

Polímeros de Impressão Molecular Obtidos Através de Polimerização por Precipitação e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida

Bruna Rachel de B. Peçanha, Luiza R. S. Dias, Eliani Spinelli, Estela M. F. Muri
Faculdade de Farmácia, UFF

Resumo: Polímeros de impressão molecular (Molecularly Imprinted Polymers, MIPs) foram sintetizados e aplicados como adsorventes na técnica de extração em fase sólida (EFS). O método de polimerização por precipitação foi usado para sintetizar os polímeros, devido à simplicidade de preparo, altos rendimentos e obtenção de partículas mais uniformes uma vez que o polímero não é triturado. Os MIPs foram sintetizados com ácido metacrílico como monômero funcional, trimetacrilato de trimetilolpropano como agente de reticulação e cloridrato de amilorida como molécula molde. O solvente de elevada polaridade empregado na síntese (THF:MeOH:H₂O) possibilita empregar a técnica para moléculas polares como o cloridrato de amilorida. O controle no volume de solvente permitiu obter partículas maiores, de modo que a EFS foi realizada nas condições usuais, o que confere um potencial para aplicação dessa técnica de polimerização na preparação de adsorventes para EFS.

Palavras-chave: Polímeros de impressão molecular (MIP), extração em fase sólida (EFS), polimerização por precipitação, cloridrato de amilorida.

Molecularly Imprinted Polymers Prepared by Precipitation Polymerization and their Application to Solid Phase Extraction

Abstract: Molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized and applied as adsorbents in the solid-phase extraction (SPE) technique. The polymers were synthesized by precipitation polymerization because of its simplicity, high yields and good control of final particle size. MIPs were synthesized using methacrylic acid as functional monomer, trimethylolpropane trimethacrylate as crosslinker and amiloride hydrochloride as template. The polar solvent mixture used (THF:MeOH:H₂O) permitted polar molecules such as amiloride hydrochloride to be used. The solvent volume control allowed bigger particles to be formed, so that the solid-phase extraction technique could be employed under usual conditions, and therefore this polymerization technique is promising for preparing adsorbents for SPE.

Keywords: Molecularly imprinted polymers (MIPs), solid-phase extraction technique (SPE), precipitation polymerization method, amiloride hydrochloride.

Introdução

A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios específicos de reconhecimento, moldados a partir de uma molécula molde (MM), sendo esta o próprio analito ou um composto de estrutura semelhante. Os polímeros são denominados de Polímeros de Impressão Molecular (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIP), e a etapa de síntese ocorre após a formação de um complexo entre um monômero funcional (MF) e a MM. O MF deve possuir grupos em posições complementares que possibilitem a interação com a MM. Após a adição de um agente de reticulação e um reagente iniciador, a reação de polimerização em cadeia via radicais livres tem início, promovendo a formação de uma matriz polimérica rígida^[1,2]. Por fim, a molécula molde é removida da matriz polimérica por meio de solvente ou clivagem química. Assim, o MIP contém microcavidades capazes de reter seletivamente a MM em uma amostra complexa, eliminando possíveis interferentes da análise^[3,4].

O emprego de MIP como material adsorvente na técnica de extração em fase sólida (EFS) vem se destacando, pois oferece alto grau de seletividade e estabilidade química e térmica quando comparados a outros materiais, como a sílica modificada (C₁₈), resinas de troca iônica e imunosorventes, além de reprodutibilidade no preparo do polímero. A técnica recebe a designação de extração em fase sólida com impressão molecular (*Molecular Imprinting Solid-Phase Extraction, MISPE*)^[3].

A EFS é usualmente empregada no preparo de amostras de urina visando à análise toxicológica e possibilita a eliminação de interferentes da matriz, principalmente de natureza biológica, facilitando a detecção do analito. A eluição do analito do cartucho é feita com pequenos volumes de solvente promovendo a sua concentração e economizando reagentes, solventes, e o tempo gasto com a extração/purificação^[5].

A técnica de extração em fase sólida representa uma estratégia interessante para a extração de substâncias, em

particular as de elevada polaridade, em matrizes de natureza altamente hidrofílica como as biológicas. Na análise de substâncias polares em urina, por exemplo, a extração líquido-líquido é a técnica mais utilizada, e geralmente fornece rendimentos baixos devido a solubilidade destas na fase aquosa. Além das propriedades da EFS, a MISPE acrescenta um aumento na seletividade na extração do analito de interesse frente a outros compostos presentes na amostra, devido ao efeito de impressão molecular, além de reduzir os efeitos dos interferentes da matriz da amostra⁶¹.

