

**MARCELO LUIZ QUINT**

**CATALISADORES PARA ESTERIFICAÇÃO E  
TRANSESTERIFICAÇÃO E MODIFICAÇÕES DE ELETRODOS  
DE PASTA DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE FOSFATOS  
BASEADOS NA TÉCNICA DE *MOLECULAR IMPRINTING***

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Professor Doutor Josiel Barbosa Domingos.

Florianópolis  
2014

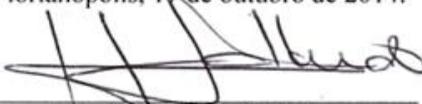


Marcelo Luiz Quint

**CATALISADORES PARA ESTERIFICAÇÃO E  
TRANSESTERIFICAÇÃO E MODIFICAÇÕES DE ELETRODO  
DE PASTA DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE FOSFATOS  
BASEADOS NA TÉCNICA DE *MOLECULAR IMPRINTING***

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em  
Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 17 de outubro de 2014.



Prof. Dr. Hugo Gallardo  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**



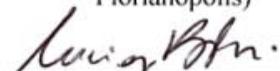
---

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos  
Orientador (UFSC –  
Florianópolis)



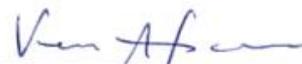
---

Prof. Dr. Emerson Meyer  
Relator (UEM – Maringá)



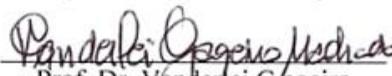
---

Prof. Dra. Luciana de Boer P. de  
Souza  
(UEPG – Ponta Grossa)



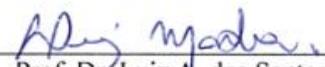
---

Prof. Dra. Vera L. A. Frescura  
Bascuñan (UFSC – Florianópolis)



---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro  
Machado (UFSC – Florianópolis)



---

Prof. Dr. Luiz A. dos Santos  
Madureira (UFSC – Florianópolis)

Florianópolis, 2014



*“... Sou um homem, me engano por que sou homem. Não se chega a lugar nenhum sem nos enganarmos pelo menos quatorze vezes, talvez cento e quatorze, e isso é até uma honra. Mas nunca nos enganamos de modo geral. Um erro original vale muito mais que uma verdade banal ...”*

Rodión Romanovitch Raskólnikov em *Преступление и наказание* (Crime e Castigo).

**Fiódor Mikhailovich Dostoiévski,  
1866**



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Josiel Barbosa Domingos pela orientação;  
Ao Professor Doutor Antônio Carlos Joussef pela orientação informal;

Ao colega Deonildo Faggion Júnior pelas análises de microscopia eletrônica de varredura;

Ao colega Luis Felipe Costa Silva, aluno da Professora Doutora Elenara Lemos-Senna pelas análises de tamanho de partículas;

Ao Professor Doutor Gustavo Amadeu Micke e suas alunas Jaqueline Pereira Vistuba e Maressa Danielli Dolzan pelas análises de eletroforese capilar;

Ao Professor Doutor Bruno Szpoganicz e seu aluno Thiago Guimarães Costa pelas análises de titulação potenciométrica;

Ao Professor Doutor Almir Spinelli e seu aluno Fernando Santos de Souza pela confecção de eletrodos e medidas eletroquímicas;

Aos funcionários da Central de Análises, do Departamento de Química e do Programa de Pós-graduação em Química;

Aos professores que compõem a banca examinadora pela disposição de seu tempo para análise e avaliação desta Tese;

Agradecimentos especiais aos meus familiares.



## RESUMO

Esta tese objetivou o desenvolvimento de catalisadores para as reações de esterificação e transesterificação bem como eletrodos sensíveis a fosfatos, ambos por intermédio da técnica de impressão molecular. Para o desenvolvimento de eletrodos planejou-se e preparou-se uma série de sensores para o grupo fosfato utilizando-se a técnica de impressão molecular baseada em interações não covalentes entre o modelo fosfato de dipentila com o monômero funcional ácido metacrílico. Utilizou-se a técnica eletroquímica de voltametria de onda quadrada com eletrodos de pasta de carbono modificados para a detecção específica de fosfatos. Conseguiu-se linearidade em curvas de calibração na faixa entre 20 e 300 nmol L<sup>-1</sup>. Alcançou-se o limite de detecção de 8,82 nmol L<sup>-1</sup>. Não se detectou a presença dos íons carbonato, sulfato e nitrato quando utilizados em concentrações 100 vezes maiores que as de trabalho. Demonstrou-se seletividade a fosfatos de dialquila com cadeias menores ou iguais às do modelo utilizado. Esses polímeros não apresentaram atividade catalítica para as reações testadas. Fez-se o planejamento de catalisadores baseados na interação entre o modelo fosfato de dibutila e combinações dos monômeros funcionais ácidos acrílico e metacrílico, 1-vinilimidazol e metacrilato de 2-hidroxietila na tentativa de mimetizar a tríade catalítica de lipases. Os polímeros resultantes não apresentaram atividade catalítica frente às reações testadas. Apesar de não resultar em materiais catalíticos com o modelo fosfato de dipentila, evidenciou-se sucesso na impressão molecular, dada a alta seletividade apresentada nas técnicas eletroquímicas estudadas. Já a impressão com fosfato de dibutila mimetizando a tríade catalítica da lipase não pôde ser evidenciada pelos estudos de catálise. Esses materiais atualmente são objetos de estudos eletroquímicos para a comprovação do êxito na impressão molecular, bem como para o desenvolvimento de sensores de pasta de carbono modificados para a detecção e quantificação de fosfatos de dialquila com cadeias de até três átomos de carbono. Os materiais resultantes desta tese podem futuramente ser utilizados em outras aplicações de polímeros impressos molecularmente, como fases fixas de técnicas cromatográficas.

Palavras-chave: *molecular imprinting, eletrodo de pasta de carbono, determinação de fosfato.*



## ABSTRACT

This thesis have aimed the development of esterification and transesterification catalysts as well as the development of phosphate sensors by the use of molecular imprinting. A series of size-selective polymeric sensors for the phosphate group were designed and synthesized using the molecularly imprinted polymer (MIP) technique based upon the non-covalent interactions of the template dipentyl phosphate with the functional monomer methacrylic acid. Electrochemical detection, performed by square wave voltammetry (SWV) with a modified carbon paste electrode (CPE), showed very low-range specific detection of phosphate molecules. Calibration curves were plotted within a linear range of 20 to 300 nmol L<sup>-1</sup> for all modified CPEs, with the lowest detection limit (DL) determined as 8.82 nmol L<sup>-1</sup>. Inorganic interfering agents, such as carbonate, nitrate and sulfate ions, were analyzed and no signal disturbance was observed for relative concentrations 100 times higher. Furthermore, the modified electrodes also showed good selectivity for phosphate molecules containing alkyl chains with up to five carbon atoms. These selectivity studies showed that imprinted sites were successfully synthesized and only structures that are equal to or smaller than those of the template molecule are selected by maximizing intermolecular interactions within the MIP binding site. Moreover, the sensors presented good stability, maintaining the same selectivity for several months. Although the great success in electrochemical activities, these polymers do not showed any catalytic activity for the esterification reactions. It was planned other catalysts based on molecularly imprinted polymer technique based upon the non-covalent interactions of the template dibutyl phosphate with combination of the functional monomers methacrylic acid, acrylic acid, 1-vinylimidazole and 2-hydroxyethyl methacrylate in attempt to mimic lipases catalytic triad. These polymers also do not present catalytic activity. These materials are subjects of electrochemical studies for detection and quantification of dialkyl phosphates with alkyl chains up to 3 carbons. The materials produced in this thesis would be used in other MIP applications, as stationary phases of chromatographic technics.

*Keywords: molecular imprinting, carbon paste electrode, phosphate determination.*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Publicações encontradas pela ferramenta SciFinder (CAS) com os conceitos “*esterification and catalyst*” e “*transesterification and catalyst*” ..... 26
- Figura 2** Publicações encontradas pela ferramenta SciFinder (CAS) com os termos “*molecular imprinting*”, “*esterification and molecular imprinting*” e “*transesterification and molecular imprinting*” ..... 26
- Figura 3** Publicações encontradas pela ferramenta SciFinder (CAS) com os termos “*molecularly imprinted polymer*” e “*molecularly imprinted polymer and electrode*” ..... 27
- Figura 4** Processa de impressão molecular, onde MFs = monômeros funcionais e XL = reticulador..... 34
- Figura 5** Exemplos de interação M:MF utilizando ligações covalentes. a) formação de éster borônico para reconhecimento de modelo diol e b) formação de base de Schiff para reconhecimento de modelo amina primária. .... 36
- Figura 6** Estrutura postulada para a cavidade de MIP ocupada por substrato utilizando interações não covalentes (ligações de hidrogênio) (adaptada de Wulff 2002)..... 36
- Figura 7** Interações modelo-MF mediada por metais<sup>(57)</sup> ..... 37
- Figura 8** Preparação de MIP utilizando interações covalentes durante a polimerização e reticulação (a) e extração da molécula de modelo (b). Durante a utilização do polímero, interações do tipo ligação de hidrogênio (c) e (d). Adaptado de Whitcombe, 1995.<sup>(59)</sup> ..... 38
- Figura 9** Tríade catalítica de lipases e estruturas dos substratos ésteres de *p*-nitrofenila, que foram utilizados como modelos (figura adaptada de Meng, Yamazaki e Sode, 2004)<sup>(69)</sup> ..... 40
- Figura 10** Modelos utilizados na construção de MIPs (A1 e BSIP) e respectivos substratos (BPONP e BSPONP)..... 41
- Figura 11** Típica célula eletroquímica composta por três eletrodos. Figura adaptada da referência Brett & Brett, 1994<sup>(73)</sup> ..... 43
- Figura 12** Modelos análogos estruturais dos estados de transição (AET) das reações de esterificação dos ácidos valérico (a) e butírico (b) ..... 48

<b>Figura 13</b> Resíduos de aminoácidos (superiores) geralmente correspondentes à tríade catalítica de lipases (à direita) e MFs (inferiores) utilizados para mimetizá-la. Destacados em vermelho os grupos funcionais que interagem com o substrato RCOOR' .....	49
<b>Figura 14</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do fosfato de dipentila.....	51
<b>Figura 15</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do fosfato de dipentila .....	52
<b>Figura 16</b> Espectro de RMN de <sup>31</sup> P do fosfato de dipentila.....	53
<b>Figura 17</b> Espectro de absorção no IV do polímero NIP, obtido por transmitância em pastilha com KBr. ....	56
<b>Figura 18</b> Espectro de absorção no IV do polímero MIP1, obtido por transmitância em pastilha com KBr. ....	57
<b>Figura 19</b> Espectro de absorção no IV do polímero MIP2, obtido por transmitância em pastilha com KBr. ....	58
<b>Figura 20</b> Espectro de absorção no IV do polímero MIP3, obtido por transmitância em pastilha com KBr. ....	59
<b>Figura 21</b> Micrografias eletrônicas de varredura de NIP (a, b), MIP1 (c, d), MIP2 (e, f) e MIP3 (g, h). ....	60
<b>Figura 22</b> Micrografia de CT003 (NIP), polímero obtido por polimerização por precipitação, preparada pela secagem de suspensão (25 mg / 10 mL) sobre lamínula de vidro. ....	62
<b>Figura 23</b> Espectro de absorção no IV do polímero CT003, obtido por transmitância em pastilha com KBr. ....	63
<b>Figura 24</b> Reações de butanolise de ácido butírico com 200 mg de Amberlyst® 15 e sem catalisador a 60 °C.....	70
<b>Figura 25</b> Reações de butanolise de ácido butírico com 150 mg de MIP6 e 153 mg de NIP6 a 60 °C.....	70
<b>Figura 26</b> Reações de butanolise do ácido butírico com 403 mg de MIP6 e 401 mg de NIP6 a 100 °C.....	71
<b>Figura 27</b> Reações de butanolise do ácido butírico com 400 mg de MIP7 e 400 mg de NIP7 a 100 °C.....	71
<b>Figura 28</b> Reações de butanolise do ácido butírico com 401 mg de MIP8 e 400 mg de NIP8 a 100 °C.....	72

- Figura 29** Reações de butanólise do ácido butírico com 401 mg de MIP9 e 401 mg de NIP9 a 100 °C ..... 72
- Figura 30** Reações de butanólise do ácido butírico com 399 mg de MIP10 e 402 mg de NIP10 a 100 °C ..... 73
- Figura 31** Reações de pentanólise do ácido valérico com 200 mg de MIP1, 201 mg de MIP2, 200 mg de MIP3 e 200 mg de NIP a 100 °C . 73
- Figura 32** Reações de butanólise do ácido valérico com 200 mg de MIP1, 201 mg de MIP2, 201 mg de MIP3 e 200 mg de NIP a 100 °C . 74
- Figura 33** Reações de octanólise do ácido valérico com 201 mg de MIP1, 202 mg de MIP2, 202 mg de MIP3 e 201 mg de NIP a 100 °C . 74
- Figura 34** Reações de pentanólise do ácido valérico com 200 mg de Amberlyst<sup>®</sup> 15, sem catalisador, com 201 mg de MIP1 e 200 mg de NIP a 100 °C, utilizando-se 1-pentanol previamente seco com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75
- Figura 35** Voltamograma cíclico para EPC não modificado em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> na ausência (círculos vazios) e na presença (círculos preenchidos) de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$  ..... 77
- Figura 36** Voltamogramas cíclicos para EPCMIPs/EPCNIP em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> na ausência (círculos vazios) e na presença (círculos preenchidos) de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$  ..... 78
- Figura 37** Voltamogramas de onda quadrada para EPCs modificados com NIP, MIP1, MIP2 e MIP3 em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> antes (círculos vazios) e após adição de 0,1mmol L<sup>-1</sup> dos ânions HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (círculos preenchidos), CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (quadrados vazios), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (quadrados preenchidos) e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (triângulos vazios).  $f = 40 \text{ Hz}$ ;  $a = 100 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$  ..... 79
- Figura 38** Estruturas do modelo (fosfato de dipentila – FDP), monômero funcional (ácido metacrílico – AMA), reticulador (dimetacrilato de etilenoglicol – DMAEG) e analitos (fosfato inorgânico, fosfato de dibutila – FDB, fosfato de tributila – FTB, e *L*- $\alpha$ -fostatidilcolina – lecitina [R = CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub> e R' = CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>]) ..... 80
- Figura 39** Voltamogramas de onda quadrada para EPCs modificados com NIP, MIP1, MIP2 e MIP3 em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> antes (círculos vazios) e após adição de 0,1mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (círculos preenchidos), FDB (quadrados vazios), FDP (quadrados preenchidos), FTB (triângulos

vazios) e lecitina (triângulos preenchidos).  $f = 40 \text{ Hz}$ ;  $a = 100 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$  ..... 81

**Figura 40** Possível interação entre o sítio formado pela impressão molecular de fosfato de dipentila e as moléculas de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (a), FDB (b), FDP (c), FTB (d) e lecitina (e)..... 82

**Figura 41** Voltamogramas de onda quadrada para EPCs modificados com NIP, MIP1, MIP2 e MIP3 na ausência (linha superior) e presença (demais linhas) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  nas concentrações entre 20 e 300  $\text{nmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .  $f = 40 \text{ Hz}$ ;  $a = 100 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$  ..... 83

**Figura 42** Curvas de calibração para fostato dos EPCs modificados com NIP (círculos vazios), MIP1 (círculos preenchidos), MIP2 (quadrados vazios) e MIP3 (quadrados preenchidos)..... 84

**Figura 43** Exemplo de eletroferograma para eletroforese capilar de ácido butírico (a) e variação da área de sinal do analito com variação da concentração (b)..... 92

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> Reações de esterificação (a) e transesterificação (b) de ácidos carboxílicos .....	29
<b>Esquema 2</b> Mecanismo de catálise básica (a) e ácida (b) para a reação de transesterificação <sup>(18)</sup> .....	31
<b>Esquema 3</b> Representação da reação de saponificação de ácidos carboxílicos .....	32
<b>Esquema 4</b> Preparação de MIP por polimerização radicalar, onde M = Modelo; MF = monômero funcional; XL = reticulador; IR = iniciador radicalar; POR = solvente (porogênio); $\Delta$ = aquecimento; $\nu$ = radiação ultravioleta.....	35
<b>Esquema 5</b> Reações de butanólise de ácido butírico (a); butanólise (b), pentanólise (c) e octanólise (d) de ácido valérico. ....	47
<b>Esquema 6</b> Reação para preparo de fosfato de dipentila.....	50



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Exemplos de MIPs com alguns parâmetros catalíticos.....	41
<b>Tabela 2</b> Exemplos do emprego de polímeros impressos molecularmente para a modificação química de eletrodos de pasta de carbono.....	44
<b>Tabela 3</b> Composição em quantidade de matéria (mol) dos polímeros preparados com o Modelo fosfato de dipentila .....	54
<b>Tabela 4</b> Características dimensionais das partículas de MIPs/NIP preparadas por polimerização em bloco.....	55
<b>Tabela 5</b> Composição dos polímeros preparados por polimerização por precipitação .....	64
<b>Tabela 6</b> Características dimensionais das partículas de MIPs/NIP preparadas por polimerização por precipitação.....	65
<b>Tabela 7</b> Reações de esterificação acompanhadas cineticamente .....	69
<b>Tabela 8</b> Parâmetros analíticos das curvas de calibração para EPCNIP e EPCMIPs.....	84



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMA	Ácido metacrílico
AET	Análogo estável ao estado de transição
AIBN	azoisobutironitrila
BPONP	<i>N</i> -tert-butoxicarbonil fenilalanina- <i>p</i> -nitrophenil éster
BSIP	etil-Boc- <i>S</i> -(-)-fenilalaninil-4-(Boc-imino)benzilfosfonato
BSPONP	Boc- <i>S</i> -(-)-fenilalanina- <i>p</i> -nitrofenil éster
CAS	do inglês <i>Chemical Abstracts Service</i>
Cat.	catalisador
CG	cromatografia gasosa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
d	duplete
DMAEG	dimetacrilato de etilenoglicol
DMT-MM	cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio
DVB-80	divinilbenzenos 80%
Ef.	eficiência
EPC	eletrodo de pasta de carbono
ET	estado de transição
hex.	hexanol
IR	iniciador radicalar
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
m	multiplete
M	modelo
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	monômero funcional
MIP	polímero impresso molecularmente
NIP	polímero não impresso molecularmente (branco)
PNA	do inglês <i>p</i> -nitrophenyl acetate (acetato de <i>p</i> -nitrofenila)
PNP	do inglês <i>p</i> -nitrophenyl phosphate (fosfato de <i>p</i> -nitrofenila)
PNPA	do inglês <i>p</i> -nitrophenyl acetate (acetato de <i>p</i> -nitrofenila)
PNPS	do inglês <i>p</i> -nitrophenyl salicylate (salicilato de <i>p</i> -nitrofenila)
POR	porogênio (solvente)

ppm	parte por milhão
q	quarteto
R ou R'	grupo alquila
Ref.	referência
RMN de $^{13}\text{C}$	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de $^1\text{H}$	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de $^{31}\text{P}$	ressonância magnética nuclear de fósforo 31
s	simpleto
S	substrato
UV	ultravioleta
XL	reticulador
$\Delta$	aquecimento
$\delta$	deslocamento químico
$\nu$	radiação ultravioleta
$\nu$	(Seção 6.8.2) velocidade de varredura

