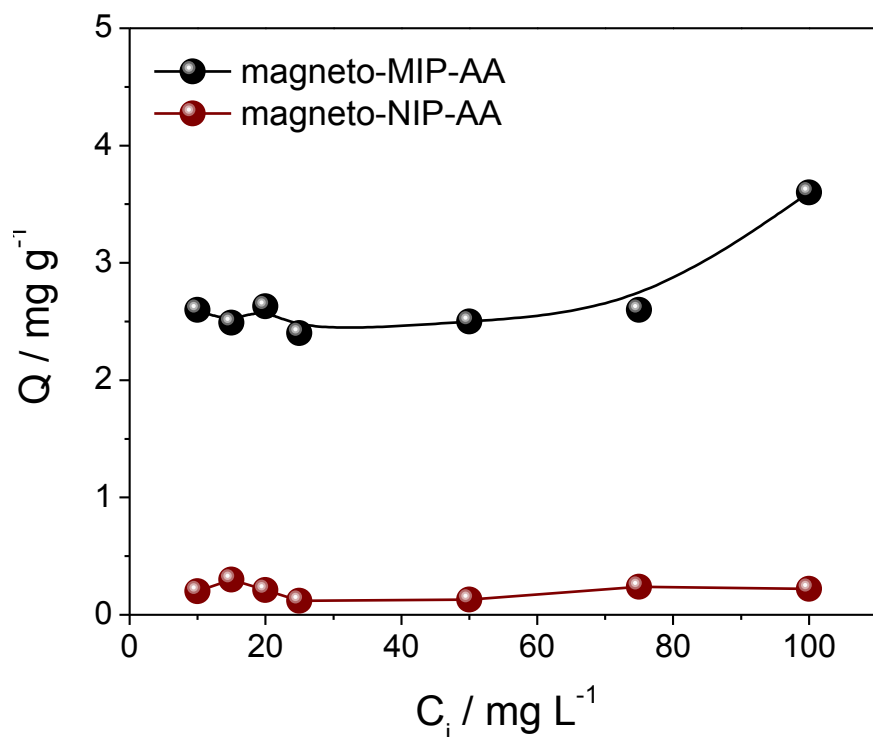


Figura 33: Isotermas de adsorção do magneto-MIP e magneto-NIP do monômero ácido acrílico obtidos por mini-emulsão. Experimentos realizados a 298 K, massa do adsorvente: 10 mg, volume de solução: 5,0 mL, tempo de contato: 2 h.

Entretanto, observou-se também que no método de síntese por mini-emulsão usada para a obtenção de magneto-MIP, a força magnética diminuiu em relação às partículas magnéticas sem modificar, como se pode verificar na Figura 34, onde se observam partículas sobrenadantes após aplicar o campo magnético da mesma força que aquele usado na Figura 26.

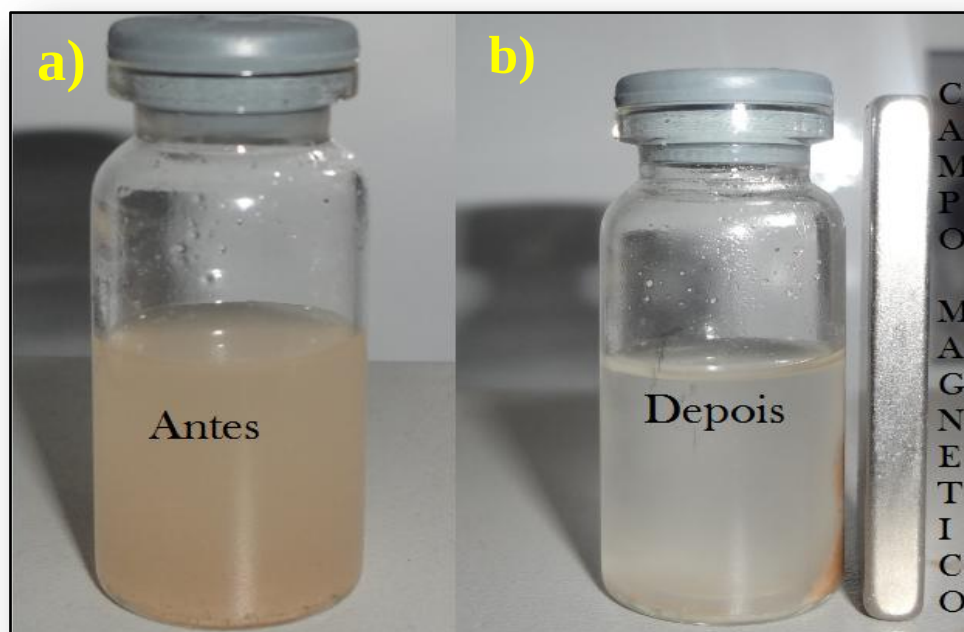


Figura 34: Eficiência das magneto-MIP sintetizadas pelo método de mini-emulsão, na presença de um campo magnético externo. (a) Antes e (b) Após aplicação de um campo magnético fornecido por um ímã de Ne.

Também foram construídas as isotermas de adsorção do MIP magnético obtido pelo método *core-shell* (Figura 35). Pode se observar, que nesta síntese o AA, apresentou os melhores resultados, tal como ocorre com as magneto-MIP sintetizadas por mini-emulsão. Fornecendo, novamente dados coerentes com aquele previsto pela simulação computacional. Adicionalmente, tal como mostrado na Figura 26 os magneto-MIP sintetizados por este método, apresentaram melhor poder de magnetização. Por esta razão, foi esta metodologia a usada em todos os estudos apresentados nesta Dissertação.

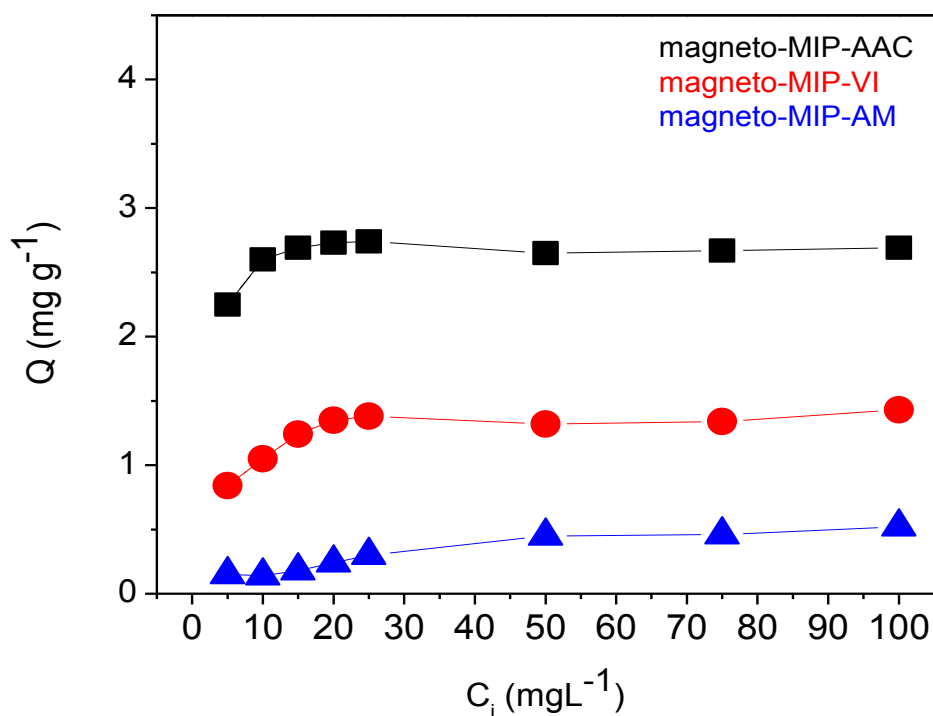


Figura 35: Isotermas de adsorção para magneto-MIP sintetizados com os monômeros ácido acrílico (AAC), 1-vinilimidazol (VI) e ácido metacrílico (AM). C_i : Concentração inicial do analito. Q: massa de biotina ligada por grama de MIP utilizado.

3.5. Estudos de seletividade do magneto-MIP

Para calcular as constantes de ligação (K_L) do polímero para biotina preparado com ácido acrílico pelo método de *core-shell* foi empregada a isoterma de adsorção, a qual foi ajustada levando-se em consideração os modelos de Langmuir e Freundlich. Adicionalmente, para fins de comparação também foram avaliadas as isotermas para os compostos químicos com estrutura análoga à biotina, a biocitina, biotina pentilaminada e (*R*)-NHS-SS-biotina e, outro composto com diferente estrutura como 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.

3.5.1. Seletividade da biotina em relação à biocitina

A biocitina (Figura 36), pela estrutura química é uma molécula que pode ser potencial interferente no reconhecimento da biotina. Esta molécula é um derivado da biotina ligada a uma cadeia peptídica proveniente de um centro de lisina ativo de enzima como exemplo a Piruvato Carboxilase. A ponte entre a biotina e lisina é um grupo amino na posição ϵ (Figura 36), e desta forma devido à porção biotinada, esta molécula apresenta-se como um interferente em potencial no MIP sintetizado [93].