Neste trabalho, é descrito o desenvolvimento de MIP para aplicação na EFS. Os polímeros foram sintetizados pela técnica de polimerização por precipitação em uma simples etapa e aplicados como adsorventes em cartuchos de EFS. O MIP sintetizado, utilizando o cloridrato de amilorida como molécula molde, foi avaliado quanto à capacidade de adsorção e de recuperação na EFS.

Experimental

Reagentes

Ácido metacrílico (MAA, 99%), trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM, grau técnico) e acetato de sódio tri-hidratado (USP) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Alemanha). Peróxido de benzoíla P.S. (PB), metanol (grau HPLC/UV), ácido trifluoroacético P.S. e ácido clorídrico P.A foram adquiridos pela Vetec (Brasil). Cloridrato de amilorida (AMI) foi adquirido na DEG Importação de Produtos Químicos Ltda. (Brasil). Tetrahydrofurano (grau HPLC/UV), acetonitrila (grau HPLC/UV) e ácido acético glacial ACS foram adquiridos pela Tedia (EUA) e ácido cítrico anidro ACS pela Spectrum (EUA). Os reagentes foram utilizados sem purificação prévia.

Procedimentos

Síntese dos polímeros de impressão molecular

Em um balão de fundo redondo bitubulado de 100 mL conectado a um condensador de refluxo, foi colocado 20 mL do solvente porogênico THF:metanol:água (5:4:1) e a molécula-molde AMI (0,25 mmol)⁷¹. O monômero funcional MAA (2 mmol) foi dissolvido no solvente com agitação por 10 min e a seguir foram adicionados o agente de ligação cruzada ou reticulação TRIM (2,5 mmol) e o iniciador PB (0,34 mmol). Com o balão fechado, a solução foi borbulhada com gás nitrogênio por 10 minutos e colocada em banho de óleo a 60 °C por 24 horas. Os polímeros controle (NIP) foram sintetizados utilizando o mesmo procedimento sem a adição de AMI. O polímero foi obtido na forma de um precipitado branco e colocado em cartucho de celulose para lavagem no extrator Soxhlet para remoção do excesso de reagentes e molécula molde com metanol:ácido acético 9:1 (v/v) por algumas horas e depois com metanol para remoção do ácido. Os polímeros foram secos à vácuo até peso constante. Os polímeros MIP e NIP preparados foram peneirados para a obtenção de partículas entre 25 e 60 µm.

Caracterização dos polímeros

Os polímeros (MIP) e (NIP) foram suspensos em água ultra-pura e depositados em um suporte de cobre para visualização direta em um Microscópio Eletrônico

de Transmissão (MET) (FEI, EUA). As análises de caracterização química dos polímeros foram realizadas em um Espectrofotômetro no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Varian, Alemanha) com aplicação direta da amostra.

Ensaio de adsorção

A solução tampão citrato-acetato pH 6,5 foi preparada com ácido cítrico anidro (23 g), acetato de sódio tri-hidratado (90 g) e hidróxido de sódio (10g) para cada litro de solução, sendo o pH ajustado para 6,5 com solução de hidróxido de sódio. A curva de calibração para o ensaio de adsorção foi feita a partir da solução estoque de AMI a 1 mg mL⁻¹ em água ultra-pura na faixa de concentração de 0,1 a 20 µg mL⁻¹ em tampão citrato-acetato pH 6,5. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Bel Photonics, Itália) a 363 nm.

Pesou-se 7,5 mg em duplicata de cada MIP e NIP em microtubos para centrífuga de 2,0 mL. Adicionou-se 1,5 mL de solução de AMI em tampão citrato-acetato pH 6,5 na faixa de concentração de 6 a 60 µg mL⁻¹ em cada tubo. Os tubos foram colocados no agitador e misturados por inversão (Phoenix, Brasil) por 16 horas e centrifugados em microcentrífuga (Eppendorf, Alemanha) a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi levado para leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 363 nm. Uma solução controle foi preparada em cada concentração e submetida às mesmas condições de análise, sem adição do polímero^{6,71}.