## SUMÁRIO

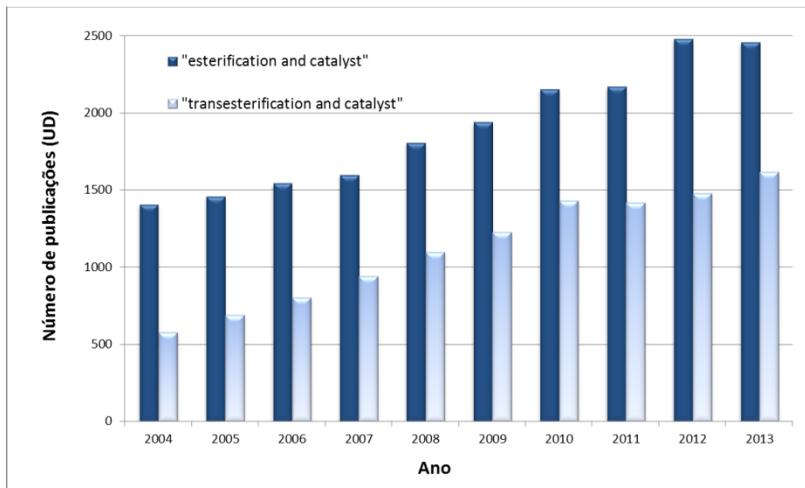
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO	29
2.1.1 CATÁLISE EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO .....	30
2.1.1.1 CATÁLISE HOMOGÊNEA PARA ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO .....	30
2.1.1.2 CATÁLISE HETEROGÊNEA PARA ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO .....	32
2.2 IMPRESSÃO MOLECULAR.....	33
2.2.1 ETAPAS NO PREPARO DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS .....	35
2.2.1.1 ESCOLHA DO MODELO E DOS MONÔMEROS FUNCIONAIS (ETAPA DE PRÉ-POLIMERIZAÇÃO).....	35
2.2.1.2 POLIMERIZAÇÃO E RETICULAÇÃO .....	38
2.2.1.3 EXTRAÇÃO DO MODELO .....	39
2.2.2 EXEMPLOS DO USO DE MIPs EM CATÁLISE DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO .....	39
2.3 UTILIZAÇÃO DE MIPs NA CONFECÇÃO DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	42
<b>3 OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>45</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
4.1 MIPs COMO CATALISADORES DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO .....	47
4.1.1 REAÇÕES-MODELO .....	47
4.1.2 MODELOS E MONÔMEROS FUNCIONAIS UTILIZADOS .....	47
4.1.3 PREPARO DO MODELO FOSFATO ÁCIDO DE DIALQUILA .....	49
4.1.4 SÍNTESE DOS MIPs.....	54
4.1.4.1 POLIMERIZAÇÃO EM BLOCO.....	54
4.1.4.2 POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO .....	61
4.1.5 ESTUDOS DE CATÁLISE .....	66
4.1.5.1 ESCOLHA DO TIPO DE CATÁLISE.....	66
4.1.5.2 ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	66
4.1.5.2.1 Acompanhamento das reações de esterificação por titulação potenciométrica .....	66
4.1.5.2.2 Acompanhamento das reações de esterificação por eletroforese capilar.....	67

4.1.5.3 RESULTADOS EM CATÁLISE .....	67
4.2 MIPS COMO GERADORES DE SELETIVIDADE EM ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATOS .....	77
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>6 EXPERIMENTAL.....</b>	<b>87</b>
6.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO.....	87
6.2 PREPARO DO FOSFATO DE DIPENTILA.....	87
6.3 PREPARO DE MIPS/NIP POR POLIMERIZAÇÃO EM BLOCO.....	88
6.3.1 PREPARO DE MIP1.....	88
6.3.2 PREPARO DE MIP2.....	89
6.3.3 PREPARO DE MIP3.....	89
6.3.4 PREPARO DE NIP.....	89
6.4 TESTE DE POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO.....	89
6.5 PREPARO DE MIPS/NIPS POR POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO.....	90
6.5.1 PREPARO DE MIP6.....	90
6.5.2 PREPARO DE MIP7.....	90
6.5.3 PREPARO DE MIP8.....	91
6.5.4 PREPARO DE MIP9.....	91
6.5.5 PREPARO DE MIP10.....	91
6.5.6 PREPARO DE NIP6 A NIP10.....	91
6.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS BUTÍRICO E VALÉRICO POR ELETROFORESE CAPILAR.....	91
6.7 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO UTILIZADAS NO ESTUDO DE CATÁLISE.....	93
6.8 MIPS COMO MODIFICADORES DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATOS .....	93
6.8.1 PREPARO DE SENSORES .....	93
6.8.2 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	94
6.8.3 CÁLCULOS ESTATÍSTICOS.....	94
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>

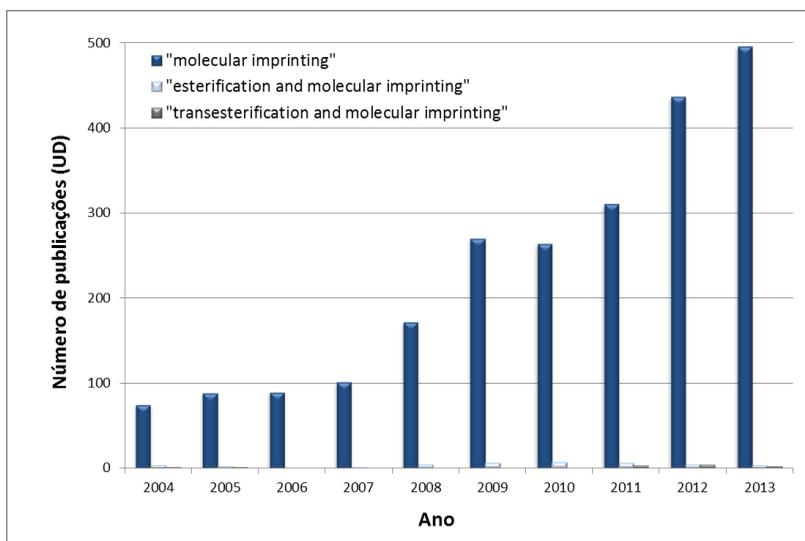
# 1 INTRODUÇÃO

Embora a utilização de óleos de origem natural como materiais combustíveis e lubrificantes remonte à antiguidade, somente nas últimas décadas a crescente preocupação com aspectos econômico-ambientais renovou o interesse no uso de óleos naturais com propósitos não-comestíveis.<sup>(1)</sup> A utilização de derivados com alto valor agregado, como combustíveis, lubrificantes e cosméticos, entre outros, demanda cada vez mais a necessidade de aprimoramento da eficiência das reações envolvidas no preparo desses produtos, dentre elas principalmente as reações de esterificação e transesterificação. A principal estratégia utilizada pelas indústrias para melhorar a eficiência de tais reações é a utilização de catalisadores. Contudo os catalisadores atuais mais eficientes apresentam sérios inconvenientes técnicos, como corrosão de equipamentos (no caso do uso de catalisadores ácidos homogêneos) e formação de espuma por saponificação (no caso do uso de catalisadores básicos homogêneos). Nesse sentido, o desenvolvimento de novos catalisadores é de fundamental importância para aumentar a eficiência de tais reações.

Com isso, nas últimas décadas o interesse acadêmico no desenvolvimento de catalisadores para as reações de esterificação e transesterificação aumentou substancialmente, como pode ser observado na **Figura 1**. Nesses trabalhos, diversas são as metodologias e os tipos de catalisadores empregados, mas poucos demonstram capacidade de aliar eficiência, seletividade, reciclabilidade e estabilidade térmica em um único sistema. É a partir dessa motivação que este trabalho se concentra no desenvolvimento de novos catalisadores para as reações de esterificação e transesterificação, baseando-se na estratégia de utilizar a técnica de impressão molecular. Essa técnica tem por diferencial a construção de sítios ativos específicos e complementares a uma determinada reação de interesse, proporcionando uma catálise altamente eficiente e seletiva, associada com a capacidade de recuperação através da estrutura polimérica. Apesar do aumento expressivo da utilização dessa técnica nas mais diversas aplicações, pouco se tem utilizado nas reações de esterificação e transesterificação (**Figura 2**). Esse quadro demonstra que o emprego da técnica de impressão molecular para obter catálise em reações de esterificação e reações semelhantes é um campo inovador de pesquisa na área de produção de biocombustíveis e biolubrificantes.

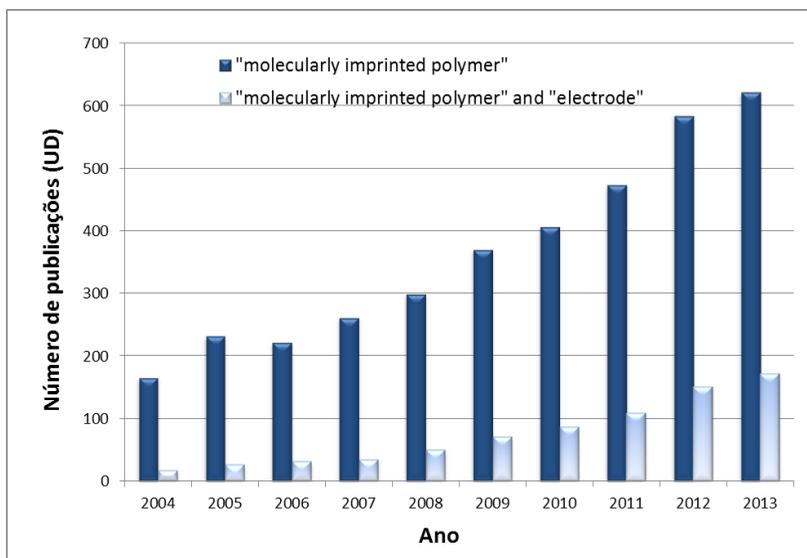


**Figura 1** Publicações encontradas pela ferramenta SciFinder (CAS) com os conceitos “*esterification and catalyst*” e “*transesterification and catalyst*”



**Figura 2** Publicações encontradas pela ferramenta SciFinder (CAS) com os termos “*molecular imprinting*”, “*esterification and molecular imprinting*” e “*transesterification and molecular imprinting*”

Paralelamente ao emprego de polímeros impressos molecularmente (MIPs) como catalisadores de reações químicas, outra importante aplicação para esse tipo de material é a modificação de eletrodos para torná-los seletivamente sensíveis a determinada molécula ou grupo de moléculas.<sup>(2)</sup> Por serem materiais insolúveis são particularmente propícios a serem utilizados como modificadores de eletrodos de pasta de carbono, onde um compósito insolúvel é formado pela mistura de grafite e óleo mineral. O uso de MIPs na modificação de eletrodos em geral é um alvo de pesquisa que tem crescido nos últimos anos, porém não tem acompanhado o grande aumento no interesse por impressão molecular (**Figura 3**). Essa constatação evidencia a importância do estudo de novos empregos de MIPs para a modificação de eletrodos de pasta de carbono com fins analíticos.



**Figura 3** Publicações encontradas pela ferramenta SciFinder (CAS) com os termos “*molecularly imprinted polymer*” e “*molecularly imprinted polymer and electrode*”

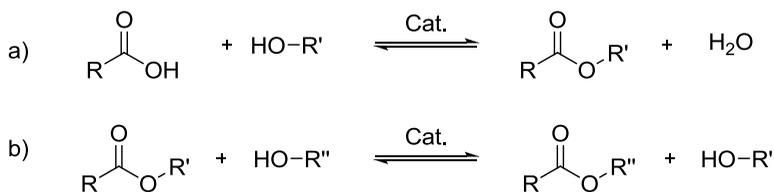


## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO

Dentre as reações de formação de éster, temos a reação entre um ácido carboxílico e um álcool, comumente chamada de reação de esterificação (**Esquema 1 a**). Trata-se de uma reação em equilíbrio e para deslocar esse para a formação dos produtos, tem-se que utilizar excesso de algum reagente, ou promover a retirada de um dos produtos constantemente, além da utilização de um catalisador. Outra reação de grande importância é a reação entre um éster e um álcool para a formação de um novo éster e álcool, conhecida como transesterificação (**Esquema 1 b**). Essa, assim como a esterificação, também é uma reação de equilíbrio e requer os mesmos procedimentos para que se tenha um rendimento favorável de produtos, além de problemas adicionais da formação de diferentes fases após a reação.<sup>(3)</sup>

As reações de esterificação e transesterificação<sup>(4)</sup> (**Esquema 1**) de ácidos carboxílicos são importantes ferramentas sintéticas na obtenção de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos, principais componentes de biocombustíveis e biolubrificantes, entre outras diversas aplicações.<sup>(5)</sup>



**Esquema 1** Reações de esterificação (a) e transesterificação (b) de ácidos carboxílicos

## 2.1.1 CATÁLISE EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO

A reação de esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois necessita, para fins práticos, de catálise ou outro método de aceleração. Por exemplo, Díaz *et al.*, estudando novos catalisadores, acompanharam a esterificação de ácido olêico a 100 °C e ácido láurico a 90 °C com glicerol (proporção 1:1), como reação controle, e obtiveram rendimentos menores que 5%, mesmo após 24 h de reação.<sup>(6)</sup>

A reação não catalisada de transesterificação de triacilgliceróis também requer condições especiais de temperatura e pressão para a obtenção de rendimentos satisfatórios. Özbay *et al.*, por exemplo, estudando resinas de troca iônica na transesterificação de óleo residual de fritura com metanol, obtiveram, com a reação não catalisada a 60 °C, rendimentos de apenas 2,5% em 180 min de reação.<sup>(7)</sup> Já Saka e Kusdiana empregaram metanol supercrítico com temperaturas de até 400 °C e pressões entre 45 e 65 MPa para conseguirem rendimentos equivalentes ao método de catálise alcalina homogênea com hidróxido de sódio a 60 °C e pressão ambiente.<sup>(8)</sup>

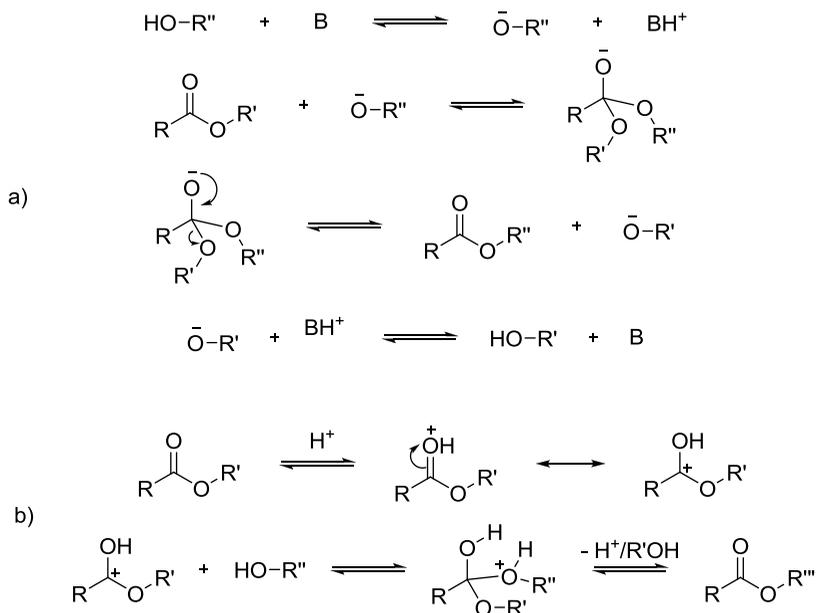
Estudos para acelerar a produção de ésteres, quer por transesterificação ou esterificação, incluem a utilização de catálise homogênea e heterogênea, podendo ser ainda básica ou ácida.<sup>(9)</sup> Essas reações também podem ser aceleradas através de catálise enzimática,<sup>(10)</sup> ou ainda catálise enzimática em fluidos supercríticos.<sup>(11)</sup> A catálise ácida homogênea apresenta como desvantagem a possibilidade de corrosão dos equipamentos utilizados industrialmente,<sup>(10)</sup> enquanto que a catálise homogênea básica tem como desvantagem a formação de sabão quando a matéria prima utilizada possui ácidos carboxílicos livres.<sup>(9)</sup>

### 2.1.1.1 CATÁLISE HOMOGÊNEA PARA ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO

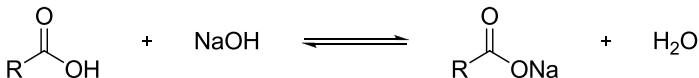
A catálise homogênea para reações de esterificação e transesterificação compreende, entre outros métodos, catálise enzimática, utilização de agentes de condensação, catálise básica (**Esquema 2 a**) com hidróxidos de metais alcalinos, principalmente hidróxido de sódio e catálise ácida (**Esquema 2 b**), com ácidos de brønsted ou de Lewis.<sup>(3)</sup> Exemplos de catálise com lipase podem ser encontrados na literatura.<sup>(12)</sup> Akoh *et al.* revisaram a abordagem enzimática para a produção de biodiesel<sup>(13)</sup> enquanto Carrea *et al.* elaboraram revisão sobre catálise enzimática em esterificação e

transesterificação em solventes orgânicos.<sup>(14)</sup> Os agentes de condensação são compostos que promovem a ativação da carbonila do ácido carboxílico. Destacam-se, entre outros, diciclohexilcarbodiimida (DCC), que pode ser usada à temperatura ambiente e com álcoois terciários<sup>(3;4)</sup> e DMT-MM e análogos<sup>(15;16)</sup>, que podem ser utilizados na presença de água.

Atualmente a maioria do biodiesel produzido provém da transesterificação de triacilgliceróis com metanol na presença de hidróxido de sódio ou de potássio, a uma temperatura entre 60-80 °C,<sup>(17)</sup> porém, em óleos com elevada acidez (concentração de ácidos graxos livres > 0,5%), o método de catálise básica não é indicado, pela reação concorrente de saponificação dos ácidos graxos (**Esquema 3**). Esse tipo de matéria prima requer a esterificação desses ácidos para posterior transesterificação do triacilglicerol e dos ésteres provindos da esterificação dos ácidos.<sup>(10)</sup>



**Esquema 2** Mecanismo de catálise básica (a) e ácida (b) para a reação de transesterificação<sup>(18)</sup>



**Esquema 3** Representação da reação de saponificação de ácidos carboxílicos

### 2.1.1.2 CATÁLISE HETEROGÊNEA PARA ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO

Estudos de catálise heterogênea para produção de biodiesel compreendem a utilização de bases (óxidos, hidróxidos, carbonatos e alcóxidos de metais alcalinos) em metanol sob refluxo, em estado supercrítico ou sob radiação de micro-ondas, zeólitas básicas e ácidos, incluindo Amberlyst<sup>®</sup> 15 (resina de ácido poliestirenosulfônico), zircônia sulfatada, Nafion<sup>®</sup> NR50 (resina de ácidos sulfônicos de alcanos perfluorados), zircônia tungstenada, ácido fosfórico imobilizado, zeólita  $\beta$ , e zeólita ETS-10 (H).<sup>(17;19;20)</sup> Embora haja vários estudos empregando óxidos de metais alcalino-terrosos e de metais de transição imobilizados em suportes sólidos, como alumina, óxido de zinco, silicatos e óxido de zircônio como catalisadores para a reação de transesterificação, a maioria desses processos emprega grande gasto de energia, seja na preparação do catalisador, seja no emprego do mesmo.<sup>(21)</sup>

Encontram-se ainda, na literatura, catalisadores não convencionais, como o desenvolvido por pesquisadores japoneses a partir da carbonização incompleta de açúcares seguida de sulfonação, utilizado para esterificação de ácidos graxos, onde se obteve desempenho superior aos catalisadores sólidos ácidos convencionais.<sup>(22)</sup>

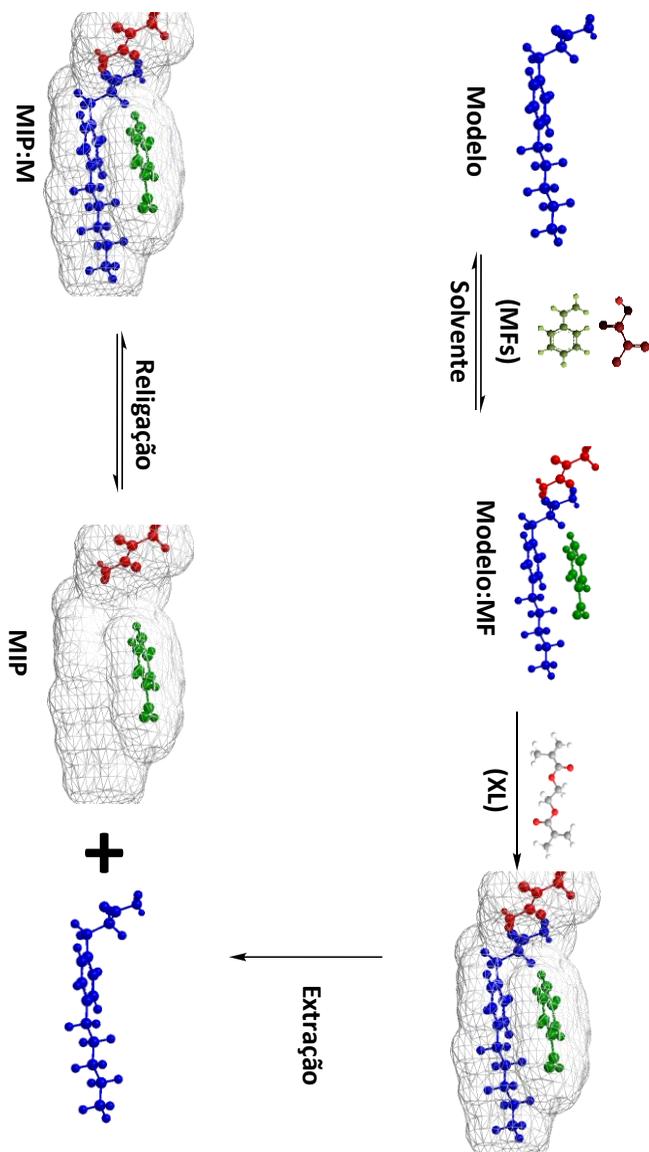
Outra classe de catalisadores heterogêneos desenvolvida, mas pouco explorada para esterificação e transesterificação, baseia-se na técnica conhecida por impressão molecular, que se inspira nos processos químicos naturais e mimetiza o sítio ativo de uma enzima.