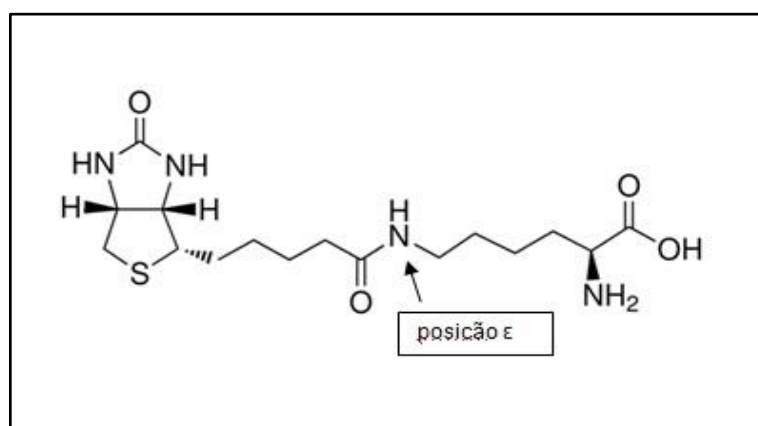


Figura 36: Estrutura química da biocitina, análogo estrutural da biotina.

Estes experimentos foram realizados nas mesmas condições experimentais dos experimentos de religação, porém utilizando-se 10 mg de polímero em contato com 2,5 mL de biotina e 2,5 mL de biocitina na concentração de 10 mg L⁻¹. A Figura 37 mostra os cromatogramas obtidos com uma mistura de biotina e biocitina na faixa de 5 mg L⁻¹ a 100 mg L⁻¹.

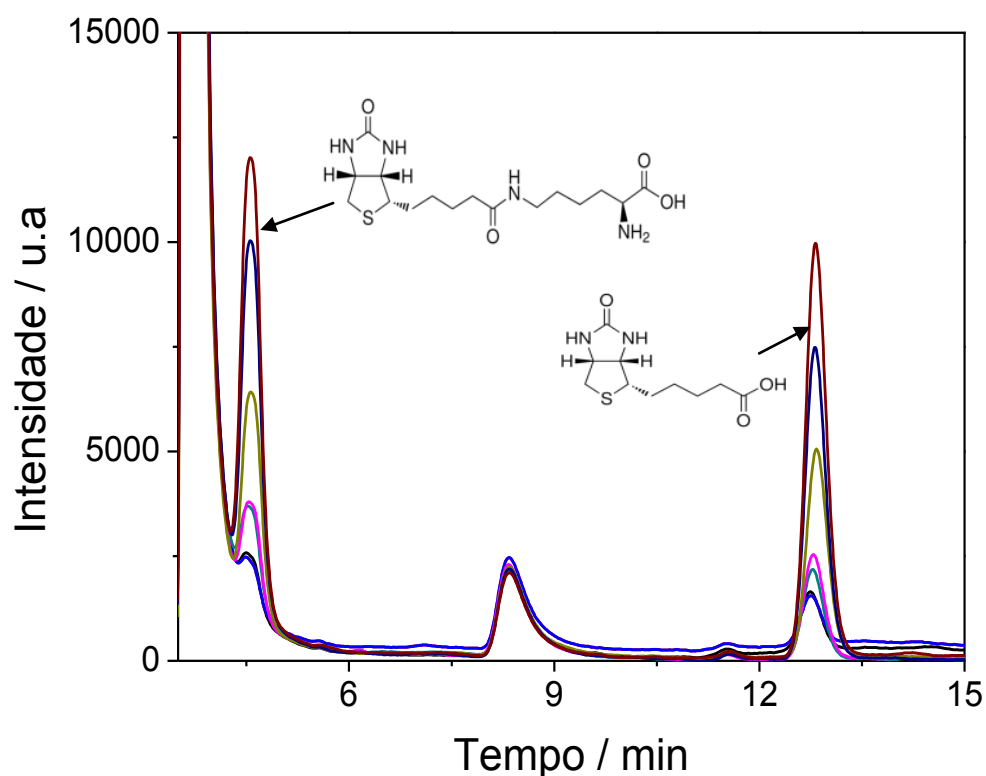


Figura 37: Cromatograma da biotina e biocitina. Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄ : metanol (80:20, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para Biotina 13 min e Biocitina 4,5 min.

A seletividade da biotina frente à biocitina foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 8. Os resultados indicaram que o MIP apresentou maior capacidade de adsorção para a biotina, como consequência da existência de nanocavidades seletivas com tamanho, forma e tipo de interações específicas. Tal como esperado e proposto nos objetivos deste trabalho.

Tabela 8: Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para biotina e biocitina

Polímero	K_p (mL g ⁻¹)		α	I_{Biotina}	$I_{\text{Biocitina}}$	S
	Biotina	Biocitina				
MIP	1152,8	480,38	2,399	1,68	0,88	1,9
NIP	684,6	541,07	1,265			

K_p: constante de partição; α : fator de separação; I: fator de impressão e S: seletividade

Os parâmetros relacionados ao efeito de impressão estão estudados na pag. 45-46 da teses .Também se calcularam-se as constantes de ligação (K_A para modelo de Langmuir e K_f para o modelo de Freundlich) do polímero para biotina comparando-as com a biocitina, empregando as isoterma de adsorção da Figura 38, a qual foi ajustada levando-se em consideração os modelos de Langmuir e Freundlich.

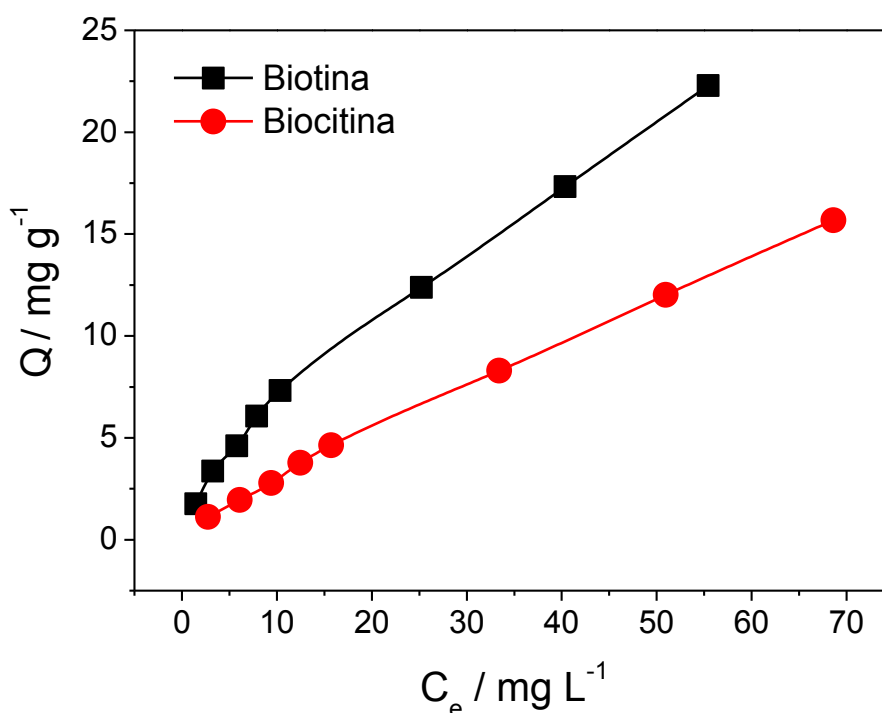


Figura 38: Isotermas de adsorção para MIP para biotina, em soluções de concentração conhecidas de biotina e de biocitina.

Seguindo o modelo de Langmuir, as curvas foram linearizadas usando a equação (8) da pag. 49. Assim, foi possível determinar as constantes de Langmuir, mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da análise do ajuste de Langmuir para a biotina e a biocitina.

Analito	Local de ligação	Ajuste Langmuir	R	K_A (mL g ⁻¹)	Q_{max} (mg g ⁻¹)
Biotina	Baixa afinidade ^A	$C_e / Q = 0,064C_e + 0,7936$	0,9327	0,080	15,63
	Alta afinidade^B	$C_e / Q = 0,0148C_e + 1.6868$	0,9708	0,0088	67,56
Biocitina	Alta afinidade ^C	$C_e / Q = 0,1406C_e + 2,1248$	0,9423	0,066	7,112
	Baixa afinidade ^D	$C_e / Q = 0,0198C_e + 3,1506$	0,9122	0,0038	83,3

Faixa de concentração considerada: ^A < 0,0061– 0,0323 mmol L⁻¹>; ^B < 0.0424 – 0,227 mmol L⁻¹>; ^C < 0,0074 – 0,0253 mmol L⁻¹> e ^D < 0,0335 – 0.184 mmol L⁻¹>.

Na linearização da isoterma pelo modelo de Langmuir, existem duas regiões distintas que se podem ajustar a duas linhas retas, o que indica que os locais de ligação podem ser agrupados em dois grupos distintos com propriedades de ligação específicas: Locais de alta afinidade (AA) e locais de baixa afinidade (BA), classificados de acordo a seu linearidade R.

Os respectivos valores de K_A e Q_{max} de cada região estão especificados na Tabela 8 e pode ser observado claramente que o R que foi mais proxima a uma reta e para biotina onde Q_{max} é 67,56 mg g⁻¹, para biocitina deu um maior Q mas não é muito confiável devido a que seu R foi mais distante de 1.