Extração em fase sólida com impressão molecular (MISPE)

Em um cartucho de polipropileno vazio com capacidade de 3 mL (Supelco, EUA), 20 mg dos polímeros foram colocados entre dois frits de 20 µm (Supelco, EUA). Os cartuchos preparados foram colocados em uma câmara de vácuo Supelco VisiprepTM (Supelco, EUA), com capacidade para 12 cartuchos de SPE. O ensaio foi realizado em duplicata para MIP e NIP. Os cartuchos foram condicionados com 1 mL de metanol, 1 mL de água e 1 mL de tampão citrato-acetato pH 6,5. Cada cartucho foi carregado com 2 mL de solução de AMI a 10 µg mL⁻¹ em tampão citrato-acetato pH 6,5, aplicando-se o vácuo. Os resíduos foram recolhidos para leitura no espectrofotômetro. A seguir, a eluição de AMI foi feita com 2 mL de solvente. Os seguintes solventes foram testados: metanol, metanol:ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% e 1%, e metanol:ácido acético a 1%. Todos os resíduos foram recolhidos em tubos de vidro e o solvente foi evaporado a 70 °C sob nitrogênio. Os resíduos foram solubilizados em 2 mL de tampão citrato-acetato pH 6,5 e levados para leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 363 nm. Um tubo controle na mesma concentração foi levado para leitura nas mesmas condições de análise⁶¹.

Resultados e Discussões

Síntese dos polímeros de impressão molecular

Embora a maioria dos trabalhos de síntese de MIP seja por polimerização em massa, existem muitas abordagens que utilizam a técnica por precipitação, visando a obtenção de partículas mais uniformes, com

maior rendimento de sítios de reconhecimento e assim maior capacidade adsortiva, pois a etapa de trituração é abolida^[7,8].

O TRIM foi o agente de reticulação escolhido para a síntese dos MIPs, pois pode conferir maior capacidade de adsorção e maior seletividade ao polímero formado, enquanto o MAA possui grupos ácidos capazes de interagir por ligação de hidrogênio com o cloridrato de amilorida, um sal obtido a partir de uma base moderadamente forte, a amilorida (3,5-diamino-6-cloro-*N*-(diaminometileno)-2-pirazinocarboxamida, Figura 1). O MAA apresenta grupos aceptores, como a carbonila do grupo carboxila (COOH), e doadores (hidroxila) de ligação de hidrogênio, capazes de interagir com a molécula molde, que possui também grupos aceptores (carbonila do grupo acilguanidina) e doadores (grupos amino) de ligação de hidrogênio. Além disso, possui a capacidade de fazer ligações de natureza iônica devido à presença de grupos

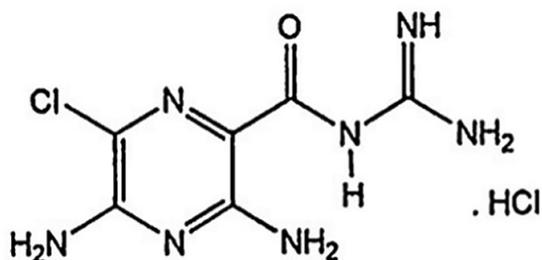


Figura 1. Cloridrato de amilorida (AMI).

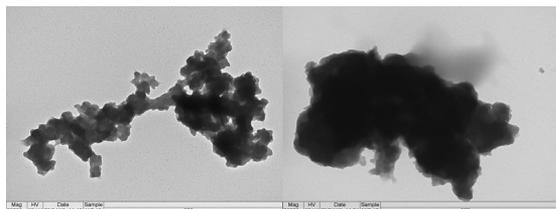


Figura 2. Imagens de MET dos polímeros NIP (esq.) e MIP (dir.).

ionizáveis (COOH), pois é um ácido fraco ($pK_a = 4,7$), possibilitando a interação com a AMI que se apresenta na forma de cátion^[3].

O solvente de elevada polaridade empregado na síntese (THF:MeOH:H₂O) permite o emprego da técnica de MISPE para moléculas polares como AMI. Alguns autores demonstraram que o uso de solventes mais polares na síntese de MIP confere ao polímero maior capacidade de reconhecimento pela molécula-molde em comparação a solventes menos polares^[7,9].