## 2.2 IMPRESSÃO MOLECULAR

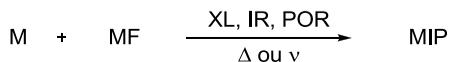
Nesse método, desenvolve-se uma rede polimérica com forma e funcionalidade complementares a uma determinada molécula, denominada modelo (M), resultando no preparo de um material que tem afinidade preferencial de ligação à molécula a qual serviu de modelo. Esse material é comumente denominado de polímero impresso molecularmente (MIP) e pode-se encontrar na literatura um grande número de artigos de revisão que abordam o método de preparo e utilizações tecnológicas de MIPs. (23-45)

Basicamente, começa-se o processo com o posicionamento do(s) monômero(s) funcional(is) (MF) em torno da molécula a ser moldada (M). Os monômeros (geralmente vinílicos) interagem com o modelo por meio de interações que podem ser covalentes reversíveis ou não covalentes para formar uma nova molécula ou um complexo. Os monômeros são posteriormente polimerizados na presença de moléculas chamadas de reticuladores (XL), que formam a massa principal do polímero e formam redes tridimensionais em torno do modelo de forma a fixar a posição dos grupos funcionais, responsáveis pelas interações com o modelo, no espaço. Extrai-se o modelo, deixando o polímero com cavidades contendo grupos funcionais capazes de realizar o reconhecimento espacial da molécula modelo e/ou de isómeros (**Figura 4 e Esquema 4**). O material resultante será aqui chamado de **MIP** ou receptor e a molécula que eventualmente se ligue ao sítio formado será chamada de **substrato**. Paralelamente ao preparo de um MIP, é necessária a preparação de um polímero não impresso molecularmente, chamado **NIP**, que é preparado exatamente como o MIP, porém sem a presença da molécula modelo. Um NIP é preparado para se verificar a presença de sítios de ligação do substrato que sejam formados pela organização dos monômeros funcionais em torno do modelo. Pode ser considerado um controle negativo ou “branco”.

Os MIPs podem atuar como catalisadores pela diminuição da barreira de energia de ativação do estado de transição da reação a ser catalisada. Essa diminuição da energia de ativação é supostamente conseguida pela presença de grupos funcionais estrategicamente posicionados tridimensionalmente no sítio de reconhecimento molecular à semelhança do que acontece no sítio ativo de uma enzima.<sup>(40;46)</sup>



**Figura 4** Processo de impressão molecular, onde MFs = monômeros funcionais e XL = reticulador



**Esquema 4** Preparação de MIP por polimerização radicalar, onde M = Modelo; MF = monômero funcional; XL = reticulador; IR = iniciador radicalar; POR = solvente (porogênio);  $\Delta$  = aquecimento;  $\nu$  = radiação ultravioleta.

## 2.2.1 ETAPAS NO PREPARO DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

### 2.2.1.1 ESCOLHA DO MODELO E DOS MONÔMEROS FUNCIONAIS (ETAPA DE PRÉ-POLIMERIZAÇÃO)

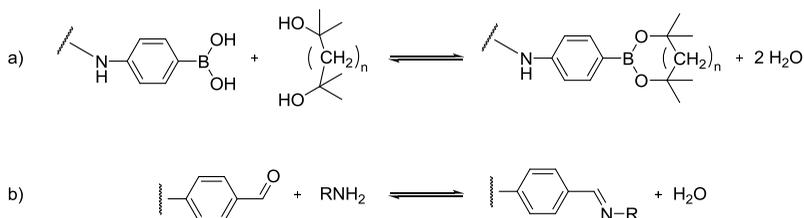
O desenvolvimento de um MIP começa com a escolha da molécula modelo, cuja forma e funcionalidade complementar serão “memorizadas” pelo polímero resultante. Essa escolha depende do objetivo do material a ser desenvolvido. Quando se quer produzir uma fase estacionária cromatográfica, ou um material para concentrar determinada molécula, a própria molécula a ser separada ou concentrada geralmente é utilizada como modelo,<sup>(47;48)</sup> já quando o objetivo é obter uma “enzima artificial”, pode-se modelar substratos,<sup>(49)</sup> análogos estruturais estáveis do estado de transição (AET),<sup>(50;51)</sup> ou até mesmo produtos da reação-alvo da catálise.<sup>(52)</sup>

O contato entre monômero funcional e modelo leva à formação de uma nova molécula ou complexo, de cuja estrutura e estabilidade depende o comportamento do polímero resultante como material de reconhecimento molecular. O sucesso do MIP depende do grau de afinidade entre modelo e monômeros funcionais. As moléculas envolvidas devem ter afinidade forte suficiente para que o complexo M:MF sobreviva às condições de polimerização e reticulação; por outro lado deve ser lábil suficiente para permitir a extração do modelo da matriz polimérica, bem como a transferência de massa no processo de reconhecimento ou religação MIP:substrato.

A interação total entre modelo e monômeros funcionais depende do número de interações e da força de cada interação individualmente.

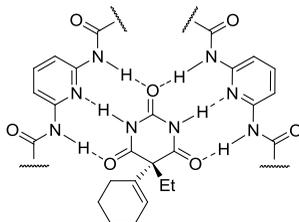
Consoante o tipo de ligação química envolvido no reconhecimento da molécula modelo, diferentes abordagens podem ser utilizadas, como por exemplo:

a) abordagem covalente, onde as ligações entre modelo e monômero funcional e, posteriormente, entre MIP e substrato se dão através de ligações covalentes. Exemplos dessa abordagem são a formação de éster borônico (**Figura 5 a**) e formação de base de Schiff (**Figura 5 b**);<sup>(53;54;55;56)</sup>



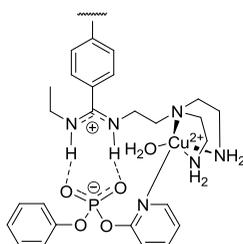
**Figura 5** Exemplos de interação M:MF utilizando ligações covalentes. a) formação de éster borônico para reconhecimento de modelo diol e b) formação de base de Schiff para reconhecimento de modelo amina primária.

b) abordagem não covalente, onde o reconhecimento molecular opera por interações reversíveis não covalentes, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , entre outras, obtidas pela simples mistura dos componentes (**Figura 6**);<sup>(53;54)</sup>



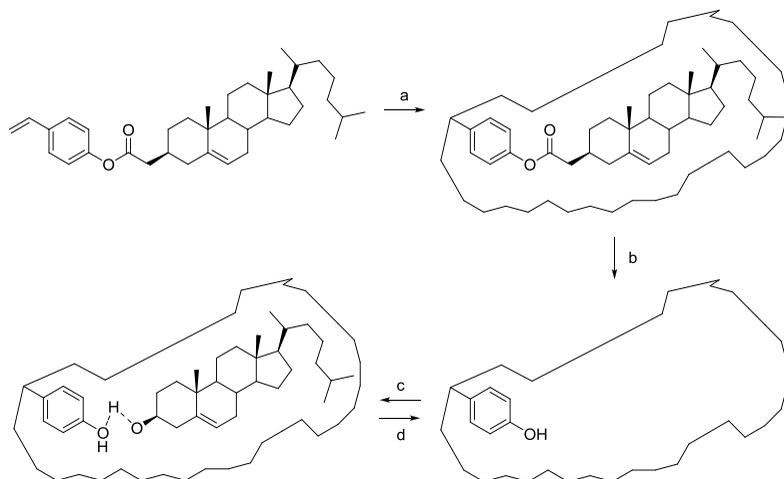
**Figura 6** Estrutura postulada para a cavidade de MIP ocupada por substrato utilizando interações não covalentes (ligações de hidrogênio) (adaptada de Wulff 2002)

c) utilização de ligações coordenativas do tipo metal-ligante para promoção do reconhecimento (**Figura 7**).<sup>(57)</sup> Essa técnica, quando utilizada para o reconhecimento molecular pode oferecer vantagens como alta entalpia de ligação comparativamente à ligação de hidrogênio, o que permite que se trabalhe em solventes próticos como a água. Pode-se conseguir seletividade de ligação MIP:substrato explorando propriedades de ligação específicas do complexo, utilizando também propriedades estereoeletrônicas de substituintes do ligante. O uso de metais para formar sítios de ligação é uma idéia bioinspirada, já que várias enzimas apresentam metais em seus sítios de ligação.<sup>(58)</sup>



**Figura 7** Interações modelo-MF mediada por metais<sup>(57)</sup>

d) uso da combinação da abordagem covalente, durante o preparo do MIP, e abordagem não covalente, quando da ligação MIP:substrato (**Figura 8**).<sup>(53;54;59)</sup> Essa abordagem apresenta a vantagem de se permitir o uso de uma estequiometria controlada modelo:MF, evitando-se assim o uso de excesso de MF e conseqüente formação de sítios de baixa afinidade que são formados pelas moléculas de MF excedentes. Uma possível desvantagem seria a deformação da geometria do sítio de reconhecimento causada pelas condições de hidrólise.<sup>(60)</sup>



**Figura 8** Preparação de MIP utilizando interações covalentes durante a polimerização e reticulação (a) e extração da molécula de modelo (b). Durante a utilização do polímero, interações do tipo ligação de hidrogênio (c) e (d). Adaptado de Whitcombe, 1995.<sup>(59)</sup>

### 2.2.1.2 POLIMERIZAÇÃO E RETICULAÇÃO

O método de polimerização escolhido deve permitir a manutenção da integridade do complexo formado na etapa de pré-polimerização. O método mais utilizado na construção de MIPs é a polimerização radicalar, onde utiliza-se um iniciador radicalar como azoisobutironitrila (AIBN), que pode ser ativado termicamente (60 °C) ou por radiação UV. O uso de radiação UV para ativar o iniciador oferece a vantagem de se poder trabalhar a temperaturas baixas, onde a integridade do complexo modelo:MF é mais facilmente mantida.

A reticulação é conseguida com a utilização de reticuladores (XL), que consistem de moléculas de monômeros com mais que um ponto de polimerização, comumente dois ou três. O uso de XL garante rigidez ao material produzido. Novamente deve-se buscar um equilíbrio entre rigidez, que mantém o formato do sítio de reconhecimento molecular, e maleabilidade, que facilita a entrada e acomodação do substrato no sítio.

A forma final do MIP também depende da maneira como é realizada a polimerização e reticulação. O método mais utilizado é o de polimerização em bloco (encontrado na literatura como *bulk*

*polymerization*), onde o polímero é preparado como um bloco no formato do recipiente reacional que posteriormente é pulverizado e sua granulometria normalizada por meio de peneiras.<sup>(61;62;63)</sup> Utilizam-se também outros métodos, onde o material já é preparado com o tamanho final, geralmente esferas de dimensões micrométricas ou nanométricas, como polimerização em suspensão ou emulsão,<sup>(64)</sup> polimerização por precipitação<sup>(65;66)</sup> e uso de reatores especiais, onde se consegue controle do tamanho das partículas por ajuste do fluxo dos reagentes.<sup>(67)</sup>

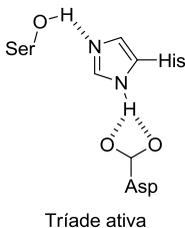
### 2.2.1.3 EXTRAÇÃO DO MODELO

Após o preparo do polímero e padronização de sua granulometria, quando for o caso, procede-se à extração do modelo, que é uma etapa essencial para a formação do sítio de reconhecimento molecular. Geralmente é efetuada com mistura de solventes,<sup>(47)</sup> comumente solução metanólica de ácido acético.<sup>(68)</sup> As moléculas passíveis de extração são as que se encontram na superfície da matriz polimérica. Daí a importância da porosidade e tamanho de partícula, parâmetros que afetam diretamente a área superficial do material.

A etapa de extração do modelo finaliza o preparo de um MIP, formando cavidades que contêm grupos funcionais estrategicamente dispostos de forma a receber a molécula do substrato de forma seletiva, capacitando o material produzido a efetuar o reconhecimento molecular.

### 2.2.2 EXEMPLOS DO USO DE MIPS EM CATÁLISE DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO

Exemplos de catálise em reações de esterificação e transesterificação utilizando MIPS incluem o trabalho de Meng e Sode, que utilizaram o monômero funcional 4(5)-vinilimidazol para mimetizar o resíduo de aminoácido histidila, responsável pela atividade catalítica das lipases, e utilizaram métodos computacionais para a escolha dos grupos funcionais responsáveis pelo reconhecimento molecular e estabilização dos intermediários (**Figura 9**).



**Figura 9** Triáde catalítica de lipases e estruturas dos substratos ésteres de *p*-nitrofenila, que foram utilizados como modelos (figura adaptada de Meng, Yamazaki e Sode, 2004)<sup>(69)</sup>

A inspiração em enzimas naturais também motivou Selligren *et al.* a criarem MIPs com unidades catalíticas presentes na quimotripsina (monômero de imidazol), conseguindo hidrólise enantiosseletiva de ésteres.<sup>(70)</sup>

Destaca-se também o elegante trabalho de Volkmann e Brüggemann, que utilizaram um fosfonato quiral análogo ao estado de transição (AET) para sintetizar um catalisador para hidrólise de éster baseado na construção de MIP imobilizado em aminosílica e posterior dissolução do núcleo de silicato com HF.<sup>(71)</sup> Utilizando fosfonato como AET e vinilimidazol como monômero funcional, Kawanami *et al.* prepararam MIPs capazes de catalisar a reação de hidrólise de acetato de *p*-nitrofenila.<sup>(72)</sup>

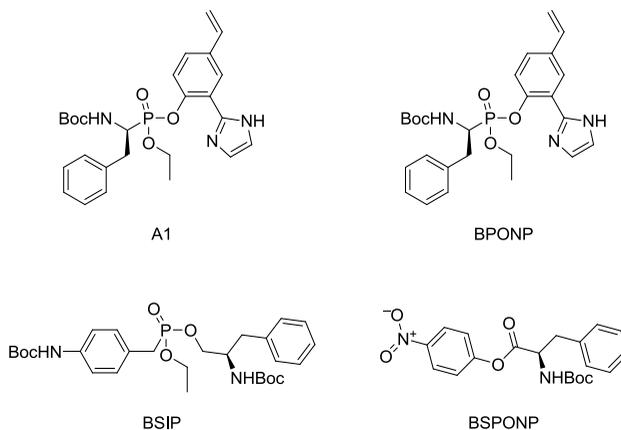
A comparação da eficiência catalítica entre MIP e NIP de polímeros preparados nos exemplos acima pode ser ilustrada na **Tabela 1** e as estruturas dos compostos envolvidos (modelos e substratos) na **Figura 10**.

**Tabela 1** Exemplos de MIPs com alguns parâmetros catalíticos

Cat. <sup>a</sup>	M <sup>b</sup>	S <sup>c</sup>	Nü <sup>d</sup>	$k_1$ ou $k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )		$k_m$ MIP(M)	Ef. rel. MIP/NIP	Ref.
				MIP	NIP			
MIC3	PNPA	PNPA	hex. <sup>e</sup>	26,2	8,67	$86,1 \times 10^{-9}$	22,6 <sup>f</sup>	(69)
		PNPS		4,83	1,36	$75,1 \times 10^{-9}$	0,87 <sup>f</sup>	(69)
MIC4	PNPS	PNPA	hex. <sup>e</sup>	80,4	8,67	$269 \times 10^{-9}$	22,2 <sup>f</sup>	(69)
		PNPS		11,4	1,36	$22,3 \times 10^{-9}$	6,9 <sup>f</sup>	(69)
MIP	BSIP	BSPONP		$1,46 \times 10^{-5}$	$1,24 \times 10^{-5}$	-	1,18 <sup>g</sup>	(71)
PA1	A1	BPONP	H <sub>2</sub> O	0,046	0,014	-	2,35 <sup>g</sup>	(70)
P2	PNP	PNA		0,023	0,011	-	2,09 <sup>g</sup>	(72)

<sup>a</sup>Nome atribuído ao catalisador pelos autores; <sup>b</sup>M=modelo; <sup>c</sup>S=substrato;

<sup>d</sup>Nü=nucleófilo; <sup>e</sup>hex.=hexanol; <sup>f</sup> $(k_{cat}/k_m)_{MIP}/(k_{obs}/k_m)_{NIP}$ ; <sup>g</sup> $k_{obs MIP}/k_{obs NIP}$



**Figura 10** Modelos utilizados na construção de MIPs (A1 e BSIP) e respectivos substratos (BPONP e BSPONP)

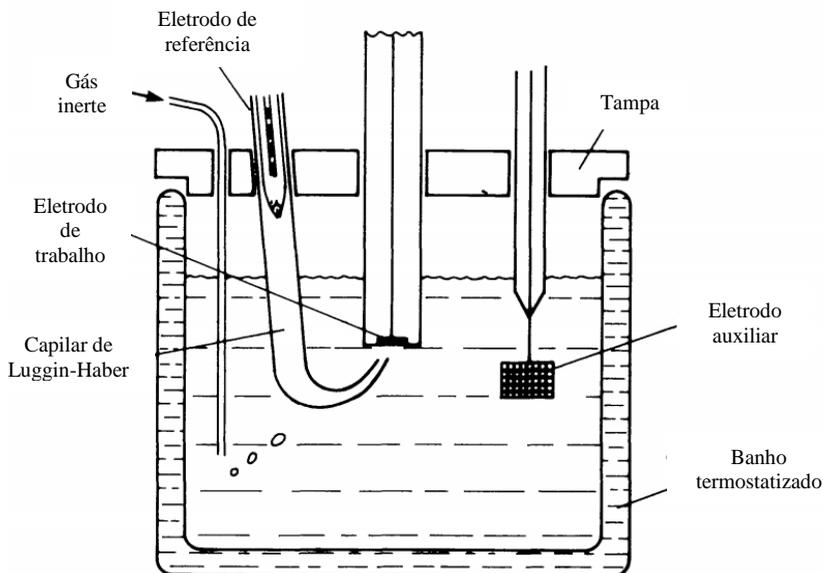
### 2.3 UTILIZAÇÃO DE MIPs NA CONFECÇÃO DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Os polímeros impressos molecularmente são materiais com capacidade de coordenação seletiva ao modelo ou a um grupo de moléculas estereoeletronicamente assemelhadas ao modelo. Esta capacidade pode ser explorada para criar sensores eletroquímicos seletivos dos mais variados tipos.<sup>(2;39)</sup>

Uma típica célula eletroquímica é composta por três eletrodos: um de referência, um auxiliar e um de trabalho. Investigam-se processos eletroquímicos que ocorrem no eletrodo de trabalho, sendo o eletrodo auxiliar utilizado para completar o circuito. O terceiro eletrodo, pelo qual não passa corrente, é utilizado apenas como potencial de referência (**Figura 11**).<sup>(73)</sup>

O eletrodo de trabalho pode ser um eletrodo de pasta de carbono, produzido pela mistura de grafite com parafinas e pode facilmente ser modificado pela incorporação de materiais insolúveis em água, como os MIPs. Dessa forma o eletrodo de trabalho torna-se seletivamente sensível à molécula que serviu de modelo para o MIP.

Nos últimos cinco anos, utilizaram-se MIPs para a modificação química de eletrodos de pasta de carbono para a detecção e quantificação de fármacos de diversas classificações quanto ao grupo funcional, como cafeína, metronidazol e sulfassalazina. Utilizou-se o mesmo método para a detecção de outras moléculas orgânicas de interesse industrial e comercial como TNT, bisfenol A e melamina, pesticidas como paraoxon e paration, e até mesmo cátions inorgânicos como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$ . Em geral têm-se alcançado um limite de detecção do analito em concentrações na ordem  $\text{nmol L}^{-1}$ . (**Tabela 2**).