Pode-se observar que o ajuste 'linear' aplicando o modelo de Langmuir não foi bem sucedido uma vez que os coeficientes de correlação linear não foram satisfatórios, sendo o maior de 0,9708. Desta forma, o modelo de Freundlich foi avaliado para ajuste da isoterma experimentalmente obtida.

Desta forma, os resultados apresentados na Figura 39 foram ajustados utilizando o modelo de Freundlich linearizado, seguindo a equação (10) da pag 49 . Construídos os gráficos apresentados nas Figuras 39, obter seu ajuste, e deste modo determinar as constantes de Freundlich, mostradas na Tabela 10.

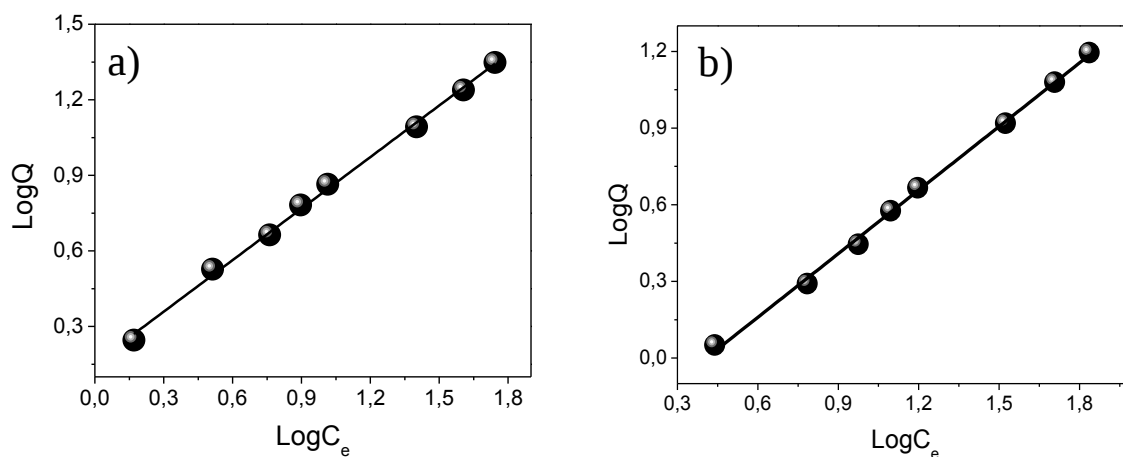


Figura 39: Isotermas de Freundlich linearizadas usadas para estimar as características de ligação do MIP–biotina, na presença de seu *template* (a) e de seu possível interferente, a biocitina (b).

Pode-se observar na Figura 40 que os ajustes de Freundlich apresentam uma simples linha reta, onde podemos observar na Tabela 10 que a constante máxima de adsorção é 1,46 mL g⁻¹, para a biotina.

Tabela 10. Resultados da análise do ajuste de Freundlich para biotina e biocitina.

Analito	Ajuste Freundlich	R	$K_f / \text{mL g}^{-1}$
Biotina ^A	$\log Q = 0,682 \log C_e + 0,1542$	0,997	1,46
Biocitina ^B	$\log Q = 0,8296 \log C_e - 0,3381$	0,998	0,46

Faixa de concentração considerada: ^A < 0,0061– 0,227 mmol L⁻¹>; ^B < 0,0074 – 0.184 mmol L⁻¹>.

Desta forma, devido aos valores de R no ajuste linear do modelo ser muito próximos da unidade, os valores de K_f obtidos correspondem a um valor mais confiável que aqueles obtidos pelo modelo de Langmuir linearizado. Sugerindo que o modelo que ajustou melhor às isotermas para biotina foi o de Freundlich.

3.5.2. Seletividade da biotina em relação à biotina-pentilaminada

A biotina-pentilaminada (Figura 40), é um composto formado pela modificação da cadeia lateral de ácido valérico na biotina, com pentano-1,5-diamina. O composto contém uma amina primária do terminal ($-NH_2$), o que proporciona um grupo funcional disponível para a derivatização ou conjugação da biotina com proteínas, superfícies e outras moléculas [94].

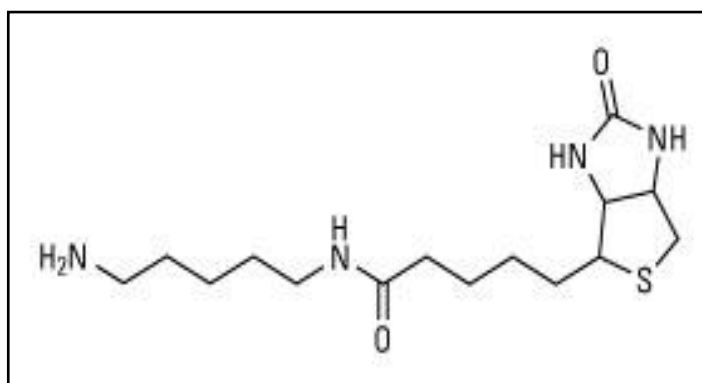


Figura 40: Estrutura química da biotina-pentilaminada utilizada como análogo estrutural no estudo de seletividade do magneto-MIP-biotina-AA e de seu respectivo NIP.

Para avaliação da seletividade da biotina em relação à biotina-pentilaminada, utilizou-se o mesmo procedimento usado no caso anterior com a

biotina, por se tratar de moléculas com estrutura muito parecidas. A Figura 41 mostra o cromatograma obtido com uma mistura de soluções padrão de biotina e biotina-pentilaminada na faixa de concentrações entre 5 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹.

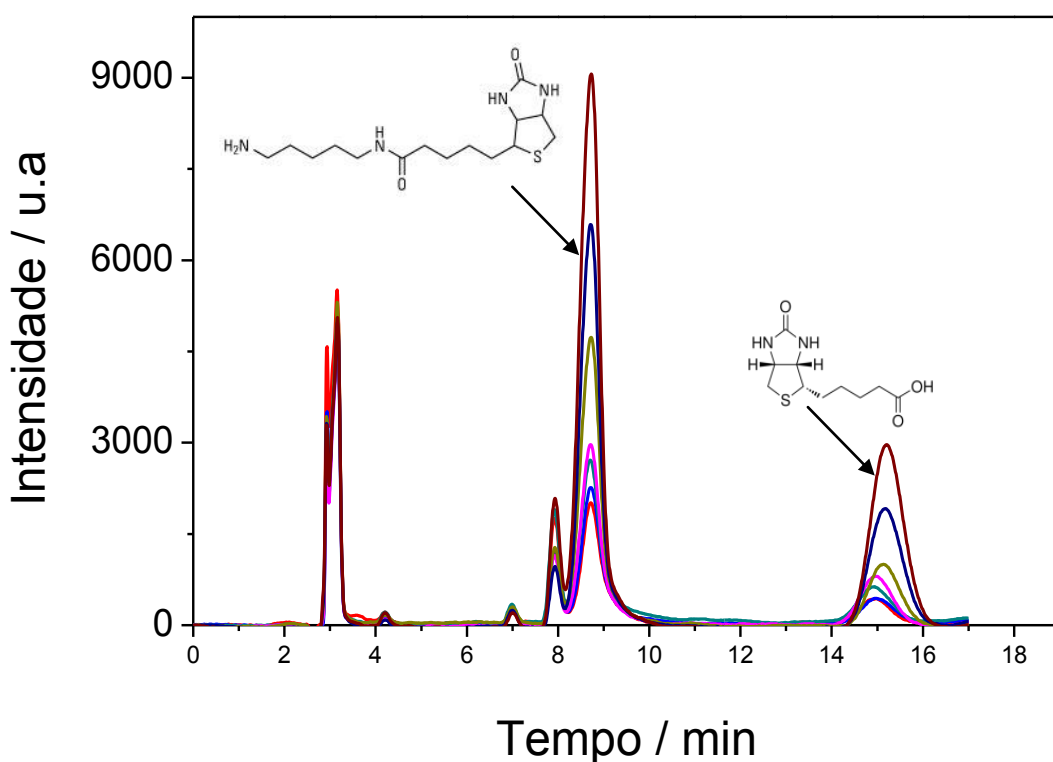


Figura 41: Cromatograma da biotina e biotina-pentilaminada. Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄ : metanol (80:20, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para biotina 15 min e biotina-pentilaminada 9 min.

A seletividade da biotina frente à biotina-pentilaminada foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 10. Os resultados indicaram que o MIP apresentou ligeiramente uma capacidade maior de adsorção para a biotina que a biotina-pentilaminada.

Tabela 11: Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para biotina e biotina-pentilaminada

Polímero	$K_p / \text{mL g}^{-1}$		α	I_{biotina}	$I_{\text{biotina-pent}}$	S
	Biotina	Biotina-pent				
MIP	323,5	127	2,54	1,026	0,99	1,04
NIP	315	128,2	2,45			

3.5.3. Seletividade da biotina em relação à NHS-SS-biotina

A molécula NHS-SS-biotina (Figura 42) de nome químico succinimidil 2-(biotinamido)-etil-1,3-ditiopropionato, é um composto que permite a biotinyzação simples e eficiente de anticorpos, proteínas e outras moléculas contendo aminos primárias. O braço espaçador estendido (24,3 angstroms) deste reagente reduz o impedimento espacial associado com a ligação à avidina, ou a outras proteínas ligadas à biotina, e incorpora uma ligação dissulfeto (-SS-) dentro do separador, proporcionando maior versatilidade ao reagente [95].