Caracterização dos polímeros

As imagens obtidas por MET mostram que os polímeros foram obtidos por precipitação na forma de aglomerados de partículas (Figura 2), similar ao encontrado por alguns autores^[7,8]. Os polímeros MIP e NIP possuem morfologia e características de superfície semelhantes e na maioria das vezes não se consegue diferenciá-los por técnicas de porosimetria e de determinação da área de superfície^[9].

Os espectros de FTIR (Figura 3) mostram que os polímeros MIP e NIP são praticamente idênticos quimicamente, o que era esperado já que a AMI foi extraída na lavagem de MIP e os grupos químicos presentes nos dois polímeros são os mesmos, característicos dos monômeros MAA e TRIM.

As bandas características dos monômeros utilizados na síntese e que podem ser visualizadas nos polímeros MIP e NIP são as de TRIM e MAA na região de 1700 cm⁻¹, correspondente ao estiramento de C=O do grupo éster e carboxila do ácido, de 1150 cm⁻¹ correspondente a deformação axial de C-O de éster e de 1200 a 1300 cm⁻¹ característica de deformação axial de C-O de ácido carboxílico.

Pode-se também observar a ausência do sinal em 1670-1640 cm⁻¹ proveniente do estiramento de grupos vinila dos monômeros, que desaparecem nos polímeros devido a quebra das ligações C=C no processo de polimerização, dando origem às ligações simples.

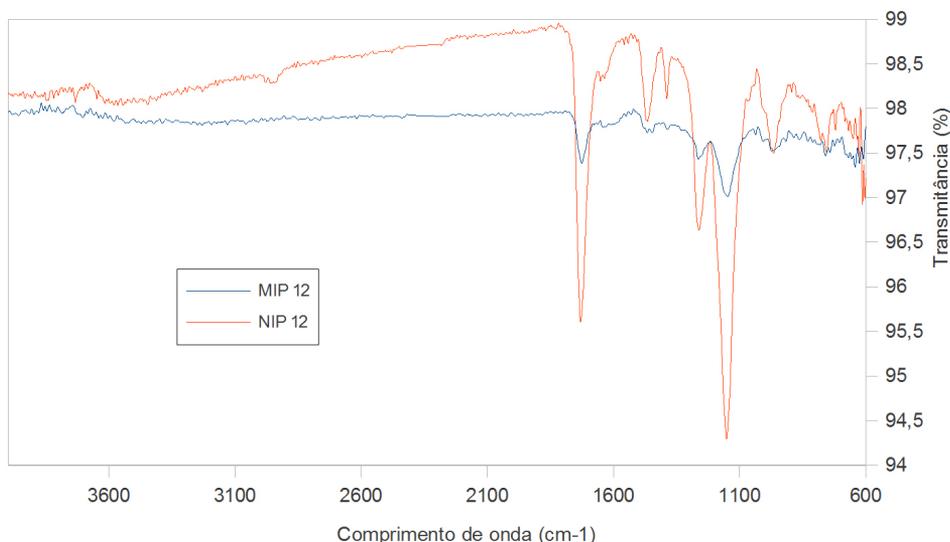


Figura 3. Espectros de FTIR de MIP e NIP.