**Figura 11** Típica célula eletroquímica composta por três eletrodos. Figura adaptada da referência Brett & Brett, 1994<sup>(73)</sup>

Dentre os experimentos eletroquímicos, destacam-se aqui a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada.

A voltametria cíclica consiste da aplicação de uma rampa de potencial ao eletrodo de trabalho para gradualmente mudar o potencial e reverter a varredura, retornando ao potencial inicial, o que se chama de onda triangular. Pode ser utilizada para se estudar o comportamento eletroquímico do sistema, onde se pode qualificar reações de oxidação (perda de elétrons) ou redução (ganho de elétrons) que possam ocorrer no eletrodo de trabalho. Já o experimento de voltametria de onda quadrada tornou-se popular pela velocidade e sensibilidade e pode ser utilizado para fins quantitativos. Trata-se de uma técnica onde se aplicam pulsos de tensão cujas amplitudes variam conforme uma escada com incremento  $\Delta E$ . No fim de cada pulso, a corrente, medida de forma diferencial, representa o sinal. O método tem pouca influência das correntes capacitivas por ser um método rápido.<sup>(74)</sup>

**Tabela 2** Exemplos do emprego de polímeros impressos molecularmente para a modificação química de eletrodos de pasta de carbono

<b>Analito</b>	<b>Limite de detecção (<math>10^{-9}</math> mol L<math>^{-1}</math>)</b>	<b>Referência</b>
cafeína	15	(75)
cloranfenicol	2,0	(76)
dipiridamol	0,1	(77)
hidroxizina	700	(78)
lamotrigina	0,21	(79)
metronidazole	35900	(80)
piroxicam	0,5	(81)
prometazina	3,2	(82)
prometazina	0,0028	(83)
propazina	1	(84)
sulfametoxazol	3,5	(85)
sulfassalazina	4,6	(86)
tramadol	4	(87)
tramadol	500	(88)
TNT	1,5	(89)
bisfenol A	32,22	(90)
melamina	0,7	(91)
p-nitrofenol	30	(92)
p-nitrofenol	3	(93)
parathion	0,5	(94)
paraoxon	1,0	(95)
Cu $^{2+}$	23	(96)
Cd $^{2+}$	2,75	(97)

### 3 OBJETIVOS GERAIS

Esta tese tem dois objetivos gerais que envolvem diretamente a técnica de impressão molecular:

- a) desenvolvimento de novos materiais catalíticos, capazes de acelerar reações de esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa com álcoois (metanol ou etanol) e reações de transesterificação de triacilgliceróis (principal componente de óleos e gorduras) com os mesmos álcoois, devido ao emprego do produto dessas reações na indústria de biocombustíveis e biolubrificantes;<sup>(1,98)</sup>
- b) aplicação dos materiais desenvolvidos em (a) para o desenvolvimento de método eletroquímico de quantificação de fosfatos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para se alcançar os objetivos gerais dessa tese, perseguiu-se os seguintes objetivos específicos:

- a) preparação e caracterização química de fosfato de dipentila, molécula utilizada como modelo para preparo de MIPs;
- b) preparação e caracterização físico-química de polímeros impressos molecularmente por polimerização em bloco;
- c) preparação e caracterização físico-química de polímeros impressos molecularmente por polimerização por precipitação;
- d) estudo dos MIPs preparados em (b) e (c) como candidatos a catalisadores de reações-modelo representando as reações-alvo;
- e) utilização dos MIPs preparados em (b) para a modificação de eletrodos de pasta de carbono com a finalidade de desenvolver método de quantificação de fosfatos.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

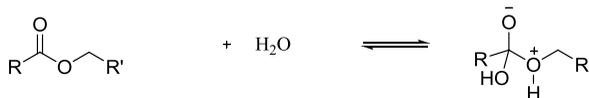
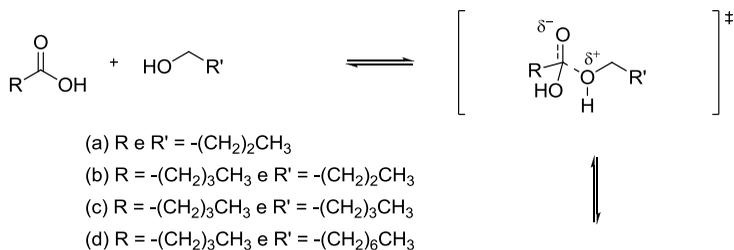
### 4.1 MIPS COMO CATALISADORES DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO

#### 4.1.1 REAÇÕES-MODELO

Para realizar estudos de catálise em esterificação e transesterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa, optou-se pela utilização das seguintes reações de esterificação como modelo:

- butanólise de ácido butírico (**Esquema 5a**);
- butanólise, pentanólise e octanólise de ácido valérico (**Esquema 5b, c e d**, respectivamente).

Essas reações apresentam estados de transição semelhantes aos das reações-alvo. A modificação no tamanho das cadeias alquílicas dos ácidos facilita o acompanhamento das reações por apresentarem-se líquidos à temperatura ambiente. As variações no tamanho das cadeias alquílicas dos álcoois possibilita o estudo da seletividade dos catalisadores.



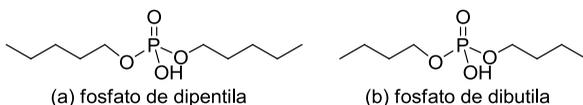
**Esquema 5** Reações de butanólise de ácido butírico (a); butanólise (b), pentanólise (c) e octanólise (d) de ácido valérico.

#### 4.1.2 MODELOS E MONÔMEROS FUNCIONAIS UTILIZADOS

Na técnica de impressão molecular a força e quantidade de ligações entre o monômero funcional e o modelo são de fundamental

importância para o desejável efeito de reconhecimento molecular.<sup>(25)</sup> Por esse motivo escolheram-se modelos e monômeros funcionais que interagissem entre si por meio de ligações não-covalentes. Escolheram-se os modelos como a seguir:

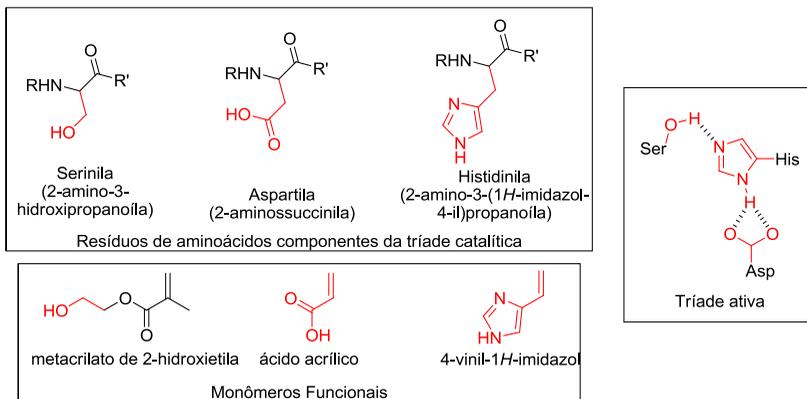
- na polimerização em bloco (**Seção 4.1.4.1**) utilizou-se como modelo fosfato de dipentila (**Figura 12a**), um análogo estrutural estável do estado de transição (AET) da reação-modelo de esterificação do ácido valérico com pentanol (**Esquema 5c**). Esse modelo foi escolhido por apresentar semelhança estrutural com o estado de transição dessa reação, ser solúvel no meio reacional e apresentar baixa toxicidade, além de apresentar aceptores de ligação de hidrogênio;
- para a polimerização por precipitação (**Seção 4.1.4.2**) utilizou-se o modelo fosfato de dibutila (**Figura 12b**) por apresentar características estruturais semelhantes ao AET da reação-modelo butanolise de ácido butírico (**Esquema 5a**), também ser solúvel no meio reacional e apresentar aceptores de ligações de hidrogênio, além de ser encontrado comercialmente com alto grau de pureza.



**Figura 12** Modelos análogos estruturais dos estados de transição (AET) das reações de esterificação dos ácidos valérico (a) e butírico (b)

Utilizou-se o ácido metacrílico como monômero funcional para as polimerizações em bloco (**Seção 4.1.4.1**). Tal escolha deve-se à possibilidade de ligações de hidrogênio entre o MF e o modelo, além de ser o mais amplamente utilizado para o preparo de MIPs.

Já nos casos de polimerização por precipitação, os monômeros funcionais foram escolhidos com base no biomimetismo de enzimas capazes de reconhecer os substratos aqui estudados: as lipases. Sabe-se que lipases possuem como tríade catalítica os resíduos serínica, histidinila e um resíduo ácido (geralmente aspartila) (**Figura 13**).<sup>(99;100)</sup> Com base nessas informações, utilizaram-se como monômeros funcionais combinações (**Tabela 5**) dos monômeros ácido acrílico, metacrilato de 2-hidroxi-etila e 4-vinil-1H-imidazol (**Figura 13**), objetivando mimetizar parte da tríade catalítica natural das lipases.



**Figura 13** Resíduos de aminoácidos (superiores) geralmente correspondentes à tríade catalítica de lipases (à direita) e MFs (inferiores) utilizados para mimetizá-la. Destacados em vermelho os grupos funcionais que interagem com o substrato RCOOR'

#### 4.1.3 PREPARO DO MODELO FOSFATO ÁCIDO DE DIALQUILA

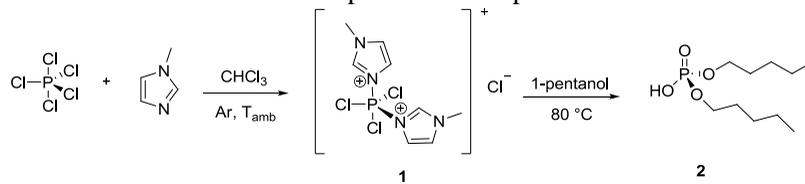
O fosfato de dipentila, utilizado como modelo para a produção dos MIPs por polimerização em bloco, foi preparado conforme método descrito na literatura (**Secção 6.2**).<sup>(101)</sup> Basicamente iniciou-se com a reação entre pentacloreto de fósforo e metilimidazol para formação do cloreto de *cis*-tetraclorobis(1-metilimidazol) fósforo (V) (**Esquema 6 composto 1**). A essa, seguiu-se uma reação entre o sal formado e excesso de pentanol para a formação do fosfato de dipentila (**Esquema 6 composto 2**).

O produto final das reações foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e RMN de  $^{31}\text{P}$ . Observou-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 14**) a presença de sinais em cinco regiões em diferentes deslocamentos químicos, compreendendo o sinal dos hidrogênios das duas metilas em  $\delta 0,9$  ppm com área equivalente a 6 H, sinal dos hidrogênios dos quatro metilenos vizinhos às metilas em  $\delta 1,4$  ppm com área equivalente a 8 H, sinal dos hidrogênios dos dois metilenos  $\beta$  em relação aos oxigênios em  $\delta 1,7$  ppm com área equivalente a 4 H, um sinal do hidrogênio RR'-POOH em  $\delta 1,9$  ppm (com deslocamento variável conforme a concentração do analito) com área equivalente a

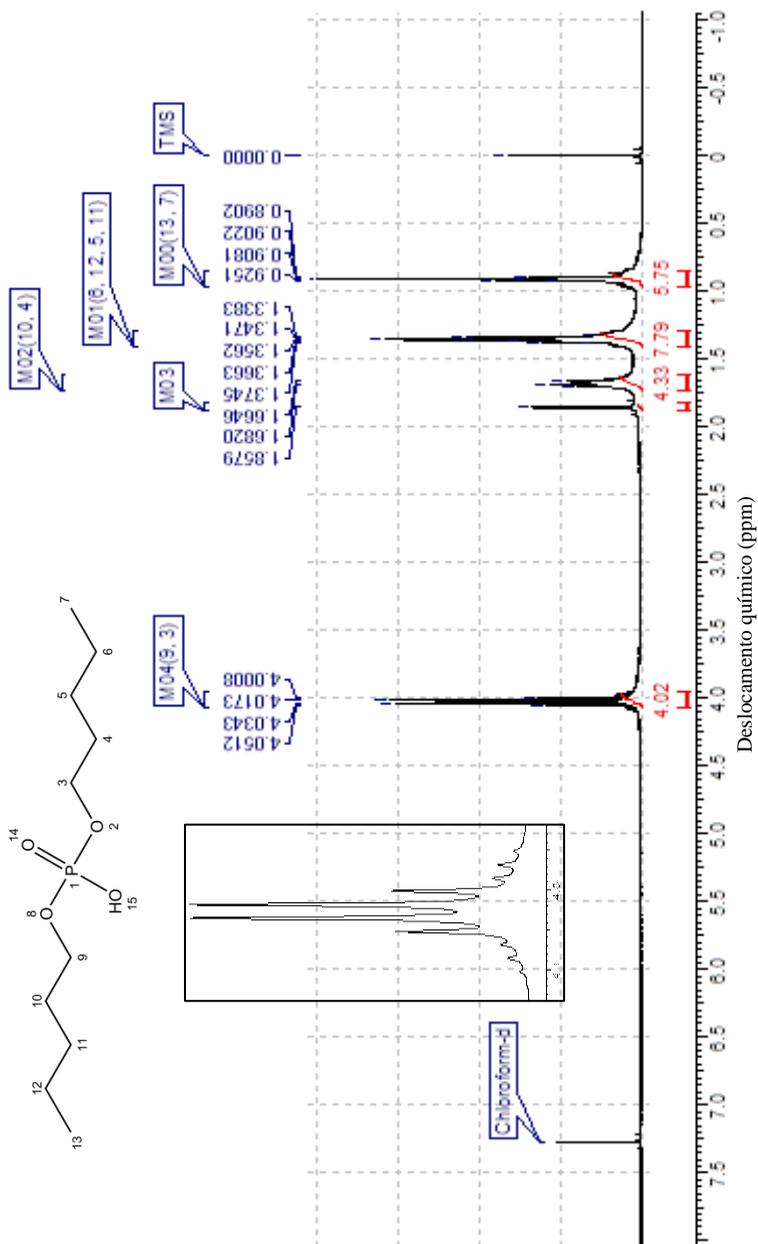
1 H e sinal dos dois metilenos vizinhos aos oxigênios em  $\delta 4,0$  ppm com área equivalente a 4H. Esse último sinal se apresenta em forma semelhante a um quarteto com  $J = 7$  Hz devida à presença de um tripleto provocado pelo acoplamento com os hidrogênios metilênicos vizinhos, e a duplicação com parcial sobreposição dos tripletos provocada pelo acoplamento entre hidrogênio e fósforo. Trata-se então de um duplo tripleto com  $J_{3\text{H-H}} = 7$  Hz e  $J_{3\text{P-H}} = 7$  Hz.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 15**) observam-se cinco sinais em deslocamentos químicos entre  $\delta 13,9$  e  $\delta 67$  ppm compatíveis com os carbonos do composto preparado.

O espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  (**Figura 16**) apresenta um sinal em  $\delta 0,00$  ppm em forma de quinteto ( $J = 7$  Hz) resultante do acoplamento com quatro hidrogênios metilênicos vizinhos aos oxigênios. A presença de um único sinal corrobora a pureza do composto.



**Esquema 6** Reação para preparo de fosfato de dipentila



**Figura 14** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do fosfato de dipentila

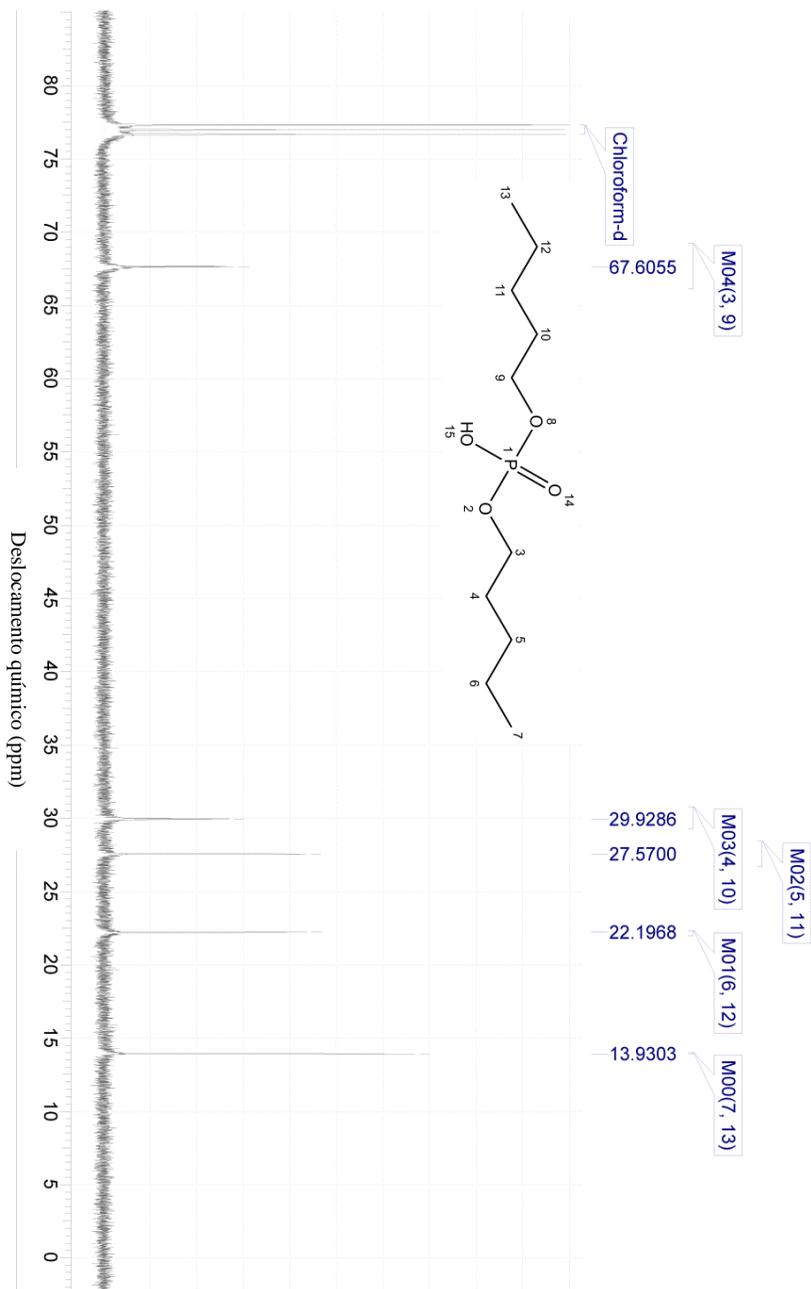


Figura 15 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do fosfato de dipentila

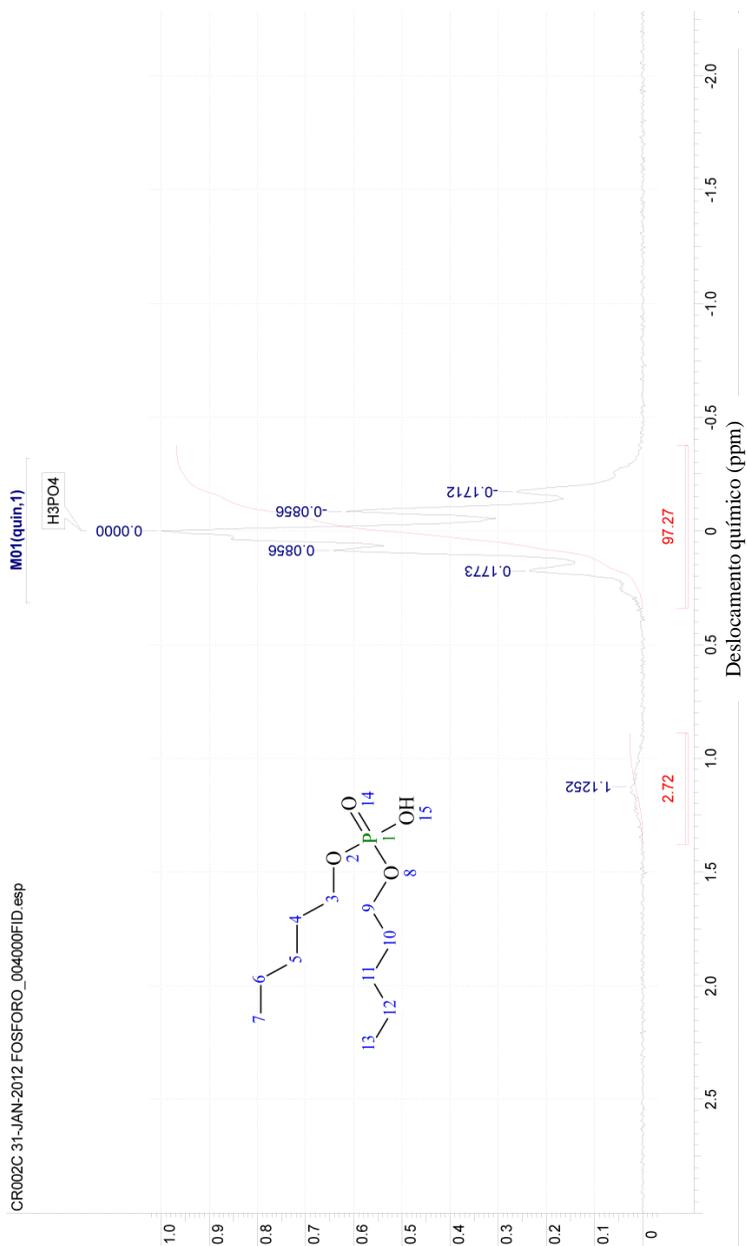


Figura 16 Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  do fosfato de dipentila

#### 4.1.4 SÍNTESE DOS MIPs

Os MIPs foram preparados por polimerização radicalar termicamente ativada, utilizando-se dois métodos diferentes, a polimerização em bloco<sup>(61)</sup> e a polimerização por precipitação.