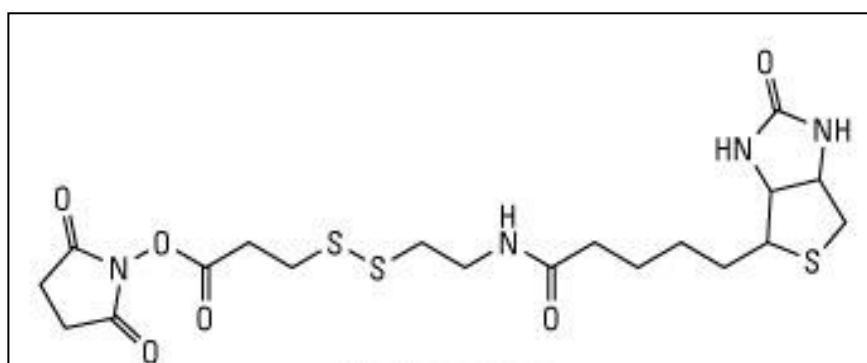


Figura 42: Estrutura química da NHS-SS-biotina, um análogo estrutural da biotina.

Neste caso utilizou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.4.1. A Figura 43 mostra os cromatogramas obtidos com uma mistura de soluções padrão de biotina e NHS-SS-biotina, na faixa de concentrações entre 5 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹.

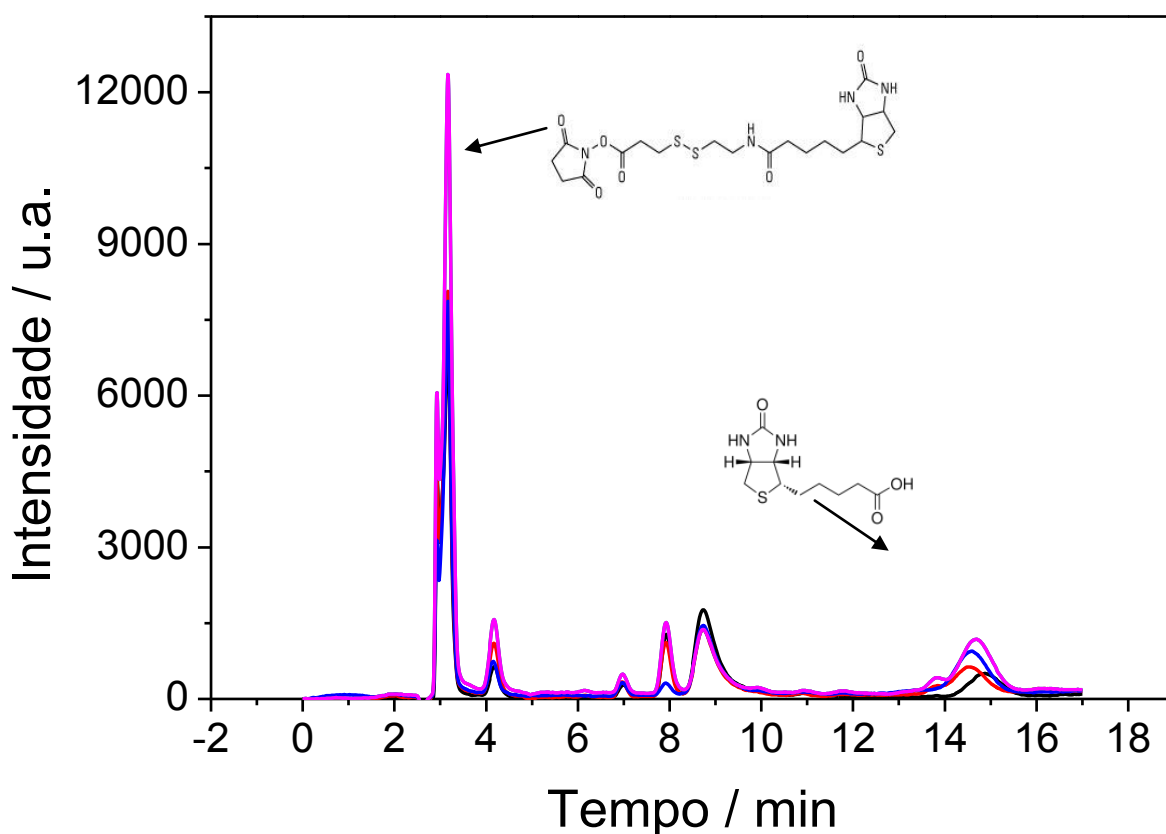


Figura 43: Cromatograma da biotina e NHS-SS-biotina. Medidas realizadas em fase móvel composta por 25 mmol L⁻¹ de Na₂H₂PO₄ : metanol (80:20, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 210 nm em tempo de retenção para biotina de 15 min e NHS-SS-biotina de 3 min.

A seletividade da biotina frente à NHS-SS-biotina foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 12. Os resultados indicaram que o MIP apresentou maior capacidade de adsorção para a biotina.

Tabela 12: Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para biotina e NHS-SS-biotina.

Polímero	$K_p / \text{mL g}^{-1}$		α	I_{biotina}	$I_{\text{NHS-SS-biotina}}$	S
	Biotina	NHS-SS-biotina				
MIP	280,5	185	1,52	1,06	0,75	1,41
NIP	264	245,3	1,076			

Dos resultados mostrados nas tabelas anteriores para os compostos análogos à biotina, o valor da seletividade (S) de aproximadamente 1 sugere que o MIP sintetizado possui relativamente a mesma afinidade para a biotina e para seus análogos. Mostrando que possivelmente a biotina se encaixe no MIP através do anel bicíclico, e que a variação da estrutura química das cadeias alifáticas influenciam pouco na interação com o MIP. Este resultado é promissor, para a futura aplicação deste MIP em imunoenaios, uma vez que neste caso poderão ser usadas moléculas biológicas biotiniladas, que poderão se encaixar diretamente na cavidade para biotina no MIP sem afetar sua seletividade inicial.

3.5.4. Seletividade da biotina em relação ao 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

O composto 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (Figura 44), um conhecido poluente ambiental, que possui um anel benzênico, dois grupos nitro ($-\text{NO}_2$) e um átomo de cloro ($-\text{Cl}$) tornando a molécula muito reativa e tóxica.

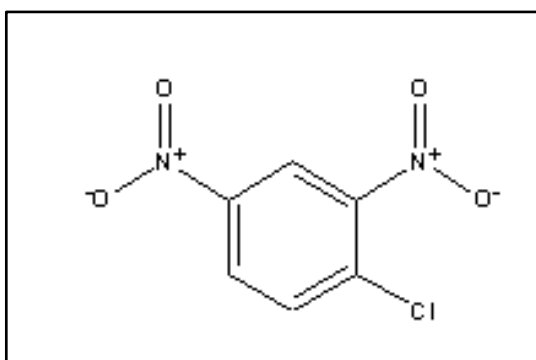


Figura 44: Estrutura química do 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDBN) utilizada no estudo de seletividade do magneto-MIP-biotina-AA e de seu respectivo NIP.

Neste caso, utilizaram-se os mesmos procedimentos já explicados anteriormente. Neste caso, por se tratar de moléculas diferentes, as curvas analíticas, assim como a quantificação da biotina e o interferente nas amostras, foram obtidas por separado. A Figura 45 mostra os cromatogramas de soluções padrão de CDBN na faixa de 5 mg L^{-1} a 50 mg L^{-1}

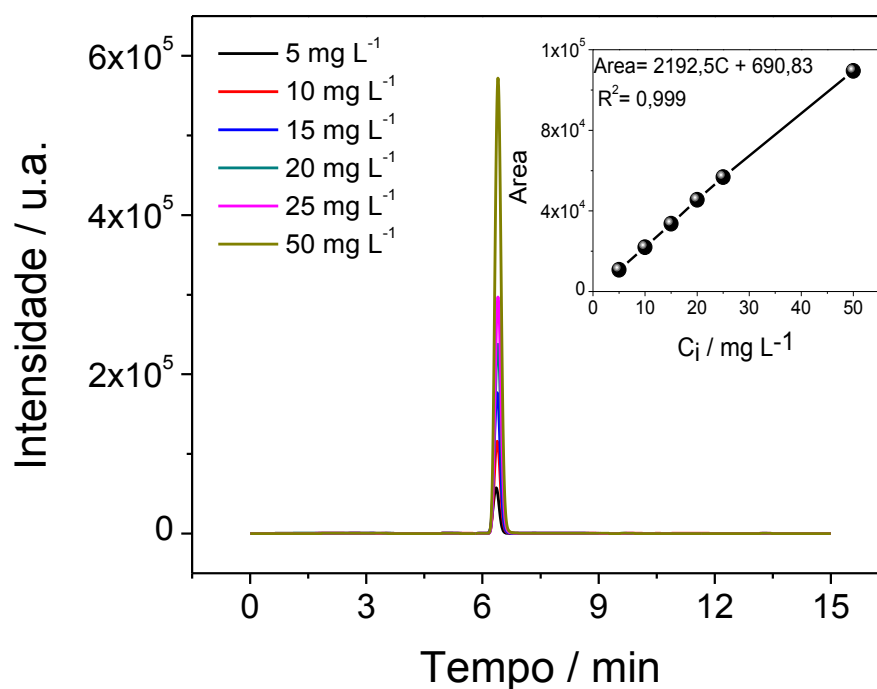


Figura 45: Cromatograma do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno. Medidas realizadas em fase móvel composta por água : metanol (30:70, v/v) usando coluna Luna C18 (5 µm, 250×4,60 mm) da Phenomenex®, e fluxo de 1 mL min⁻¹ a temperatura ambiente (25 °C), usando detecção UV em 260 nm em tempo de retenção 6,5 min.