Cloridrato de amilorida

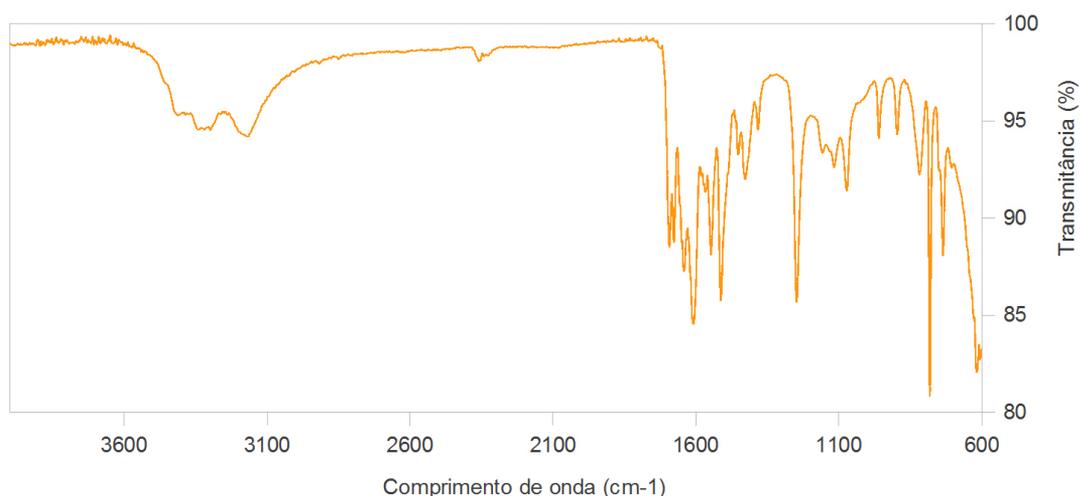


Figura 4. Espectro de FTIR de AMI.

Entretanto, não puderam ser observadas com muita evidência bandas na região de 2900 cm^{-1} características de estiramento de O-H de ácido carboxílico e C-H em nenhum dos polímeros sintetizados. Isto pode ser devido a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares que ocorrem entre as cadeias de polímeros, diminuindo a intensidade das bandas de estiramento de O-H, assim como também pelo alto grau de reticulação dos polímeros. Além disso, o monômero de reticulação (TRIM) está em excesso em relação ao monômero funcional (MAA), predominando assim as bandas de características de ésteres presentes em TRIM.

Não foram observadas bandas características de AMI (Figura 4), principalmente na região de $3250\text{ e }3150\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento de N-H^[10], confirmando a eficiência na lavagem de MIP pela extração no Soxhlet.

A formação de polímeros porosos altamente reticulados não é uma ciência inteiramente preditiva e os materiais resultantes são difíceis de caracterizar completamente, mesmo por ressonância magnética nuclear no estado sólido (RMN) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)^[11], ou por técnicas de análise térmica como calorimetria diferencial de varredura^[12].

Ensaios de adsorção

O espectro de varredura da solução de AMI foi obtido no espectrofotômetro UV-Visível na faixa de comprimento de onda entre 260 e 390 nm, utilizando solução de AMI a $9\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão citrato-acetato pH 6,5. Os $\lambda_{\text{máx}}$ foram idênticos aos obtidos no espectro de varredura feito em HCl 0,1N, solvente preconizado pela Farmacopéia americana^[13] para análise de cloridrato de amilorida.

Os polímeros possuem grupos ácidos em sua estrutura, provenientes do MAA (pKa 4,7), livres para interação com a AMI, que possui um pKa de 8,7. O ensaio de adsorção foi feito em tampão citrato-acetato pH 6,5 e neste pH o MAA está carregado negativamente (COO^-) e a AMI está na

forma de cátion com o grupo guanidina com carga positiva, o que favorece a interação iônica com o polímero.

A quantidade de AMI (μg) por quantidade de polímero (mg), ou seja Q ($\mu\text{g mg}^{-1}$), calculado após a adsorção variou de 1,05 a 10,67 para NIP e de 0,83 a 10,47 para MIP em relação à faixa de concentração analisada. Os polímeros apresentaram uma boa adsorção, o que confirma a interação iônica, porém não seletiva. Pérez-Moral e Mayes^[14] observaram uma mesma situação na adsorção de propranolol em uma solução tamponada a pH 4,6 em um MIP sintetizado por precipitação, o que não foi observado em outras técnicas de polimerização como em massa e suspensão para o mesmo analito. A interação do analito muito polar com o ácido metacrílico pode ter sido prejudicada pela competição com o solvente de elevada polaridade no momento da síntese, explicando a falta de seletividade. Na polimerização em massa, o volume de solvente é muito menor e em suspensão o analito se encontra mais disperso no solvente.

Extração em fase sólida com impressão molecular (MISPE)

A recuperação de AMI nos solventes testados é apresentada na Tabela 1. O carregamento do cartucho com solução de AMI preparada em tampão citrato-acetato pH 6,5 favoreceu a interação iônica do fármaco com o polímero, confirmado pela ausência de AMI no solvente recolhido. Na fase de remoção do fármaco adsorvido no cartucho, vários solventes foram testados. A eluição com metanol não foi capaz de eluir o AMI do cartucho, confirmando a forte interação iônica do polímero com AMI, o que não ocorreria se houvesse somente a interação por ligação de hidrogênio entre o fármaco e o polímero. Já na eluição com a mistura metanol:ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%, a recuperação foi superior a 80% e em TFA a 1%, a eluição foi total, assim como em metanol:ácido acético a 1%. A eluição total de AMI somente ocorre após lavagem com o solvente na presença de ácido, que protona os grupos carboxila do polímero, rompendo assim a interação iônica com o analito.