##### 4.1.4.1 POLIMERIZAÇÃO EM BLOCO

Prepararam-se quatro polímeros por polimerização radicalar termicamente ativada utilizando-se a polimerização em bloco, sendo três MIPs e um NIP (**Seção 6.3**). Utilizaram-se fosfato de dipentila, ácido metacrílico e dimetacrilato de etilenoglicol como modelo (M), monômero funcional (MF) e reticulador (XL), respectivamente. Os três MIPs diferem entre si com respeito à razão entre monômero funcional e modelo ( $[MF]/[M]$ ), com o objetivo de preparar complexos pré-polimerização com estequiometrias diferenciadas (**Tabela 3**) e estudar o efeito da estequiometria na resultante atividade catalítica pretendida. A razão  $[XL]/[MF]$  foi mantida em 10 para que não houvesse modificações na rigidez dos materiais.

Preparou-se o polímero NIP na ausência do modelo para avaliação da coordenação não seletiva do modelo ao material final, que supostamente é devida à presença de sítios de ligação não seletivos formados apenas pela composição do polímero e não pelo arranjo espacial e complementaridade funcional adquiridos durante o processo de impressão molecular.

**Tabela 3** Composição em quantidade de matéria (mol) dos polímeros preparados com o Modelo fosfato de dipentila

Polímero	MF (AMA)	XL (DMAEG)	Modelo	Porogênio	$\frac{[MF]}{[M]}$	$\frac{[XL]}{[MF]}$
MIP1	0,0020	0,020	0,0010	0,0572	2	10
MIP2	0,0020	0,020	0,0005	0,0572	4	10
MIP3	0,0020	0,020	0,0003	0,0572	6	10
NIP	0,0020	0,020	-	0,0572	-	10

Cada polímero formado foi pulverizado e peneirado em três frações, conforme o tamanho. A fração F1 (diâmetro < 45 µm) dos polímeros foi enviada a Fernando Santos de Souza, do Grupo de estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos, de responsabilidade do Prof. Almir Spinelli para a possível utilização na confecção de eletrodos sensíveis à molécula modelo (**Seção 4.2**). A fração F2 (45 µm < diâmetro < 125 µm) foi utilizada nos estudos de catálise nas reações-modelo (**Seção 4.1.5**). A análise no IV dos polímeros mostrou que eles apresentaram as bandas principais em 1731 cm<sup>-1</sup> pelo estiramento C=O; 1156 cm<sup>-1</sup> pelo estiramento C-O e bandas em 2955 e 2988 cm<sup>-1</sup> relativas aos estiramentos alifáticos simétrico e assimétrico de C-H, respectivamente. Nota-se a ausência de banda em torno de 2240 cm<sup>-1</sup>, evidenciando-se a ausência do iniciador radicalar AIBN (**Figura 17 a Figura 20**). A análise por difração a LASER das características dimensionais das partículas preparadas (Frações 2) demonstra que as mesmas apresentaram diâmetro médio entre 21 e 27 µm e ampla faixa de distribuição de diâmetro representada por Span (**Equação 1**) entre 1,5 e 2,5 (**Tabela 4**).

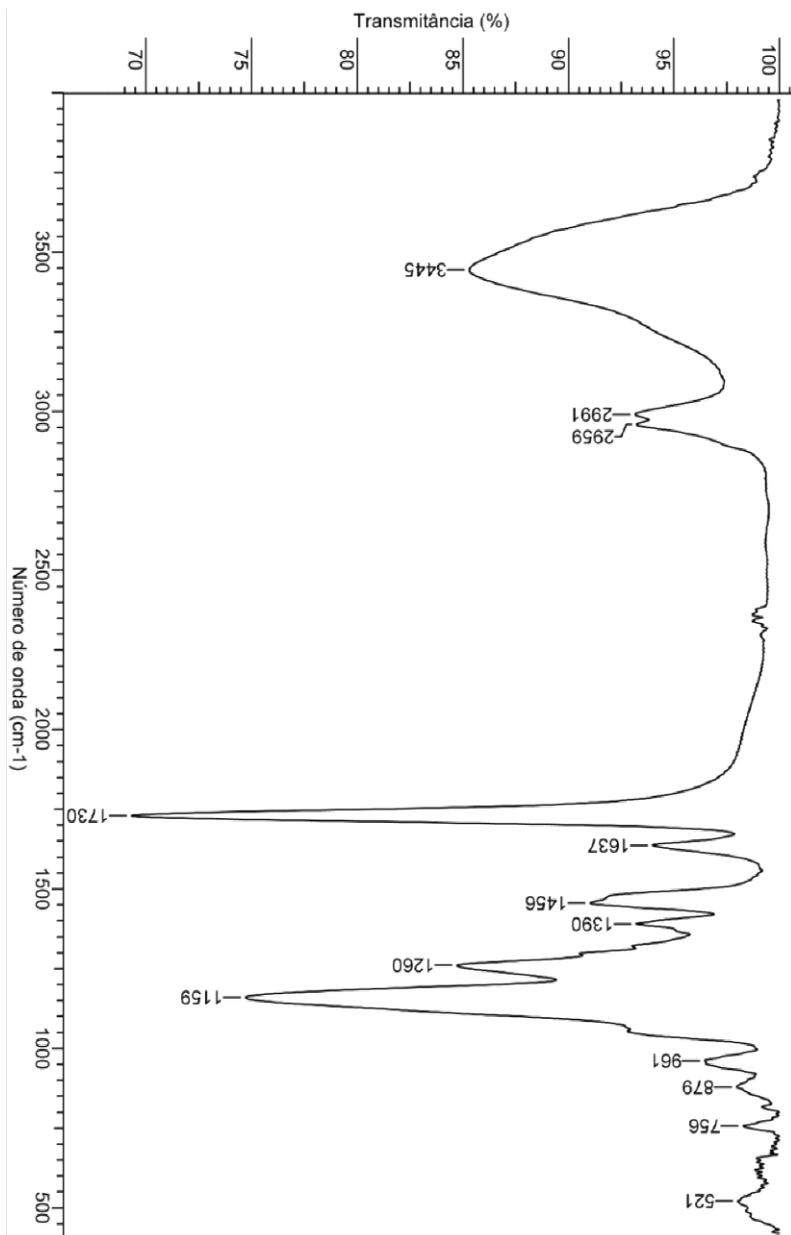
$$Span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad (1)$$

**Tabela 4** Características dimensionais das partículas de MIPs/NIP preparadas por polimerização em bloco

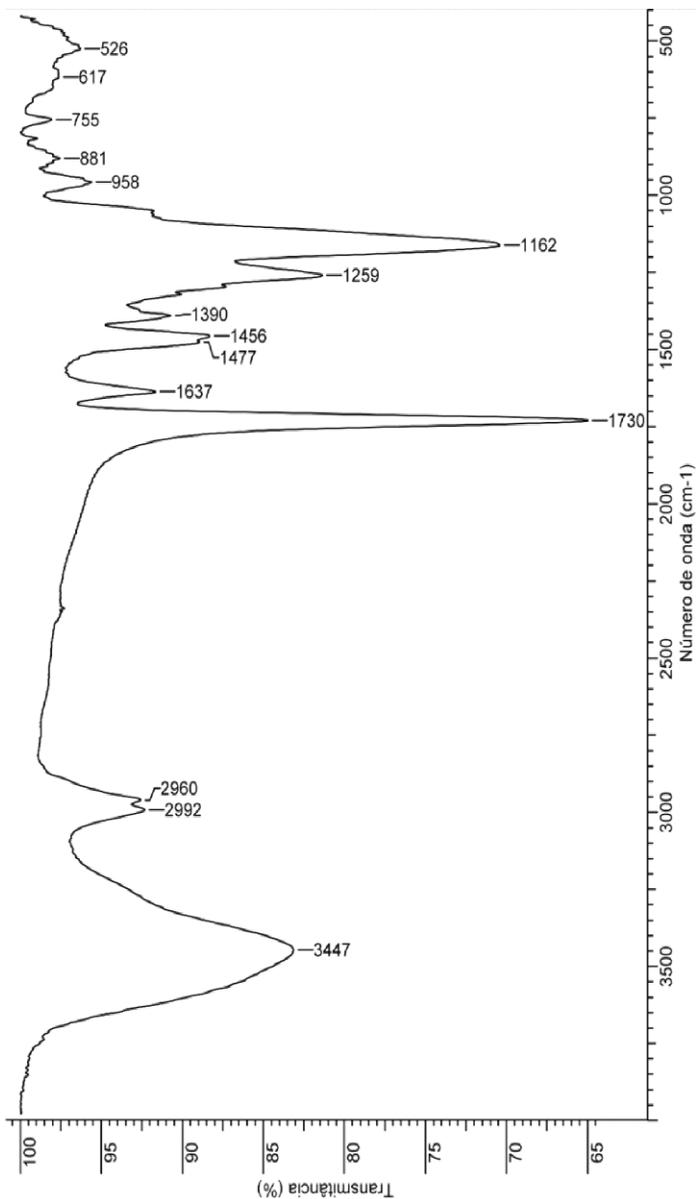
Polím.	Percentual cumulativo <sup>a</sup>			d <sub>4,3</sub> (µm) <sup>b</sup>	Span	Área superficial específica (m <sup>2</sup> /g)
	d <sub>10%</sub> (µm)	d <sub>50%</sub> (µm)	d <sub>90%</sub> (µm)			
<b>NIP</b>	2,25 ± 0,06	17,03 ± 1,18	46,72 ± 0,59	20,91 ± 0,65	2,62 ± 0,15	0,98 ± 0,04
<b>MIP1</b>	2,71 ± 0,32	22,55 ± 3,00	54,31 ± 5,88	25,52 ± 3,16	2,29 ± 0,06	0,80 ± 0,09
<b>MIP2</b>	2,78 ± 0,10	22,02 ± 1,52	39,54 ± 2,92	21,34 ± 1,57	1,67 ± 0,01	0,77 ± 0,04
<b>MIP3</b>	3,26 ± 0,39	24,82 ± 1,62	53,63 ± 4,80	26,91 ± 2,40	2,03 ± 0,05	0,66 ± 0,06

<sup>a</sup> Diâmetros volume equivalente a 10 (d<sub>10%</sub>), 50 (d<sub>50%</sub>) e 90 (d<sub>90%</sub>); <sup>b</sup> Diâmetro volume médio; Todos os valores apresentam-se como média ± desvio padrão.

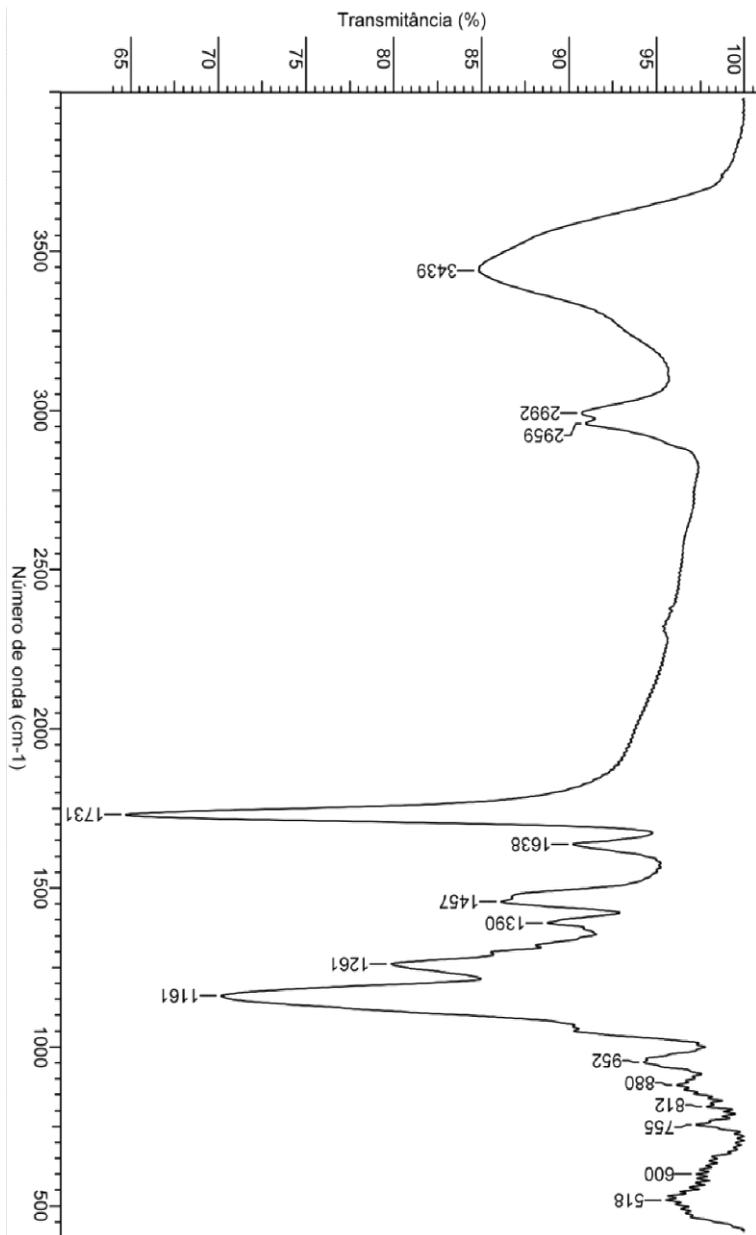
Por MEV verificaram-se partículas porosas, de formato irregular e ampla distribuição de tamanho, não tendo aparente correlação entre a porosidade e a razão [MF]/[T] (**Figura 21**).



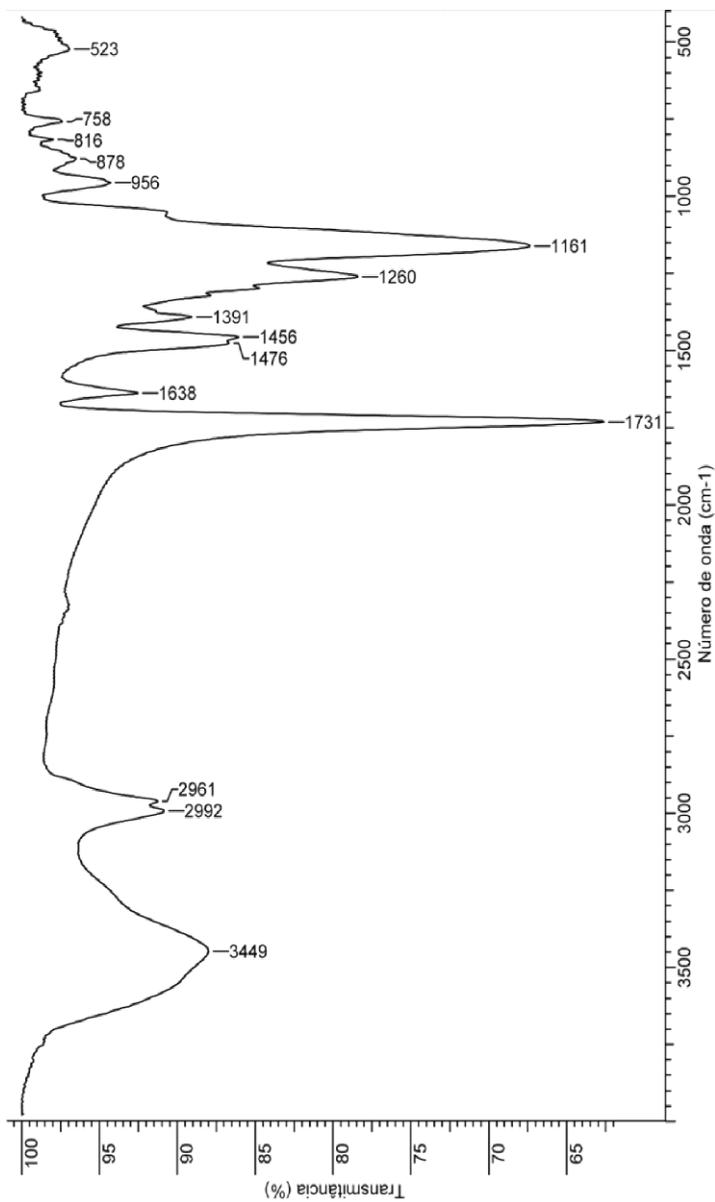
**Figura 17** Espectro de absorção no IV do polímero NIP, obtido por transmitância em pastilha com KBr.



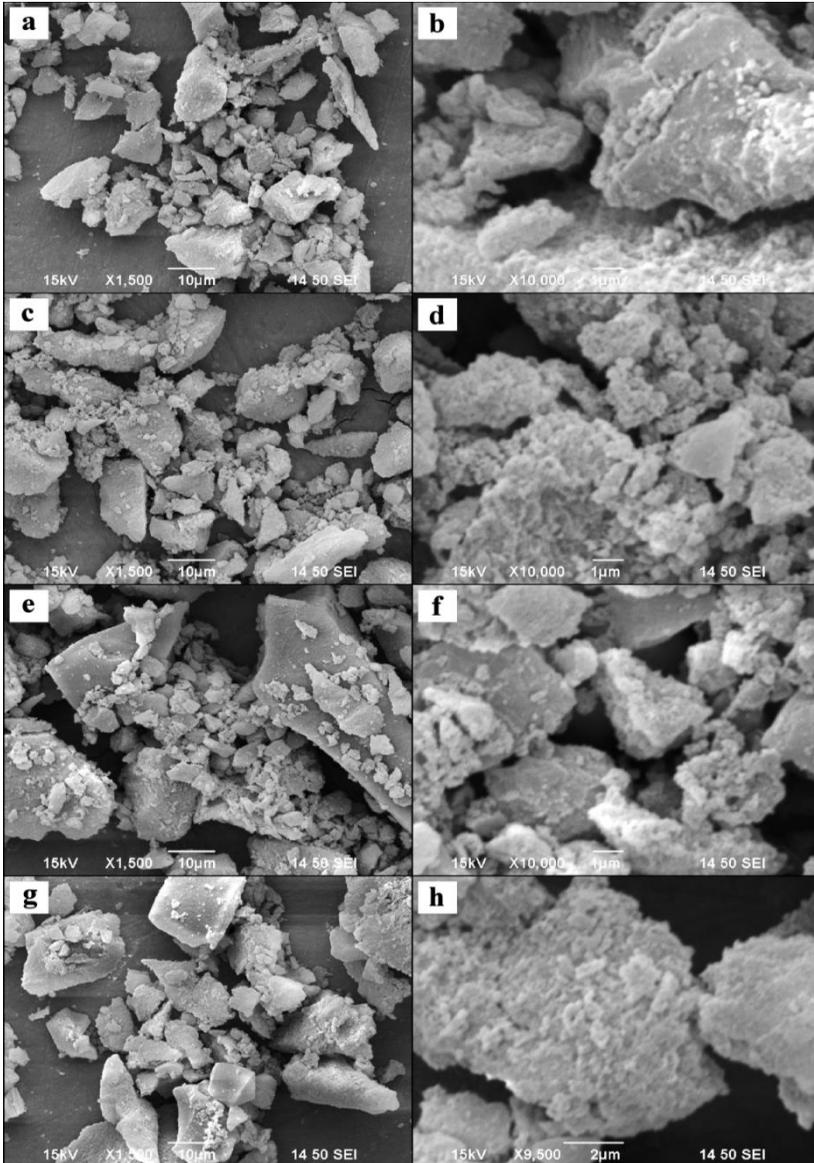
**Figura 18** Espectro de absorção no IV do polímero MIP1, obtido por transmitância em pastilha com KBr.