A seletividade da biotina frente à 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela 13. Os resultados indicaram que o MIP apresentou realmente maior capacidade de adsorção para a biotina, tal como esperado, uma vez que o CDBN possui uma estrutura completamente diferente à biotina e suas interações com a cavidade seletiva ao MIP, é menos provável. Mostrando que o MIP sintetizado apresenta alta seletividade.

Tabela 13: Parâmetros relacionados ao efeito de impressão para biotina e CDBN.

Polímero	$K_p / \text{mL g}^{-1}$		α	I_{biotina}	I_{CDBN}	S
	Biotina	CDBN				
MIP	241	3,8	63,42	0,95	0,19	5
NIP	253	20	12,65			

3.6. Aplicação do MIP magnético de biotina como material adsorvente para detecção de leite

Finalmente, visto que a aplicação mais comum para os MIP é como material adsorvente, o magneto-MIP sintetizado foi avaliado em amostras de leite cru, leite desnatado e leite em pó.

Para isto, 10 mg de MIP magnético limpo e seco foram colocados em um frasco 10 mL de capacidade. A seguir, foram adicionados 5,0 mL da amostra de leite enriquecida com 10 mg L⁻¹ de biotina e deixou-se agitando 2 h, usando um agitador do tipo Noria®, para promover a completa adsorção do analito no MIP. Passado este tempo, as partículas magnéticas foram separadas da solução por um ímã de neodímio e o sobrenadante foi filtrado em membrana Milipore® 0,45 µm, e analisado por HPLC a 210 nm (Figura 46). Para avaliar quanto tinha ficado de remanescente na solução. A seguir, o magneto-MIP adsorvido com biotina foi colocado em 5 mL de metanol por 3 horas em agitação para extrair a biotina, e analisado pela cromatografia, tal como descrito anteriormente.

Na Figura 47 é mostrada a curva analítica para biotina usada neste estudo. A faixa de concentração da biotina foi de 5 – 100 mg L⁻¹ e o ajuste apresentou um valor de coeficiente de correlação de 0,998, com limites de detecção (LOD = 3 SD_{Branco} / inclinação da reta) e de quantificação (LOQ = 10 SD_{Branco} / inclinação da reta) determinados de acordo com as recomendações da IUPAC [96], de 4,32 x 10⁻⁶ mg L⁻¹ e 13,12 x 10⁻⁶ mg L⁻¹.

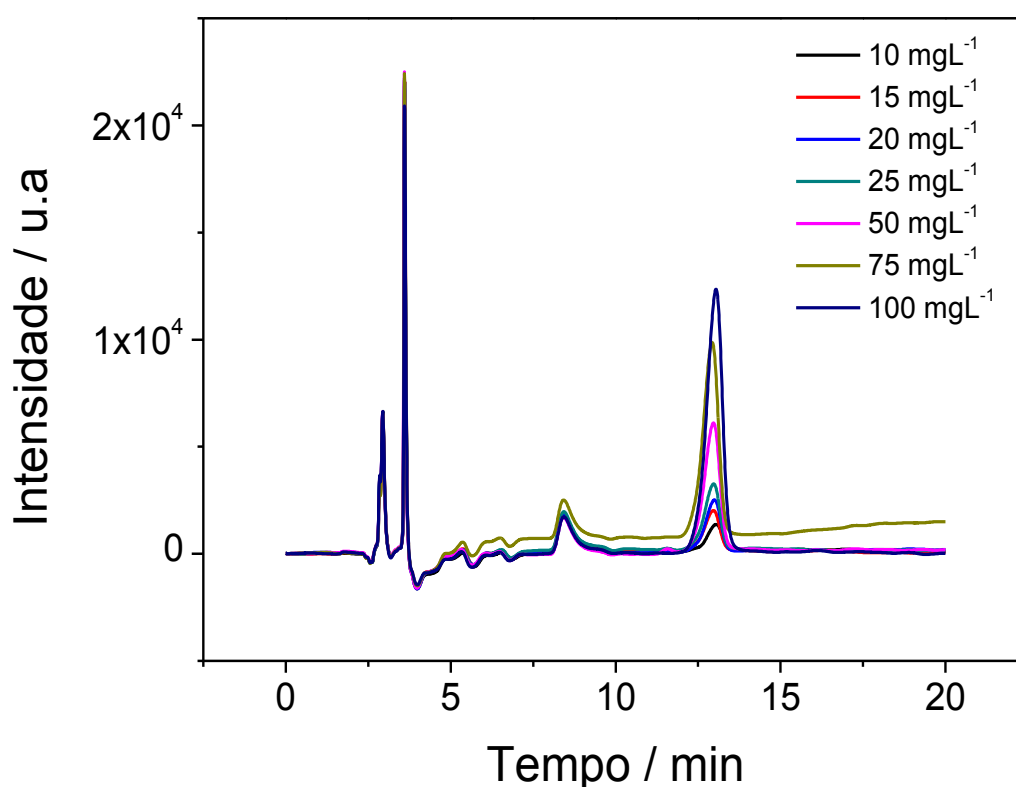


Figura 46. Cromatogramas obtidos para padrões de biotina, tal como descrito na parte experimental.

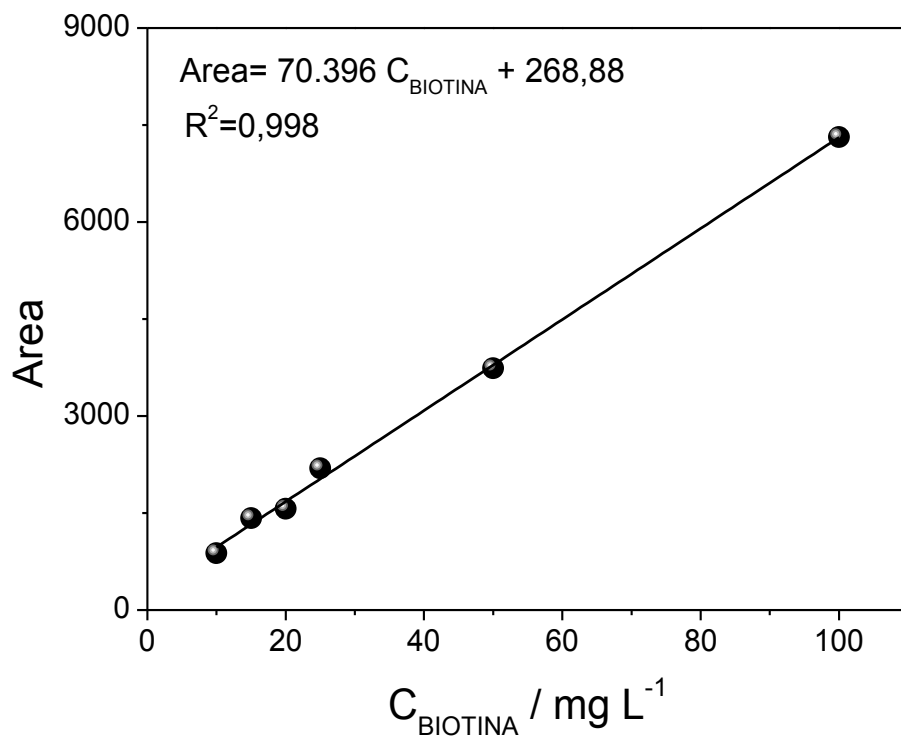


Figura 47. Curva de calibração para a Biotina obtida com os dados da Figura 46.

Nos cromatogramas das Figuras 48 a 50 apresentam-se os cromatogramas obtidos nas amostras provenientes de leite cru, em pó e desnatada.