Tabela 1. Recuperação de AMI (%) obtida pela técnica de MISPE.

Solvente	MIP	NIP
Tampão citrato-acetato pH 6,5	0	0
Metanol	5,6	9,5
Metanol:TFA 0,1%	89,6	83,3
Metanol:TFA 1%	>100	>100
metanol:ácido acético a 1%	>100	>100

Conclusões

Vários fatores estão envolvidos na síntese de MIP para ácidos e bases fracas. A interação por ligação de hidrogênio, tida como uma das interações mais significativas na interação fármaco-polímero, pode se tornar secundária quando ocorre o fenômeno de ionização, que deve ser considerado tanto para o polímero quanto para o analito, exigindo um rígido controle de pH. A polimerização por precipitação é uma técnica de polimerização mais simples e que pode, com o adequado controle das condições operacionais, fornecer partículas de tamanho apropriado para a aplicação na extração em fase sólida.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e a PROPPI-UFF pelo suporte financeiro. O microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Microscopia no Instituto de Microbiologia da UFRJ para obtenção das imagens. As análises de caracterização dos polímeros por FTIR foram realizadas no Instituto de Química da UFF.

Referências Bibliográficas

1. Figueiredo, E. C.; Dias, A. C. B. & Arruda, M. A. Z. - Rev. Bras. Cienc. Farm., **44**, p.361 (2008).
2. Cormack, P. A. G. & Elorza, A. Z. - J. Chromatogr. B, **804**, p.173 (2004). PMID:15093171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>

3. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T. & Kubota, L. T. - Quím. Nova, **28**, p.1076 (2005). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000600024>
4. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T. & Kubota, L.T. - Quím. Nova, **28**, p.1087 (2005). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000600025>
5. Costa, J. L. - "Extração em fase sólida", in: Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica, cap.16, Moreau, R. L. M. & Siqueira, M. E. P. B., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (2008).
6. Blomgren, A.; Berggren, C.; Holmberg, A.; Larsson, F.; Sellergren, B. & Ensing, K. - J. Chromatogr. A, **975**, p.157 (2002). [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01359-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01359-6)
7. Kareuhanon, W.; Lee, V. S.; Nimmanpipug, P.; Tayapiwatana, C. & Pattarawarapan, M. - Chromatographia, **70**, p.1531 (2009). <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-009-1385-4>
8. Zhang, J.; Jiang, M.; Zou, L.; Shi, D.; Mei, S. R.; Zhu, Y. X.; Shi, Y.; Dai, K. & Lu, B. - Anal. Bioanal. Chem., **385**, p.780 (2006). PMID:16741779. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0406-5>
9. Ye, L. & Cormack, P. A. G. & Mosbach, K. - Anal. Commun., **36**, p.35 (1999). <http://dx.doi.org/10.1039/a809014i>
10. Mazzo, D. J. - "Amiloride hydrochloride", in: Analytical profiles of drug substances, vol.15, p.1., Florey, K., Academic Press, Orlando (1986).
11. Whitcombe, M. J. & Vulfson, E. N. - Advan. Mater., **13**, p.467 (2001). [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4095\(200104\)13:7<467::AID-ADMA467>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4095(200104)13:7<467::AID-ADMA467>3.0.CO;2-T)
12. Esfandyari-Manesh, M.; Javanbakht, M.; Atyabi, F.; Badiei, A. & Dinarvand, R. - J. Appl. Polym. Sci., **121**, p.1118 (2011). <http://dx.doi.org/10.1002/app.33812>
13. United States Pharmacopoeia. - "USP XXII", 22nd ed, US Pharmacopoeial Convention, Rockville, (1989).
14. Pérez-Moral, N. & Mayes, A. G. - Anal. Chim. Acta, **504**, p.15 (2004). [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00533-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00533-6)

Enviado: 08/05/12
Reenviado: 18/07/12
Aceito: 23/07/12