**Figura 19** Espectro de absorção no IV do polímero MIP2, obtido por transmitância em pastilha com KBr.



**Figura 20** Espectro de absorção no IV do polímero MIP3, obtido por transmitância em pastilha com KBr.



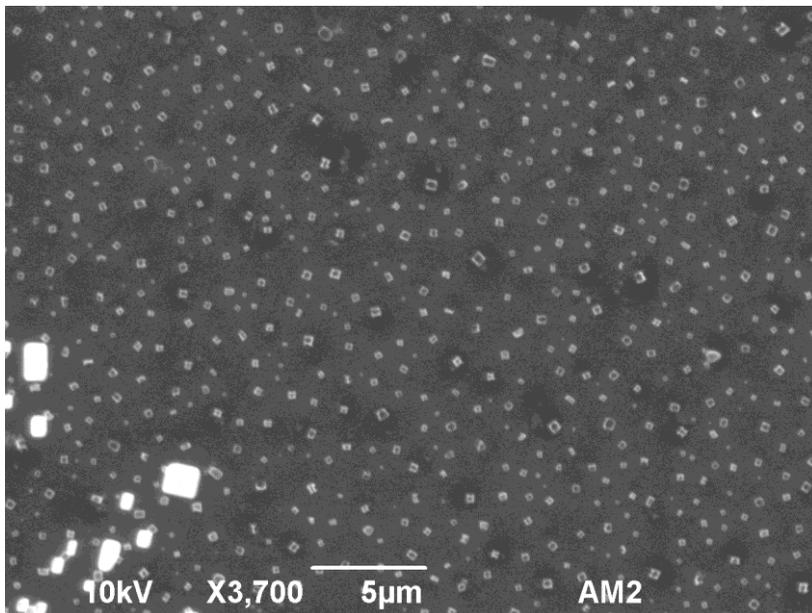
**Figura 21** Micrografias eletrônicas de varredura de NIP (a, b), MIP1 (c, d), MIP2 (e, f) e MIP3 (g, h).

#### 4.1.4.2 POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

O método de polimerização por precipitação difere do de polimerização em bloco basicamente pela quantidade de solvente utilizada, que na polimerização por precipitação perfaz em torno de 95% da mistura reacional.<sup>(102)</sup> O polímero resultante precipita em forma de micro ou nanopartículas (geralmente esféricas) no formato próprio para utilização.<sup>(103)</sup>

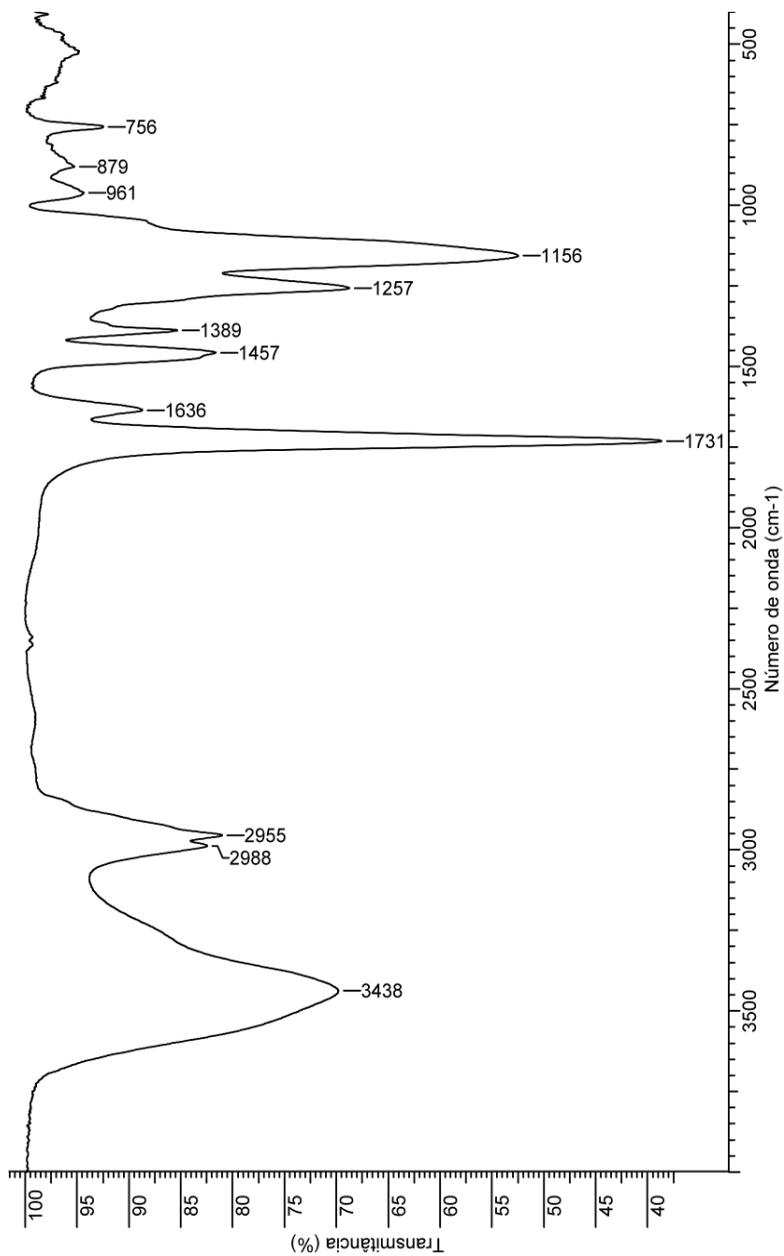
Realizou-se um teste com a técnica de polimerização por precipitação utilizando-se uma metodologia descrita na literatura.<sup>(65)</sup> Preparou-se um NIP (sem modelo) utilizando-se AMA como monômero funcional, DMAEG como reticulador, AIBN como iniciador radicalar e clorofórmio como porogênio.

A análise de espectrometria no IV (número de onda em  $\text{cm}^{-1}$ , atribuição) – 1731, estiramento C=O; 1156, estiramento C-O; 2955, estiramento simétrico C-H alifático; 2988, estiramento assimétrico C-H alifático (**Figura 23**) e análise elementar (C 56 %, H 8 % e N 0 %) evidenciam a ausência de iniciador radicalar AIBN. O produto final, no entanto, mostrou-se inadequado para uso em catálise heterogênea, pois se apresentou muito finamente dividido com conseqüente obstrução dos poros de sistemas de filtração (papel filtro comum e sistemas de membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ ). A análise de MEV mostrou que as partículas apresentam-se com tamanho de aproximadamente 400 nm (**Figura 22**).



**Figura 22** Micrografia de CT003 (NIP), polímero obtido por polimerização por precipitação, preparada pela secagem de suspensão (25 mg / 10 mL) sobre lamínula de vidro.

Como o teste de polimerização por precipitação resultou na produção de partículas menores que as adequadas ao presente propósito, prepararam-se novos polímeros com composição modificada na expectativa de se produzir partículas com dimensões micrométricas. Utilizaram-se método e composição base conforme descritos por Wang e colaboradores,<sup>(102)</sup> que desenvolveram partículas esféricas de aproximadamente 5 µm para aplicações em cromatografia de afinidade para teofilina.<sup>(102)</sup> Para o polímero MIP6 utilizou-se a composição semelhante à de Wang (ácido metacrílico, divinilbenzenos, AIBN e uma mistura de acetonitrila com tolueno como MF, XL, IR e porogênio, respectivamente) exceto pelo uso de fosfato de dibutila como modelo no lugar da teofilina. Preparou-se MIP6 para controle em relação ao tamanho de partícula. No preparo dos demais polímeros, utilizaram-se composições diferenciadas a cada um conforme os seguintes critérios: em MIP7 substituiu-se o monômero funcional ácido AMA por AA, outro monômero também ácido; em MIP8 utilizou-se um conjunto de



**Figura 23** Espectro de absorção no IV do polímero CT003, obtido por

transmitância em pastilha com KBr.

três monômeros funcionais mimetizando-se a tríade catalítica da lipase (**Figura 13**); em MIP9 utilizaram-se dois monômeros funcionais ácidos AMA e um básico (1-vinilimidazol) para cada molécula de modelo; já no polímero MIP10 inverteu-se essa relação, utilizando-se o monômero funcional básico em dobro em relação ao ácido (**Tabela 5**).

Para cada MIP preparou-se um NIP utilizando-se os mesmos métodos utilizados para o preparo dos MIPs, porém sem a presença do modelo.

**Tabela 5** Composição dos polímeros preparados por polimerização por precipitação

Função	Reagente	Composição em quantidade de matéria(mmol)					
		WANG	MIP6	MIP7	MIP8	MIP9	MIP10
Modelo	Fosfato de dibutila	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
MF1	AA	-	-	6,0	1,5	-	-
MF2	AMA	6,0	6,0	-	-	3,0	1,5
MF3	1-Vinilimidazol	-	-	-	1,5	1,5	3,0
MF4	Metacrilato de 2-hidroxietila	-	-	-	1,5	-	-
XL	DVB-80	28,8	28,8	28,8	21,6	21,6	21,6
Iniciador	AIBN	1,90	1,90	1,90	1,43	1,43	1,43
Porogênio	CH <sub>3</sub> CN : tolueno 75/25 v/v (mL)	128	128	128	96	96	96

A análise dimensional das partículas preparadas por polimerização por precipitação (**Tabela 6**) demonstra diâmetro médio em torno de 10 µm, excetuando-se NIP6 e NIP7, que apresentaram diâmetro médio em torno de 4 µm. Os valores de Span entre 0,8 e 1,3 demonstram que a polidispersidade é menor que a dos polímeros preparados por polimerização em bloco. Não se pode demonstrar claramente uma relação entre o diâmetro médio ou polidispersidade (distribuição de diâmetro médio) e a composição dos polímeros preparados.

**Tabela 6** Características dimensionais das partículas de MIPs/NIP preparadas por polimerização por precipitação

Polím.	Percentual cumulativo <sup>a</sup>			d <sub>4,3</sub> ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup>	Span	Área superficial específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
	d <sub>10%</sub> ( $\mu\text{m}$ )	d <sub>50%</sub> ( $\mu\text{m}$ )	d <sub>90%</sub> ( $\mu\text{m}$ )			
<b>MIP6</b>	5,06 ± 0,33	8,81 ± 0,39	15,04 ± 0,72	9,53 ± 0,42	1,14 ± 0,07	0,75 ± 0,04
<b>NIP6</b>	2,99 ± 0,01	4,47 ± 0,02	6,67 ± 0,04	4,69 ± 0,02	0,82 ± 0,00	1,41 ± 0,00
<b>MIP7</b>	5,47 ± 0,06	9,64 ± 0,08	16,76 ± 0,13	10,51 ± 0,09	1,17 ± 0,00	0,69 ± 0,01
<b>NIP7</b>	2,56 ± 0,04	3,68 ± 0,08	5,46 ± 0,19	3,88 ± 0,10	0,79 ± 0,03	1,68 ± 0,03
<b>MIP8</b>	5,09 ± 0,14	8,96 ± 0,16	14,63 ± 1,10	9,70 ± 0,20	1,15 ± 0,07	0,74 ± 0,01
<b>NIP8</b>	6,88 ± 0,18	10,11 ± 0,18	14,84 ± 0,14	10,56 ± 0,15	0,79 ± 0,03	0,62 ± 0,01
<b>MIP9</b>	4,81 ± 0,47	9,26 ± 0,25	16,90 ± 0,89	10,17 ± 0,27	1,31 ± 0,14	0,74 ± 0,04
<b>NIP9</b>	4,91 ± 0,69	9,12 ± 0,87	16,33 ± 1,64	9,98 ± 0,93	1,26 ± 0,15	0,75 ± 0,07
<b>MIP10</b>	4,91 ± 0,32	8,73 ± 0,45	15,15 ± 0,68	9,50 ± 0,45	1,17 ± 0,06	0,76 ± 0,04
<b>NIP10</b>	6,82 ± 1,31	12,48 ± 1,21	21,90 ± 1,34	13,57 ± 1,16	1,22 ± 0,19	0,55 ± 0,08

<sup>a</sup> Diâmetros volume equivalente a 10 (d<sub>10%</sub>), 50 (d<sub>50%</sub>) e 90 (d<sub>90%</sub>); <sup>b</sup> Diâmetro volume médio; Todos os valores apresentam-se como média ± desvio padrão.

#### 4.1.5 ESTUDOS DE CATÁLISE

##### 4.1.5.1 ESCOLHA DO TIPO DE CATÁLISE

A catálise heterogênea foi escolhida por apresentar baixo custo relativamente à catálise enzimática, baixo impacto ambiental quando comparada à catálise homogênea com hidróxidos de metais alcalinos e facilidade de recuperação do catalisador e purificação do produto da reação. Dentro da catálise heterogênea, adotou-se para o preparo dos catalisadores a técnica de impressão molecular utilizando abordagem de impressão não covalente sem a formação de complexos metálicos no sítio ativo artificial. Os polímeros foram obtidos por polimerização em bloco e por precipitação.

##### 4.1.5.2 ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A compreensão do fenômeno de catálise e comparação entre catalisadores propostos necessita do acompanhamento cinético das reações que se pretende estudar.

Para que se determine a atividade catalítica dos materiais produzidos, é necessário o acompanhamento das reações ao longo de certo período de tempo, que pode ser efetuado, dentre outras metodologias, por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,<sup>(104)</sup> CG, CLAE e volumetria de neutralização.

##### 4.1.5.2.1 Acompanhamento das reações de esterificação por titulação potenciométrica

Na reação-modelo de esterificação ocorre o consumo de ácido carboxílico para a formação de um éster. O aumento do pH do meio reacional pode ser prontamente medido através de métodos potenciométricos diretos, e a quantidade de ácido pode ser quantificada por titulação potenciométrica onde se titulam alíquotas da amostra com uma solução alcalina de concentração conhecida, acompanhando a atividade hidrogeniônica do meio no equilíbrio. Através da segunda derivada da curva de volume de base vs pH, pode-se calcular a concentração do ácido titulado. O acompanhamento da concentração de ácido durante o tempo permite que se calcule a velocidade de reação, e, por conseguinte, a capacidade catalítica do candidato a catalisador. Ensaio de titulação potenciométrica foram realizados no Laboratório de

Equilíbrio Químico do Departamento de Química da UFSC e apresentaram um tempo de análise de aproximadamente 30 minutos por amostra titulada. Por se considerar um tempo demasiadamente longo para o acompanhamento da cinética das reações desejadas, procurou-se outro método para tal.

#### 4.1.5.2.2 Acompanhamento das reações de esterificação por eletroforese capilar

Nas reações-modelo ocorre a diminuição da concentração de ácido carboxílico (uma espécie carregada) e formação de éster, uma molécula não carregada. Por esse motivo pode-se realizar o acompanhamento cinético das reações de esterificação por determinação da concentração de ácido carboxílico por eletroforese capilar na presença de diferentes catalisadores.

A determinação das concentrações de ácido butírico ou valérico, conforme o caso, foi executada pelas doutorandas Maressa Danielli Dolzan e Jaqueline Pereira Vistuba, alunas do Professor Gustavo Amadeu Micke utilizando método descrito na seção experimental (**Seção 6.6**).

#### 4.1.5.3 RESULTADOS EM CATÁLISE

Com o objetivo de estudar o comportamento cinético das reações-modelo, efetuaram-se três tipos de reações:

- a) reação sem catalisador, utilizada como reação controle negativo para catálise;
- b) reação com catalisador comercial Amberlyst<sup>®</sup> 15, utilizada como reação controle positivo, e
- c) reação com um dos candidatos a catalisador (NIP; MIP1; MIP2; MIP3; NIP e MIP6; NIP e MIP7; NIP e MIP8; NIP e MIP9; NIP e MIP10).

Inicialmente realizaram-se quatro reações de esterificação de ácido butírico com 1-butanol a 60 °C. Em uma testou-se o catalisador ácido poliestireno sulfônico (Amberlyst<sup>®</sup> 15); a segunda reação efetuou-se sem uso de catalisador e as outras duas com MIP6 (cujo modelo foi o AET da formação do butirato de n-butila) e NIP6, (**Tabela 7 reações 01 a 04**). A reação sem catalisador não aconteceu e a reação com o catalisador comercial Amberlyst<sup>®</sup> 15 aconteceu satisfatoriamente, podendo-se perceber a redução em 90% da concentração inicial de ácido

butírico em aproximadamente 30 horas (**Figura 24**). As reações com MIP6 e NIP6 equipararam-se à reação sem catalisador, não apresentando, portanto, atividade catalítica (**Figura 25**).

Diante da falta de atividade catalítica nas condições reacionais das reações 01 a 04, os polímeros MIP6 e NIP6 foram novamente testados na esterificação de ácido butírico com 1-butanol (**Tabela 7 reações 05 e 06**), porém com aumento de temperatura (de 60 °C para 100 °C), aumento da carga do catalisador (de 150 mg para 400 mg). Novamente não se conseguiu a atividade catalítica de ambos os polímeros (**Figura 26**).

Com a mesma reação testaram-se os pares de polímeros MIP7, NIP7; MIP8, NIP8; MIP9, NIP9 e MIP10, NIP10 (**Tabela 7 reações 07 a 14**). Esses polímeros novamente não apresentaram atividade catalítica (**Figura 27 a Figura 30**), podendo se equiparar as reações na presença desses com a reação sem catalisador.

A seguir testaram-se os polímeros que foram modelados com fosfato de dipentila MIP1, MIP2 e MIP3, bem como o NIP nas reações de esterificação do ácido valérico com 1-pentanol (**Tabela 7 reações 20 a 23**), com 1-butanol (**Tabela 7 reações 24 a 27**) e com 1-octanol (**Tabela 7 reações 28 a 31**).

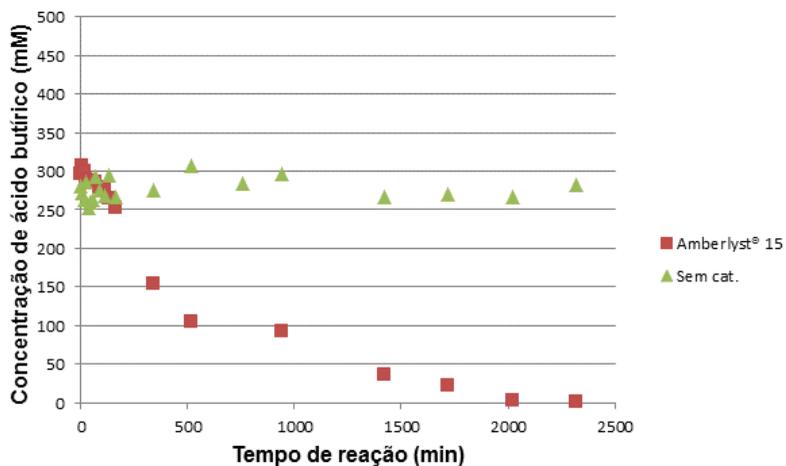
As reações com 1-butanol, 1-pentanol e 1-octanol objetivaram a caracterização do sítio formado pela impressão e avaliação de sua seletividade quanto ao tamanho da cadeia alquílica do álcool. Nenhum dos quatro polímeros apresentou atividade catalítica em nenhuma das reações testadas (**Figura 31, Figura 32 e Figura 33**).

Com o objetivo de verificar a influência da presença de água nos álcoois, empregou-se na reação o 1-pentanol previamente seco com  $K_2CO_3$  e recém-destilado. Testaram-se novamente as reações com Amberlyst<sup>®</sup> 15, na ausência de catalisador, com MIP1 e com NIP (**Tabela 7 reações 40 a 43**). Os resultados evidenciam que a falta de atividade catalítica dos polímeros MIP1 e NIP não resultou da umidade do álcool empregado (**Figura 34**).