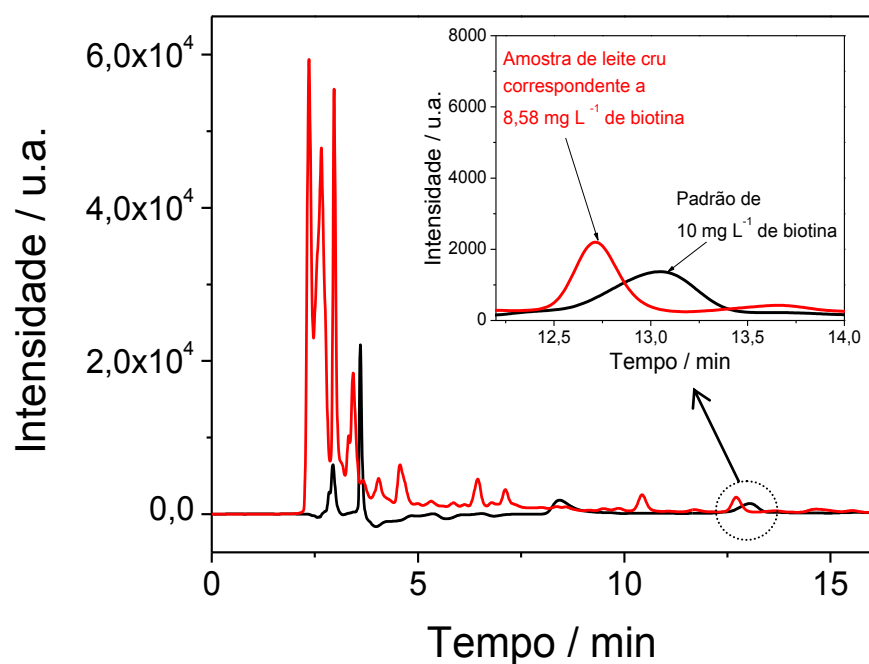


Figura 48. Cromatogramas comparativos para um padrão de 10 mg L^{-1} de biotina e o cromatograma resultante da aplicação do MIP magnético de biotina como material adsorvente de leite de vaca cru após de 2 h de adsorsão .

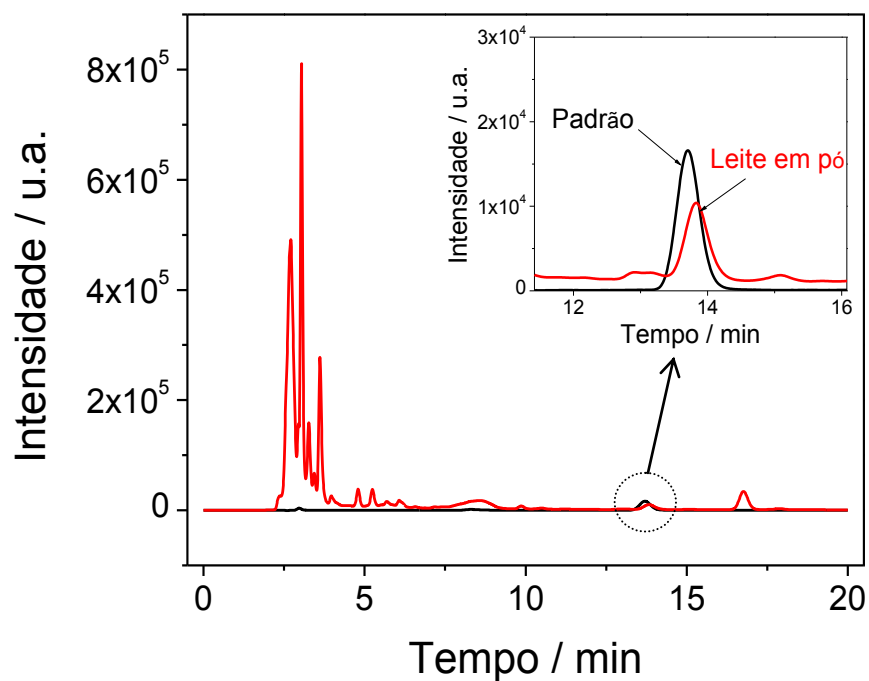


Figura 49. Cromatogramas comparativos para um padrão de 10 mg L^{-1} de biotina e o cromatograma resultante da aplicação do MIP magnético de biotina em amostra de leite em pó pre-concentrada 10 vezes.

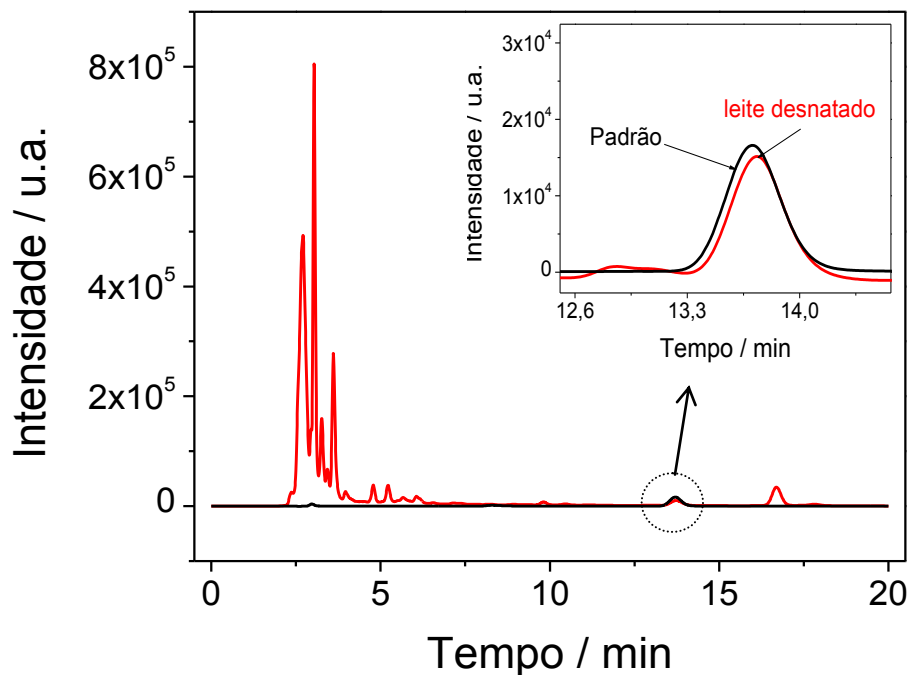


Figura 50. Cromatogramas comparativos para um padrão de 10 mg L^{-1} de biotina e o cromatograma resultante da aplicação do MIP magnético de biotina em amostra de leite desnatado pre-concentrada 10 vezes.

A amostra de leite desnatado foi a que apresentou melhor recuperação, pois tem baixo teor $< 1\%$ de gorduras. As outras amostras de leite analisadas, como por exemplo, o leite em pó apenas possui baixo teor em umidade, e o leite cru é a que tem maior quantidade de gorduras e proteínas como se mostra na Tabela 14 [97].

Tabela 14 Composição química da leite cru.

Constituinte (g Kg⁻¹)	Leite Crú
Água	873
Gorduras	39,0
Proteína	32,5
Lactose	46,0
Substâncias minerais	6,5
Ácidos orgânicos	1,8
Outros	1,4

Na Tabela 15 pode-se verificar que a recuperação foi satisfatória, e em média de 87,4%, mostrando que o MIP-magnético para biotina é um material promissor.

Tabela 15. Recuperação da biotina para amostras de leite contendo 10 mg L⁻¹.

Amostra	Biotina medida	Recuperação (%)
Leite em pó	7,7 ± 1,5	77,4%
Leite de vaca cru	8,3 ± 0,3	82,9%
Leite desnatado	10,2 ± 0,2	101,8%

CAPÍTULO 4

4- CONCLUSÕES

- 4.1. Verificou-se que a simulação computacional foi útil para produção dos MIP, uma vez que dentre os monômeros usados na síntese, o ácido acrílico permitiu obter os melhores MIP, o qual foi verificado através dos resultados dos experimentos de religação.
- 4.2. Os magneto-MIP para biotina, sintetizados e devidamente caracterizados, apresentaram várias vantagens em relação aos magneto-NIP e aos polímeros impressos tradicionais, dentre elas uma maior área superficial e alta seletividade em relação a outros compostos com estrutura diferente. Ressaltando que, no caso de moléculas com estrutura análoga os valores de seletividade estiveram entre 1 e 1,9. O que no lugar de ser um problema, na realidade é uma grande vantagem uma vez que moléculas biológicas biotiniladas também poderão ser analisadas sem perda de seletividade. Isto, permitirá que estes magneto-MIP possam ser aplicados em imuno-ensaios, ou no desenvolvimento de novos imuno- e genossensores.
- 4.3. Os magneto-MIP foram satisfatoriamente aplicados na extração de biotina em leite de diferentes qualidades, com uma recuperação média de 87,4%, mostrando seu potencial de aplicação em amostras altamente complexas como leite cru.

REFERÊNCIAS

- 1 RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 1076-1082, 2004.
- 2 VLATAKIS, G.; ANDERSSON, L. I.; MULLER, R. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. **Nature**, v. 361, p. 645-647, 1993.
- 3 PILETSKA, E.V.; GUERRA, M. R.; CHIANELLA, I.; KARIM, K.; TURNER, A. P. F.; PILETSKY, S. A. Towards the development of multisensor for drugs of abuse based on molecular imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 1, p. 111-117, 2005.
- 4 WANG, B.; WANG, Y. Z.; YANG, H.; WANG, J. Q.; DENG, A. P. Preparation and characterization of molecularly imprinted microspheres for selective extraction of trace melamine from milk samples. **Microchimica Acta**, v. 174, n. 1, p. 191-199, 2011.
- 5 YU, J.; ZHANG, C.; DAI, P.; GE, S. Highly selective molecular recognition and high throughput detection of melamine based on molecularly imprinted sol-gel film. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, n. 2, p. 209-214, 2009.
- 6 RIDVAN, S.; EBRU, B.; ARZU, E.; FILIZ, Y.; G. TEVFIK, G.; ADIL, D. Preconcentration of copper on ion-selective imprinted polymer microbeads. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, n. 2, p. 251-258, 2003.
- 7 YAO, J.; LI, X.; QIN, W. Computational design and synthesis of molecular imprinted polymers with high selectivity for removal of aniline from contaminated water. **Analytica Chimica Acta**, v. 610, n. 2, p. 282-288, 2008.
- 8 PILETSKA, E. V.; GUERREIRO, A. R.; ROMERO-GUERRA, M.; CHIANELLA, I.; TURNER, A. P. F. Design of molecular imprinted polymers compatible with aqueous environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, n. 1, p. 54-60, 2008.
- 9 SELLEGREN, B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 1578-1582, 1994.
- 10 MAYES, G.; KLAUS, M. Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 21, p. 3769-3774, 1996.
- 11 LEIF, S.; ANDERSSON, I. L.; STAFFAN, N. Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 1179-1183, 1997.

- 12 SERGEYEVA, T. A.; PILETSKY, S. A.; BROVKO, A. A.; SLINCHENKO, E. A.; SERGEEVA, L. M.; EL'SKAYA, A.V. Selectivite recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer menbranes. Development oof conductometric sensor for herbicides detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 392, p. 105-111, 1999.
- 13 LIN, J. M.; YAMADA, M. Chemiluminescent reaction of fluorescent organic compounds with KHSO_5 using cobalt (II) as catalyst and its first application to molecular imprinting . **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1148-1555, 2000.
- 14 XIE, C. G.; LIU, B. H.; WANG, Z. Y.; GAO, D. M.; GUAN, G. J.; ZHANG, Z. P. Molecular imprinting at walls of silica nanotubes for TNT recognition. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 437-443, 2008.
- 15 LU, F.; ZHOU, W.; SUN, M.; FAN, L.; QIU, H.; LI, X.; LUO, C. Flow injection chemiluminescence sensor based on core-shell magnetic molecularly imprinted nanoparticles for determination of sulfadiazine. **Analytica Chimica Acta**, v. 718, n. 2, p. 84-91, 2012.
- 16 LU, C. H.; ZHOU, W. H.; HAN, B.; YANG, H. H.; CHEN, X.; WANG, X. R. Surface imprinted core-shell nanoparticles for sorbent assays. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 14, p. 5457-5461, 2007.
- 17 CHANG, L. M.; LI, Y.; CHU, J.; QI, J. Y.; LI, X. Preparation of core-shell molecularly imprinted polymer via the combination of reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization and click reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 680, n. 1, p. 65-71, 2010.
- 18 YANG, H. H.; ZHANG, S. Q.; TAN, F.; ZHUANG, Z. X.; WANG, X. R. Surface molecularly imprinted nanowires for biorecognition. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 1378-1379, 2005.
- 19 CHEN, L. X.; XUA, S. F.; LI, J. H. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2922-2942, 2011.
- 20 XU, S. F.; LI, J. H.; CHEN, L. X. Molecularly imprinted core-shell nanoparticles for determination of trace atrazine by reversible addition-fragmentation chain transfer surface imprinting. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 4346-4351, 2011.
- 21 XIE, C. G.; LIU, B. H.; WANG, Z. Y.; GAO, D. M.; GUAN, G. J.; ZHANG, Z. P. Molecular imprinting at walls of silica nanotubes for TNT recognition. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 437-443, 2008.
- 22 YAO, N.; CHEN, H.; LIN, H.; DENG, C.; ZHANG, X. Enrichment of peptides in serum by C_8 -functionalized magnetic nanoparticles for direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 1, p. 93-101, 2008.

- 23 KAN, X. W.; ZHAO, Q.; SHAO, D. L.; GENG, Z. R.; WANG, Z. L.; ZHU, J. J. Preparation and recognition properties of bovine hemoglobin magnetic molecularly imprinted polymers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 3999-4004, 2010.
- 24 SIZER, F.; WHITNEY, E. **Nutrição: conceitos e controvérsias**. 8. ed. Barueri: Manole, 2003. 211 p.
- 25 BITSCH, R.; SALZ, I.; HOETZEL, D. Biotin assessment in foods and body fluids by a protein binding assay. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 59, p. 59-64, 1986.
- 26 BONJOUR, J. P. Biotin in human nutrition. MACHLIN, L. J. (Ed.). **Handbook of vitamins**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1991. 427 p.
- 27 YE, L.; EITENMILLER, R. R.; LANDEN, W. O. **Vitamin analysis for the health and food sciences**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 638 p.
- 28 BAKER, H.; FRANK, O.; MATOVITCH, V. B. A new assay method for biotin in blood, serum, urine and tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 3, p. 31-39, 1962.
- 29 FIDANZA, F. **Nutritional status assessment: a manual for population studies**. London: Chapman and Hall, 1991. 349 p.
- 30 GREEN, N. M. Spectrophotometric determination of avidin and biotin. **Methods in Enzymology**, v. 18, p. 418-424, 1970.
- 31 GUILARTE, T. Measurement of biotin levels in human plasma using a radiometric-microbiological assay. **Nutrition Reports International**, v. 31, p. 1155-1163, 1985.
- 32 HEWISH, D. R.; SHUKLA, K. H.; GOUGH, K. H. The use of biotin-conjugated antisera in immunoassays for plant viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 13, n. 1, p. 79-85, 1986.
- 33 AQUINO, E.; PRIETO, F.; GALÁN, C.; GONZÁLEZ, C.; BARRADO, E.; MEDINA, J. Síntesis y caracterización de ferritas de Cd, Pb y Mn vía hidroquímica. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, v. 1, p. 1-13, 2010.
- 34 MURBE, J.; RECHTENBACH, A.; TÖPFER, J. Synthesis and physical characterization of magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 110, n. 2, p. 426-433, 2008.
- 35 CASTRILLÓN GARCÍA, M. **Síntesis de nanopartículas magnéticas y su aplicación en nanocompuestos de matriz polimérica con propiedades magnéticas**. 2012. 279 f. Tesis (Doctoral) - Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2012.
- 36 KIM, E. H.; AHN, Y.; LEE, H. S. Biomedical applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated within Chitosan. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 434, p. 633-636, 2007.

- 37 ARIAS, J.; LOPEZ-VIOTA, M.; RUIZ, M. Partículas superparamagnético ultrapequeñas de óxido de hierro para aplicaciones biomédicas. **Ars Pharmaceutica**, v. 49, n. 2, p. 101-111, 2008.
- 38 LI, X.; LI, X.; LIU, G.; DENG, Z.; WU, S.; LI, P.; XU, Z.; XU, H.; CHU, K. Magnetite-loaded fluorine-containing polymeric micelles for magnetic resonance imaging and drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 10, p. 3013-3024, 2012.
- 39 HE, J.; HUANG, M.; WANG, W.; ZANG, Z.; LI, G. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2014. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.017.
- 40 LEE, E.-H.; KIM, C.-Y.; CHOA, Y.-H. Magnetite nanoparticles dispersed within nanoporous aerogels for hyperthermia application. **Current Applied Physics**, v. 12, p. S47-S52, 2012.
- 41 JIANG, T.; ZHAO, L.; CHU, B.; FENG, Q.; YAN, W.; LIN, J. M. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 β -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 442-447, 2009.
- 42 TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid phase microextraction: recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32-40, 2007.
- 43 TAMAYO, F. G.; CASILLAS, J. L.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Highly selective fenuron imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation and its application to the fenuron in plant samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 482, n. 2, p. 165-173, 2003.
- 44 TAMAYO, F. G.; CASILLAS, J. L.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecularly imprinted polymers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 1234-1240, 2005.
- 45 ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 3-13, 2000.
- 46 YANG, H. H.; ZHOU, W. H.; GUO, X. C.; CHEN, F. R.; ZHAO, H. Q.; LIN, L. M.; WANG, X. R. Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 821-825, 2009.
- 47 KIRK, C.; JENSEN, M.; KJAER, C. N.; SMEDSKJAER, M. M.; LARSEN, K. L.; WIMMER, R.; YU, D. Aqueous batch rebinding and selectivity studies on sucrose imprinted polymers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 623-628, 2009.
- 48 ZHANG, H.; SONG, T.; ZONG, F.; CHEN, T.; PAN, C. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for phenoxyacetic acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 98-106, 2008.