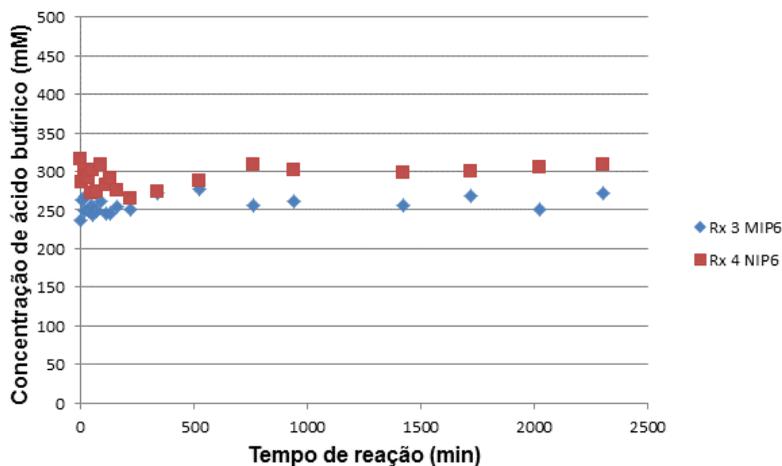
**Tabela 7** Reações de esterificação acompanhadas cineticamente

Rx	ácido	$n_{[\text{ácido}]}$ (mmol)	álcool	$n_{[\text{álcool}]}$ (mmol)	Cat.	$m_{\text{cat}}$ (mg)	Temp. (°C)
01	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	A15 <sup>a</sup>	200	60
02	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	-	-	60
03	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	MIP6	150	60
04	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	NIP6	153	60
05	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	MIP6	403	100
06	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	NIP6	401	100
07	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	MIP7	400	100
08	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	NIP7	400	100
09	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	MIP8	401	100
10	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	NIP8	400	100
11	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	MIP9	401	100
12	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	NIP9	401	100
13	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	MIP10	399	100
14	butírico	$3,52 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,06 \cdot 10^{-1}$	NIP10	402	100
20	valérico	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	MIP1	200	100
21	valérico	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	NIP	201	100
22	valérico	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	MIP2	201	100
23	valérico	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	MIP3	200	100
24	valérico	$3,50 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,05 \cdot 10^{-1}$	MIP1	200	100
25	valérico	$3,50 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,05 \cdot 10^{-1}$	NIP	200	100
26	valérico	$3,50 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,05 \cdot 10^{-1}$	MIP2	201	100
27	valérico	$3,50 \cdot 10^{-3}$	1-butanol	$1,05 \cdot 10^{-1}$	MIP3	201	100
28	valérico	$2,05 \cdot 10^{-3}$	1-octanol	$6,15 \cdot 10^2$	MIP1	201	100
29	valérico	$2,05 \cdot 10^{-3}$	1-octanol	$6,15 \cdot 10^2$	NIP	201	100
30	valérico	$2,05 \cdot 10^{-3}$	1-octanol	$6,15 \cdot 10^2$	MIP2	202	100
31	valérico	$2,05 \cdot 10^{-3}$	1-octanol	$6,15 \cdot 10^2$	MIP3	202	100
40	valérico <sup>b</sup>	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	A15 <sup>a</sup>	200	100
41	valérico <sup>b</sup>	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	-	-	100
42	valérico <sup>b</sup>	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	MIP1	201	100
43	valérico <sup>b</sup>	$2,97 \cdot 10^{-3}$	1-pentanol	$8,90 \cdot 10^{-2}$	NIP	200	100

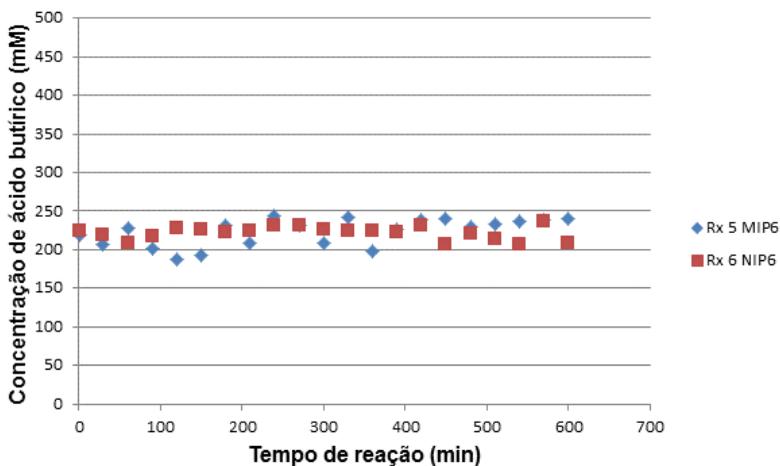
<sup>a</sup> Amberlyst 15; <sup>b</sup> seco com  $\text{K}_2\text{CO}_3$



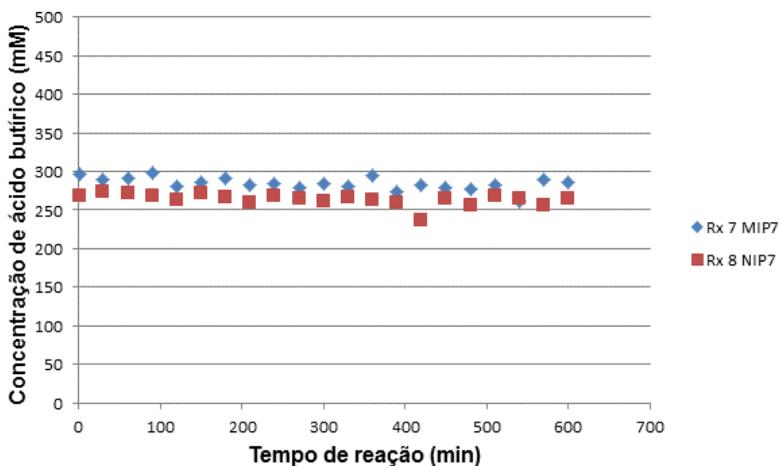
**Figura 24** Reações de butanólise de ácido butírico com 200 mg de Amberlyst® 15 e sem catalisador a 60 °C



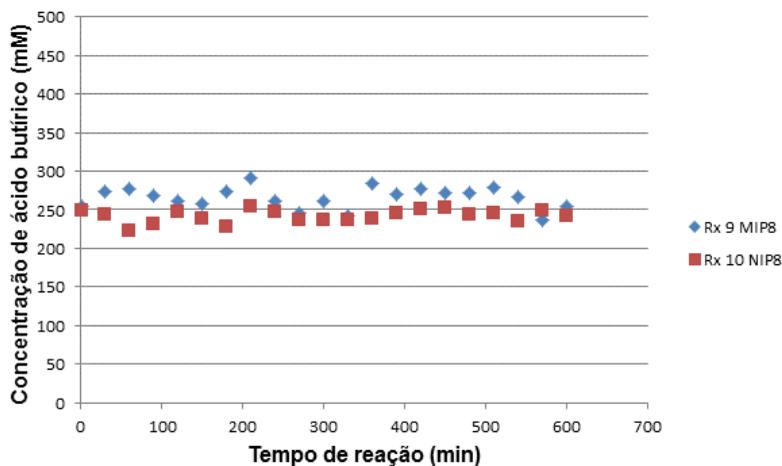
**Figura 25** Reações de butanólise de ácido butírico com 150 mg de MIP6 e 153 mg de NIP6 a 60 °C



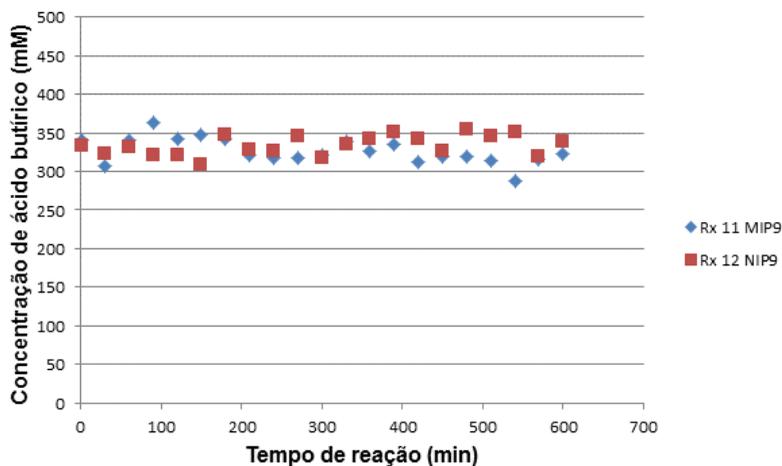
**Figura 26** Reações de butanolise do ácido butírico com 403 mg de MIP6 e 401 mg de NIP6 a 100 °C



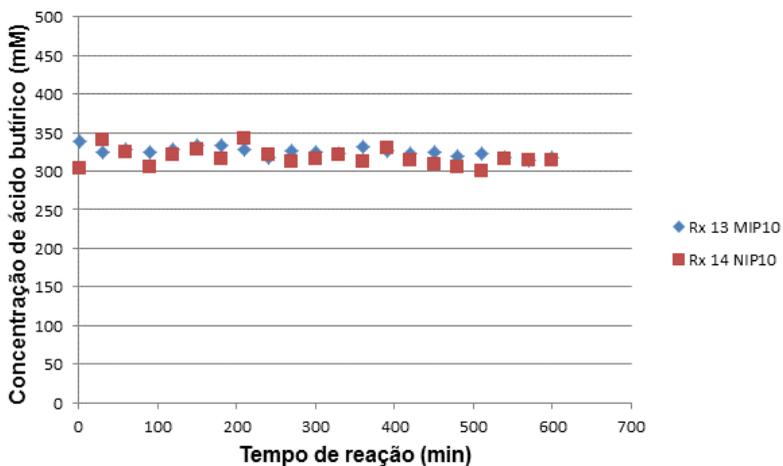
**Figura 27** Reações de butanolise do ácido butírico com 400 mg de MIP7 e 400 mg de NIP7 a 100 °C



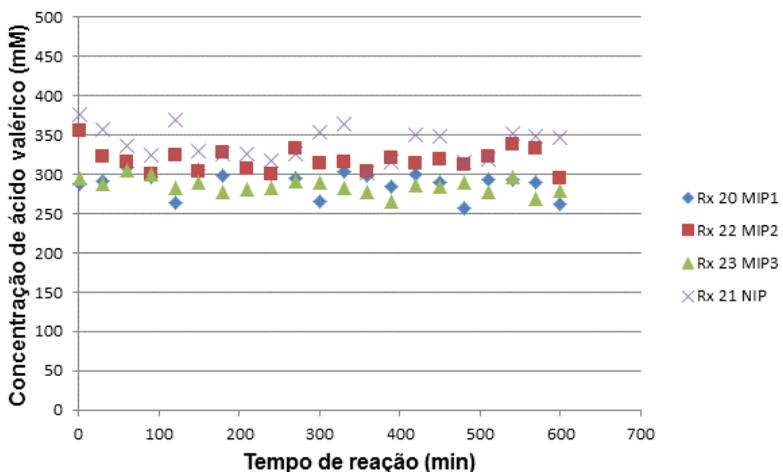
**Figura 28** Reações de butanolise do ácido butírico com 401 mg de MIP8 e 400 mg de NIP8 a 100 °C



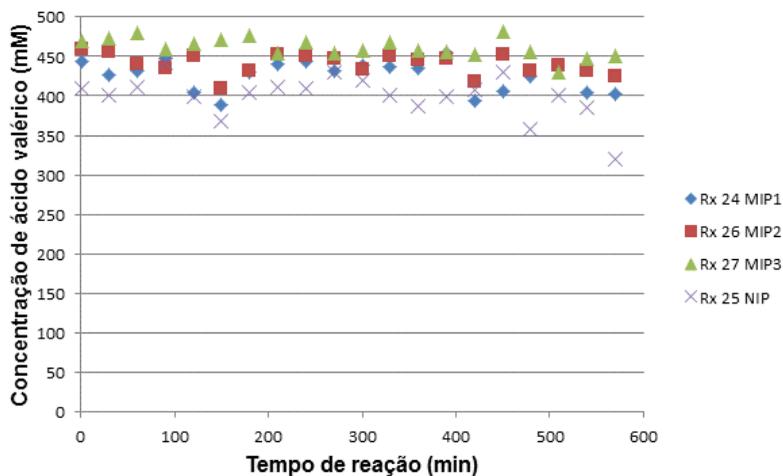
**Figura 29** Reações de butanolise do ácido butírico com 401 mg de MIP9 e 401 mg de NIP9 a 100 °C



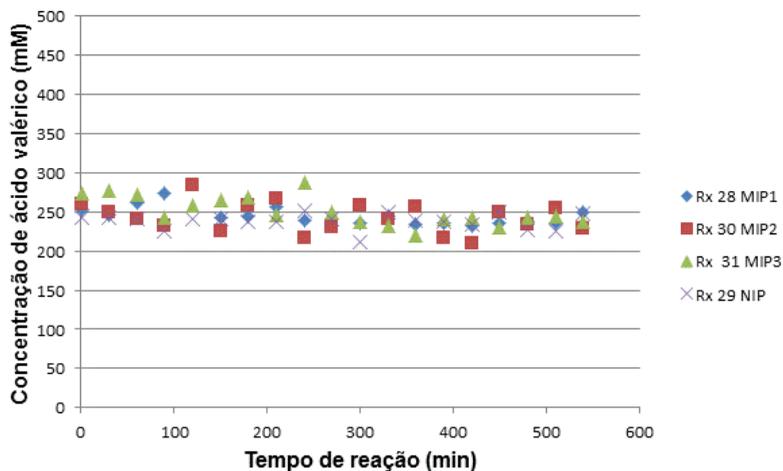
**Figura 30** Reações de butanólise do ácido butírico com 399 mg de MIP10 e 402 mg de NIP10 a 100 °C



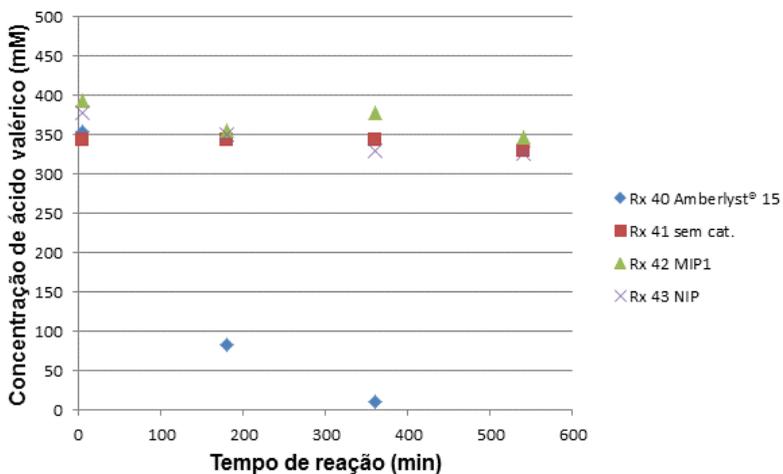
**Figura 31** Reações de pentanólise do ácido valérico com 200 mg de MIP1, 201 mg de MIP2, 200 mg de MIP3 e 200 mg de NIP a 100 °C



**Figura 32** Reações de butanólise do ácido valérico com 200 mg de MIP1, 201 mg de MIP2, 201 mg de MIP3 e 200 mg de NIP a 100 °C



**Figura 33** Reações de octanólise do ácido valérico com 201 mg de MIP1, 202 mg de MIP2, 202 mg de MIP3 e 201 mg de NIP a 100 °C



**Figura 34** Reações de pentanólise do ácido valérico com 200 mg de Amberlyst® 15, sem catalisador, com 201 mg de MIP1 e 200 mg de NIP a 100 °C, utilizando-se 1-pentanol previamente seco com  $K_2CO_3$

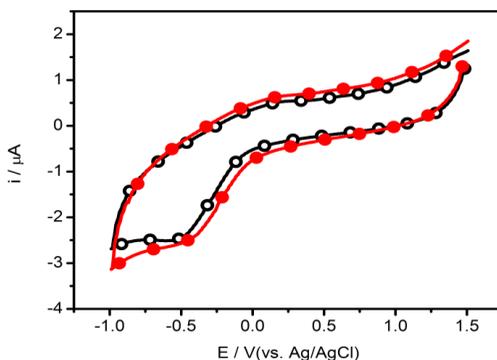


## 4.2 MIPS COMO GERADORES DE SELETIVIDADE EM ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATOS

Uma segunda aplicação planejada para os polímeros preparados por polimerização em bloco (**Seção 4.1.4.1**) foi a modificação química de eletrodos de pasta de carbono para a detecção eletroquímica de fosfato de dipentila e moléculas estruturalmente assemelhadas.

Preparou-se um eletrodo de pasta de carbono (EPC) convencional composto de pó de grafite e óleo mineral. Prepararam-se também quatro eletrodos de pasta de carbono modificados (EPCMIP ou EPCNIP), adicionando-se à composição do EPC 30 mg de MIP ou NIP. Utilizaram-se voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada para testar o comportamento eletroquímico dos EPCMIP/EPCNIP (**Seção 6.8.1**).

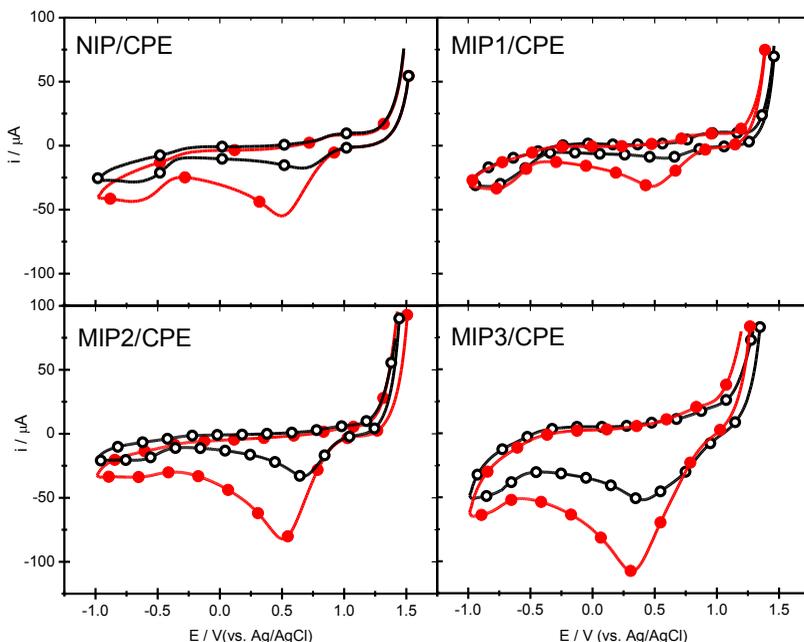
Primeiramente testou-se por voltametria cíclica a resposta do EPC ao  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , onde se demonstrou que não há a promoção de transferência eletrônica na presença de  $\text{H}_3\text{PO}_4$   $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução aquosa de  $\text{KCl}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (eletrodo de suporte) (**Figura 35**).



**Figura 35** Voltamograma cíclico para EPC não modificado em  $\text{KCl}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  na ausência (círculos vazios) e na presença (círculos preenchidos) de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

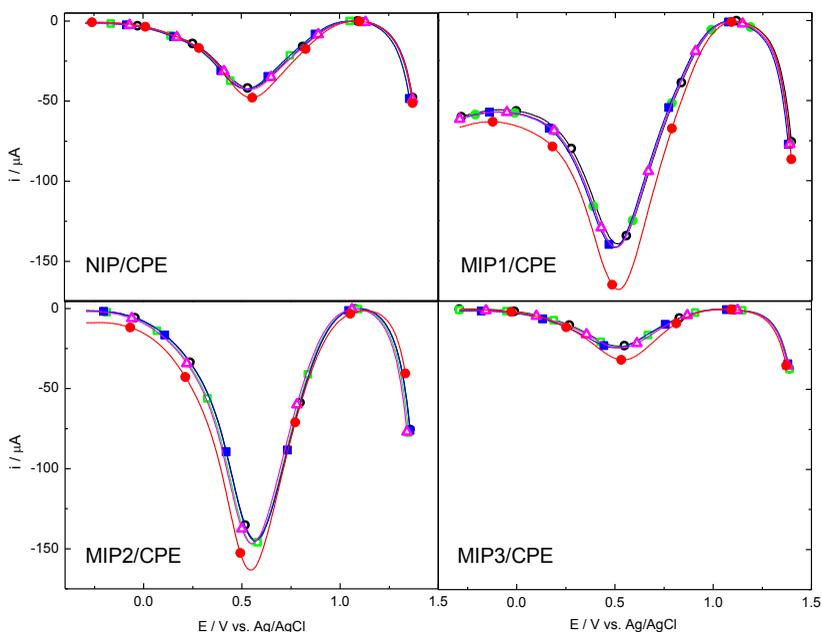
No próximo ensaio testaram-se por voltametria cíclica as respostas dos eletrodos modificados EPCNIP, EPCMIP1, EPCMIP2 e EPCMIP3 ao  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Diferente do que aconteceu com o EPC, quando se utilizaram os eletrodos modificados notou-se o aparecimento de um sinal em  $0,5 \text{ V}$  com o eletrólito de suporte, que aumentou com a

presença do  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (**Figura 36**). Esta evidência aponta para a redução de algum dos componentes dos polímeros utilizados na modificação dos eletrodos e que tal redução aumenta com a interação entre o polímero modificador e o analito fosfato.