- 49 BRAVO, J. C.; GARCINUÑO, R. M.; FERNÁNDEZ, P.; DURAND, J. S. Selective solid-phase extraction of ethynylestradiol from river water by molecularly imprinted polymer microcolumns. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 1763-1768, 2009.
- 50 MAHONY, J. O.; NOLAN, K.; SMYTH, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers - potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, p. 31-39, 2005.
- 51 SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1779-1794, 2005.
- 52 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica, parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.
- 53 CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science**, v. 804, n. 1, p. 173-182, 2004.
- 54 HAYES, W.; DAVIDSON, L. Molecular imprinting of biologically active steroidal systems. **Current Organic Chemistry**, v. 6, p. 265-282, 2002.
- 55 QUAGLIA, M.; DE LORENZI, E.; SULITZKY, C.; MASSOLINI, G.; SELLERGREN, B. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrophoresis. **Analyst**, v. 126, p. 1495-1494, 2001.
- 56 FULDA, K.-U.; TIEKE, B. Monolayers of mono- and bidisperse spherical polymer particles at the air/water interface and Langmuir-Blodgett layers on solid substrates. **Supramolecular Science**, v. 4, n. 3, p. 265-273, 1997.
- 57 CHANG, H.; KIM, S.-J.; JANG, H.-D.; KIM, T.-O.; OKUYAMA, K. Pore size-controlled synthesis and characterization of nanostructured silica particles. **Ultramicroscopy**, v. 108, n. 10, p. 1260-1265, 2008.
- 58 AGUDELO, N.; PEREZ, L.; LOPEZ, B. A novel method for the synthesis of polystyrene-graft-silica particles using random copolymers based on styrene and triethoxyvinylsilane. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 20, p. 8581-8586, 2011.
- 59 SERGEYEVA, T. A.; BROVKO, O. O.; PILETSKA, E. V.; PILETSKY, S. A.; GONCHAROVA, L. A.; KARABANOVA, L. V.; SERGEYEVA, L. M.; EL'SKAYA, A. V. Porous molecularly imprinted polymer membranes and polymeric particles. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, n. 23, p. 311-319, 2007.
- 60 PÉREZ-MORAL, N.; MAYES, A. G. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 15-21, 2004.

- 61 MAYES, A. G.; WHITCOMBE, M. J. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1742-1778, 2005.
- 62 YE, L.; CORMACK, P. A. G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. **Analytical Communications**, v. 36, n. 2, p. 35-38, 1999.
- 63 YE, L.; CORMACK, P. A. G.; MOSBACH, K. Molecular imprinting on microgel spheres. **Analytica Chimica Acta**, v. 435, n. 1, p. 187-196, 2001.
- 64 LI, P.; RONG, F.; YUAN, C. W. Morphologies and binding characteristics of molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerization. **Polymer International**, v. 52, n. 12, p. 1799-1806, 2003.
- 65 HONG, S.; ALBU, R.; LABBE, C.; LASUYE, T.; STASIK, B.; RIESS, G. Preparation and characterization of colloidal dispersions of vinyl alcohol-vinyl acetate copolymers: application as stabilizers for vinyl chloride suspension polymerization. **Polymer International**, v. 55, n. 12, p. 1426-1434, 2006.
- 66 GUERRERO-SÁNCHEZ, C.; ERDMENGER, T.; SEREDA, P.; WOUTERS, D.; SCHUBERT, U. S. Water-soluble ionic liquids as novel stabilizers in suspension polymerization reactions: engineering polymer beads. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, p. 9036-9045, 2006.
- 67 MAGGIORIS, D.; GOULAS, A.; ALEXOPOULOS, A. H.; CHATZI, E. G.; KIPARISSIDES, C. Prediction of particle size distribution in suspension polymerization reactors: effect of turbulence nonhomogeneity. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 20, p. 4611-4627, 2000.
- 68 HOSOYA, K.; YOSHIKAWA, K.; TANAKA, N.; KIMATA, K.; ARAKI, T.; HAGINAKA, J. Uniform-size macroporous polymer-based stationary-phase for hplc prepared through molecular imprinting technique. **Chemistry Letters**, v. 23, n. 8, p. 1437-1438, 1994.
- 69 CACHO VICENTE, C. del. **Polímeros de impresión molecular para la determinación de insecticidas**. 2009. 297 f. Tesis (Doctor) - Facultad de Ciencias Químicas Universidad Complutense de Madrid, 2009.
- 70 PLUNKETT, S. D.; ARNOLD, F. H. Molecularly imprinted polymers on silica: selective supports high-performance ligand-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 708, p. 19-29, 1995.
- 71 BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 35-44, 2001.
- 72 PRASAD, B. B.; BANERJEE, S. Preparation, characterization and performance of a silica gel bonded molecularly imprinted polymer for selective recognition and enrichment of β -lactam antibiotics. **Reactive Functional Polymers**, v. 55, p. 159-169, 2003.

- 73 TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 87-99, 2010.
- 74 XIAO-YAN, G.; XUE-JUN, C. Preparation of molecularly imprinted polymers for artemisinin based on the surfaces of silica gel. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 8-14, 2011.
- 75 MARESTONI, L. D. **Simulação computacional e síntese de polímero molecularmente impresso para extração em fase sólida (MISPE) de ciprofloxacina em urina**. 2014. 162 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- 76 VALERO NAVARRO, A. **Materiales nanoestructados de última generación para la detección óptica y el reconocimiento selectivo de moléculas de interés biológico y ambiental**. 2011. 375 f. Tesis (Doctor Europeo en Química) - Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, 2011.
- 77 GARCÍA-CALZÓN, J. A.; DÍAZ-GARCÍA, M. E. Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. **Sensors and Actuators B**, v. 123, p. 1180-1194, 2007.
- 78 RUSHTON, T.; KARNS, L.; SHIMIZU, D. A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs). **Analytica Chimica Acta**, v. 528, n. 1, p. 107-113, 2005.
- 79 MEIER, F.; SCHOTT, B.; RIEDEL, D.; MIZAIKOFF, B. Computational and experimental study on the influence of the porogen on the selectivity of 4-nitrophenol molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 68-74, 2012.
- 80 THACH, C. V.; HAI, N. H.; CHAU, N. Size controlled magnetite nanoparticles and their drug loading ability. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 52, n. 5, p. 1332-1335, 2008.
- 81 VALERO NAVARRO, A.; MEDINA CASTILLO, A. L.; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ J. F.; FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 4520-4525, 2011.
- 82 KONG, X.; GAO, R.; HE, X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymers (Fe₃O₄@MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 8-16, 2012.
- 83 TRUJILLO HERRERA, W. V. **Preparación y caracterización de nanopartículas de magnetita funcionalizados con ácido láurico, oleico y etilendiamino tetraacético para aplicaciones biomédicas y remediación ambiental**. 2013. 162 f. Tesis (Profesional de Licenciado en Física) - Facultad de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2013.

- 84 PUJALES PARADELA, R. **Preparación y caracterización de nanopartículas magnéticas biocompatibles**. 2013. 90 f. Trabajo de Fin de Grado - Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Coruña, 2013.
- 85 IBRAHIM, I. A. M.; ZIKRY, A. A. F.; SHARAF, M. A. Preparation of spherical silica nanoparticles: stober silica. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 985-986, 2010.
- 86 GLINKO, A.; BOZYM, M. J.; OWENS, M. L.; USHER, K. M. Reversed-phase hplc separation of water-soluble vitamins on agilent zorbax eclipse plus columns. **Agilent Technologies, Inc.** 2008. Disponível em: <<https://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-9313EN.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2014.
- 87 HOLLER, U.; WACHTER, F.; WEHRLIB, C.; FIZET, C. Quantification of biotin in feed, food, tablets, and premixes using HPLC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 831, p. 8-16, 2006.
- 88 BETANCOURT-GALINDO, R.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, O. S. Obtención de látex magnético mediante la técnica de polimerización en miniemulsión. **Superficies y Vacío**, v. 17, n. 1, p. 38-41, 2004.
- 89 CHEN, F.-F.; XIE, X.-Y.; SHI, Y.-P. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for selective recognition of resveratrol in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 114-116, 2013.
- 90 MEN, H.-F.; LIU, H.-Q.; ZHANG, Z.-L.; HUANG, J.; ZHANG, J.; ZHAI, Y.-Y.; LI, L. Synthesis, properties and application research of atrazine Fe₃O₄@SiO₂ magnetic molecularly imprinted polymer. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 19, p. 2271-2280, 2012.
- 91 FARRINGTON, K.; MAGNER, E.; REGAN, F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, p. 60-68, 2006.
- 92 ZHAO, Y.-G.; CHEN, X.-H.; PAN, S.-D.; ZHU, H.; SHEN, H.-Y.; JIN, M.-C. Self-assembly of a surface bisphenol A-imprinted core-shell nanoring amino-functionalized superparamagnetic polymer. **Journal of Materials Chemical A**, v. 1, p. 11648-11658, 2013.
- 93 OIZUMI, J.; HAYAKAWA, K. Biocytin synthetase activity in human milk as assessed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 612, p. 156-160, 1993.
- 94 THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC. **EZ-Link Pentylamine-Biotin**: useful for EDC-mediated labeling and various assay strategies. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/product/ez-link-pentylamine-biotin>>. Acesso em: 19 ago. 2014.

95 THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC. **EZ-Link NHS-SS-Biotin**: membrane-permeable and cleavable for intracellular, reversible biotinylation. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/product/ez-link-nhs-ss-biotin>>. Acesso em: 19 ago. 2014.

96 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

97 SILVA, P. H. F. da .Leite: aspectos de composição e propriedade. **Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3-5, 1997. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/quimsoc.pdf>> . Acesso em: 03 set. 2014.