**Figura 36** Voltamogramas cíclicos para EPCMIPs/EPCNIP em  $\text{KCl}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  na ausência (círculos vazios) e na presença (círculos preenchidos) de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

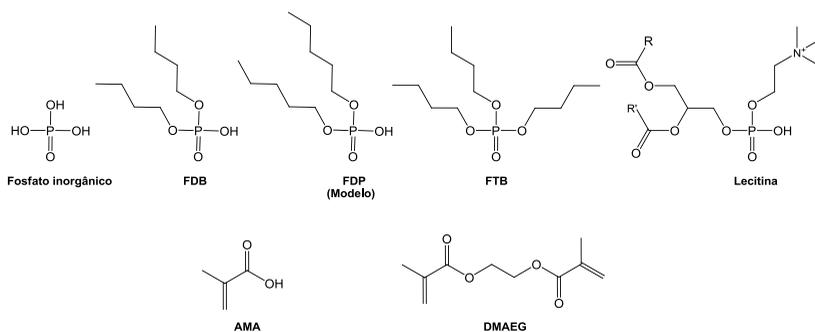
Testou-se o efeito de três possíveis interferentes isósteros do grupo fosfato. Verificou-se que os íons nitrato, carbonato e sulfato em concentrações de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  (100 vezes maiores que a faixa de concentração utilizada para o fosfato neste estudo) não foram detectados pelos eletrodos modificados com os polímeros MIPs/NIP, não resultando em sinais diferentes do experimentado pelo eletrodo de pasta de carbono não modificado. Já a adição de fosfato na presença de tais íons promoveu ganho de corrente catódica, indicando afinidade preferencial dos supostos sítios formados pela impressão molecular por fosfato (**Figura 37**).



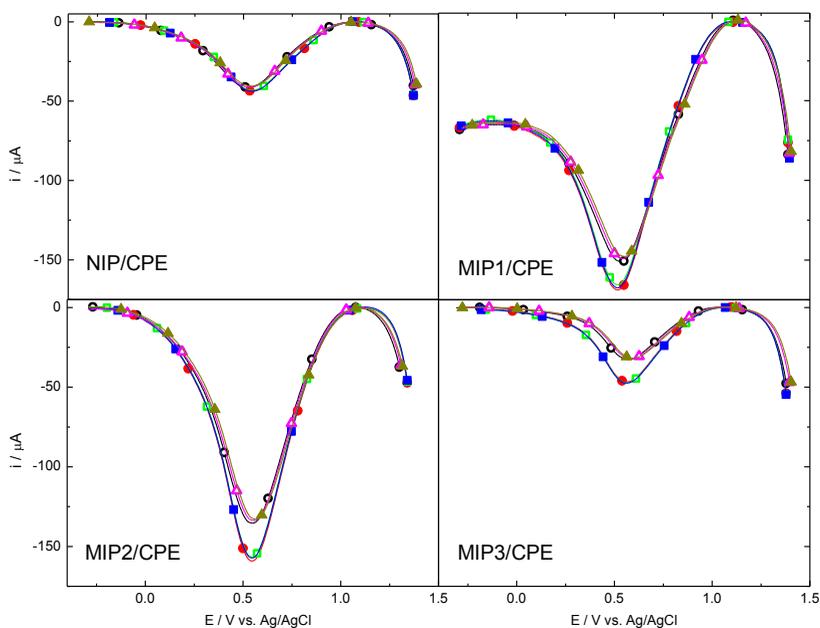
**Figura 37** Voltamogramas de onda quadrada para EPCs modificados com NIP, MIP1, MIP2 e MIP3 em  $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$  antes (círculos vazios) e após adição de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  dos ânions  $\text{HPO}_4^{2-}$  (círculos preenchidos),  $\text{CO}_3^{2-}$  (quadrados vazios),  $\text{NO}_3^-$  (quadrados preenchidos) e  $\text{SO}_4^{2-}$  (triângulos vazios).  $f = 40 \text{ Hz}$ ;  $a = 100 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$

Para melhor caracterização das “cavidades” formadas no processo de impressão molecular com o modelo fosfato de dipentila (FDP), testou-se o comportamento dos eletrodos modificados com NIP e MIPs perante o fosfato inorgânico, fosfato de dibutila (FDB), fosfato de dipentila (FDP), fosfatidilcolina (lecitina) e fosfato de tributila (FTB) (**Figura 38**). Obtiveram-se sinais com fosfato inorgânico, fosfato de dibutila e fosfato de dipentila, ambos com igual intensidade entre si considerando cada eletrodo modificado individualmente. Não houve geração de sinal na presença de lecitina e fosfato de tributila. Observou-se que o sinal responsável pela interação entre os analitos ativos (fosfato inorgânico, fosfato de dibutila e fosfato de dipentila) e os polímeros modificados varia conforme a composição do polímero modificador do

eletrodo. Assim, tem-se a variação do sinal do EPCNIP, com sinal muito menor que os sinais apresentados pelos outros eletrodos (**Figura 39**).



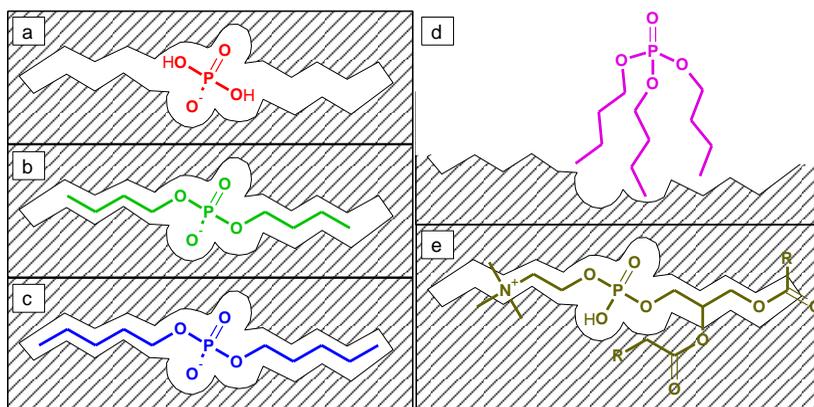
**Figura 38** Estruturas do modelo (fosfato de dipentila – FDP), monômero funcional (ácido metacrílico – AMA), reticulador (dimetacrilato de etilenoglicol – DMAEG) e analitos (fosfato inorgânico, fosfato de dibutila – FDB, fosfato de tributila – FTB, e *L*- $\alpha$ -fosfatidilcolina – lecitina [R = CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub> e R' = CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>])



**Figura 39** Voltamogramas de onda quadrada para EPCs modificados com NIP, MIP1, MIP2 e MIP3 em  $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$  antes (círculos vazios) e após adição de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (círculos preenchidos), FDB (quadrados vazios), FDP (quadrados preenchidos), FTB (triângulos vazios) e lecitina (triângulos preenchidos).  $f = 40 \text{ Hz}$ ;  $a = 100 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$

Pode-se utilizar esses resultados como fortes evidências da presença do sítio formado na impressão molecular com forma e funcionalidades complementares ao modelo fosfato de dipentila. Se assim for, a molécula de fosfato de dipentila, sendo o próprio modelo utilizado para a impressão, cabe perfeitamente na cavidade formada por ela própria, interage com esta, permitindo a redução do polímero e formação do sinal (**Figura 40c**). Da mesma forma acontece com as moléculas de fosfato ácido de dibutila e fosfato inorgânico, que cabem na cavidade e também proporcionam a formação de sinal (**Figura 40b e a**, respectivamente). A molécula de fosfatidilcolina, entretanto, não se encaixa no receptor por ser maior e com mais ramificações que o modelo, não levando portanto à interação necessária à produção do sinal (**Figura 40e**). Já a molécula de fosfato de tributila, mesmo tendo o

formato necessário para o encaixe na cavidade não proporcionou a formação de nenhum sinal. Isso pode ser explicado possivelmente pela presença no triéster de duas porções distintas com relação à interação com o solvente, ou seja, uma cabeça polar correspondente ao fosfato e uma cauda apolar correspondente às cadeias alquílicas. Como as medidas foram efetuadas em meio aquoso, têm-se a cabeça polar hidrofílica orientando-se para o solvente e a porção alquílica apolar voltando-se para a superfície do receptor. Tal orientação pode ser responsável pela falta da interação entre o fosfato e consequente formação do sinal (**Figura 40d**).



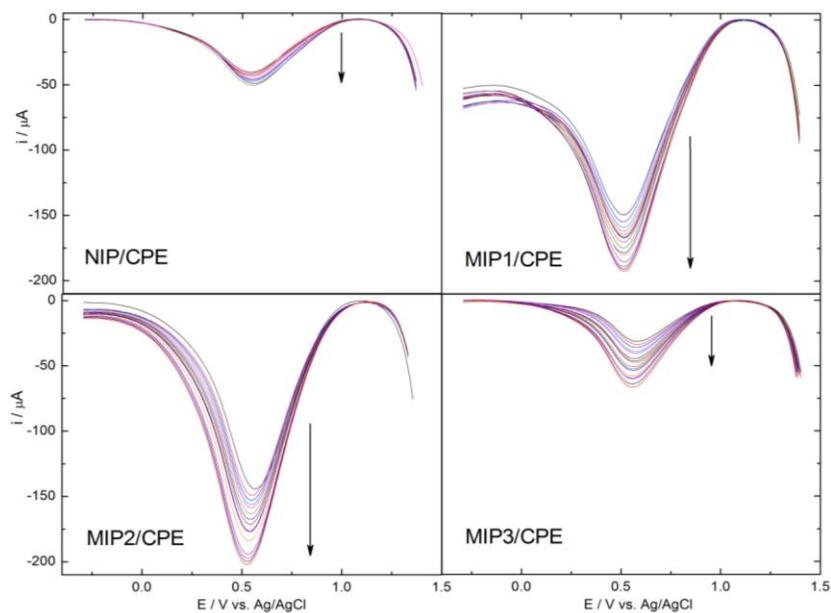
**Figura 40** Possível interação entre o sítio formado pela impressão molecular de fosfato de dipentila e as moléculas de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (a), FDB (b), FDP (c), FTB (d) e lecitina (e)

Com a adição de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> nas concentrações entre 20 e 300 nmol L<sup>-1</sup> e medidas com os quatro eletrodos modificados de cada concentração, obtiveram-se os devidos voltamogramas (**Figura 41**) dos quais foram construídas as respectivas curvas de calibração (**Figura 42**).

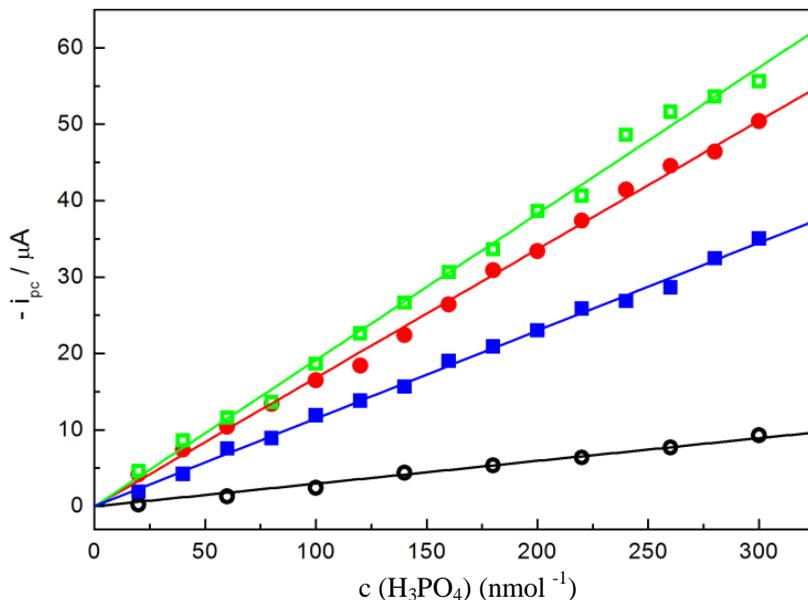
Todas as curvas de calibração apresentam-se como retas com coeficientes de correlação entre 0,994 e 0,997. Em concentrações acima de 1,0 μmol L<sup>-1</sup> o acréscimo de mais analito não produz respostas lineares. Isso pode evidenciar a existência de receptores com comportamento de saturação.

Os resultados demonstram que tanto MIP1 quanto MIP2 ou MIP3 com limites de quantificação de 26,5 nmol L<sup>-1</sup>, 36,3 nmol L<sup>-1</sup> e 27,3 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, podem ser utilizados satisfatoriamente

para a determinação de fosfatos ácidos de dialquila com cadeias alquílicas iguais ou inferiores a cinco carbonos (**Tabela 8**).



**Figura 41** Voltamogramas de onda quadrada para EPCs modificados com NIP, MIP1, MIP2 e MIP3 na ausência (linha superior) e presença (demais linhas) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  nas concentrações entre 20 e 300  $\text{nmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .  $f = 40 \text{ Hz}$ ;  $a = 100 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$



**Figura 42** Curvas de calibração para fosfato dos EPCs modificados com NIP (círculos vazios), MIP1 (círculos preenchidos), MIP2 (quadrados vazios) e MIP3 (quadrados preenchidos)

**Tabela 8** Parâmetros analíticos das curvas de calibração para EPCNIP e EPCMIPs

Electrodo	Equação $f(i)/\mu A$	$R^2$	LD/nmol L <sup>-1a</sup>	LQ/nmol L <sup>-1b</sup>
EPCNIP	$32,2C^* - 0,53$	0,994	17,3	52,1
EPCMIP1	$168C + 0,59$	0,997	8,82	26,5
EPCMIP2	$191C + 5,37$	0,994	12,1	36,3
EPCMIP3	$115C + 6,63$	0,997	9,10	27,3

<sup>a</sup> Limite de detecção; <sup>b</sup> Limite de quantificação; \* concentração em mol L<sup>-1</sup>;

## 5 CONCLUSÕES

A metodologia utilizada na preparação e purificação de fosfato de dipentila foi eficiente, o que se evidencia por espectrometria de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e RMN de  $^{31}\text{P}$ , obtendo-se um alto valor de rendimento e pureza.

A metodologia de síntese dos MIPs por polimerização por precipitação foi a que resultou na formação de partículas menores e com distribuição de tamanho mais estreita.

Os polímeros impressos molecularmente baseados no modelo fosfato de dipentila apresentaram baixa capacidade de catalisar as reações de esterificação testadas, mas foram extremamente eficazes no reconhecimento molecular de fosfato inorgânico e fosfatos de dialquila com cadeias até cinco carbonos, mostrando que a impressão molecular foi efetivamente funcional, com a formação de um sítio artificial com forma e funções complementares a molécula modelo. As baixas propriedades catalíticas destes materiais sugerem que o modelo reacional escolhido talvez não seja o mais adequado, uma vez que se tratam de reações com substratos não ativados, de alta demanda energética. Além disso, estes materiais são candidatos a catalisadores de reações de esterificação e hidrólise de ácidos carboxílicos e amidas ativados, ésteres de fosfato, fosfonatos e fosfinatos. O mesmo pode se aplicar para os polímeros impressos com base no modelo fosfato de dibutila.

Os polímeros sintetizados com o fosfato de dipentila (modelo), ácido metacrílico (MF) e dimetametacrilato de etilenoglicol (reticulador) apresentaram alta capacidade de reconhecimento seletivo de fosfato inorgânico e diésteres de fosfato com menos de cinco átomos de carbono, com um LD em torno de  $10 \text{ nmol L}^{-1}$ , o que se equipara com os LD encontrados na literatura para EPC, sendo o primeiro EPC modificado com polímeros molecularmente impressos a reconhecer a porção fosfato de uma molécula.

Os eletrodos aqui desenvolvidos abrem um campo inovador de estudo para sensores de fosfato, com possibilidades de desenvolvimento de produtos eficientes e seletivos para a detecção e quantificação de fosfatos orgânicos e inorgânicos.



## 6 EXPERIMENTAL

### 6.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO

Os reagentes ácido acrílico (AA), ácido metacrílico (AMA), dimetacrilato de etilenoglicol (DMAEG), ácido butírico, ácido valérico, metilimidazol, azoisobutironitrila (AIBN), Amberlyst<sup>®</sup> 15, pentacloreto de fósforo, carbonato de potássio, sulfato de sódio anidro, 1-butanol, 1-pentanol e 1-octanol foram adquiridos de Aldrich. Os solventes clorofórmio, metanol, etanol, acetona, ácido acético, ácido clorídrico foram adquiridos de Vetec ou Synth. Os solventes deuterados CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub> foram adquiridos de Cambridge Isotope Laboratories.

O modelo fosfato de dipentila foi preparado conforme descrito na literatura (**Seção 6.2**).

O gás argônio foi adquirido de Praxair inc.

Os espectros de absorção no IV foram obtidos com equipamento marca ABB Bomen, modelo FTLA 2000 - 100, ou marca Varian, modelo 3100 FT-IR Excalibur series, ou marca Perkin Elmer, modelo 16PC FT-IR. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos em equipamento de marca Varian, modelo AS 400 ou de marca Bruker, modelo AC 200. Os espectros de RMN de <sup>31</sup>P foram obtidos em equipamento de marca Bruker, modelo AC 200.

O diâmetro e distribuição de partículas poliméricas foram determinados utilizando-se um equipamento de difração de LASER Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK).

A dispersão de partículas foi realizada utilizando-se um processador ultrassônico UP200S (Hielscher, Germany).

As amostras para micrografia foram cobertas com ouro em equipamento Leica EM SCD500 (Leica Microsystems, USA)

As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura JSM-6390LV (Jeol, USA).

### 6.2 PREPARO DO FOSFATO DE DIPENTILA

Preparou-se o éster dipentílico do ácido fosfórico conforme previamente descrito na literatura.<sup>(101)</sup> Em um balão de capacidade 100 mL, adicionou-se uma solução de *N*-metilimidazol (5,95 g, 75 mmol) em clorofórmio seco (17,5 mL) a uma suspensão de PCl<sub>5</sub> (3,29 g, 15 mmol) em clorofórmio seco (32,5 mL) com agitação mecânica à

temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio. Após quatro horas, sem isolar o sal formado, evaporou-se o solvente e, sob atmosfera inerte, adicionou-se excesso de pentanol previamente seco com  $K_2CO_3$ . A suspensão foi aquecida a  $80\text{ }^\circ\text{C}$  por uma hora. O excesso de pentanol foi retirado como azeótropo com água. À mistura reacional, adicionou-se acetato de etila. A solução resultante foi lavada com HCl aquoso, *brine* e água. A fase aceto-etílica foi seca em  $Na_2SO_4$  anidro, filtrada, rotaevaporada e posteriormente purificada por *Kugelrohr* resultando num óleo incolor (**Esquema 6 composto 2**). RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3, \delta$ ): 0,9 (m, 6 H) 1,4 (m, 8 H) 1,7 (m, 4 H) 1,9 (s, 1 H) 4,0 (dt,  $J_{3H-H} = 7\text{ Hz}$ ,  $J_{3H-P} = 7\text{ Hz}$ , 4 H) (**Figura 14**). RMN de  $^{13}C$  (101 MHz,  $CDCl_3, \delta$ ): 13,9 (s, 1 C) 22,2 (s, 1 C) 27,6 (s, 1 C) 30,0 (d,  $J = 7\text{ Hz}$ , 1 C) 67,6 (d,  $J = 6\text{ Hz}$ , 1 C) (**Figura 15**). RMN $^{31}P$  (81 MHz,  $H_3PO_4, \delta$ ): 0,00 (quin,  $J = 7\text{ Hz}$ , 1 P) (**Figura 16**).

### 6.3 PREPARO DE MIPS/NIP POR POLIMERIZAÇÃO EM BLOCO

#### 6.3.1 PREPARO DE MIP1

Em tubo de ensaio de capacidade 100 mL dissolveu-se (238 mg, 1 mmol) do modelo fosfato de dipentila em (4,65 mL, 57,2 mmol) de  $CHCl_3$ . A essa solução adicionaram-se (171  $\mu\text{L}$ , 2 mmol) de ácido metacrílico. Agitou-se a mistura até completa dissolução. Em seguida, adicionaram-se (3853  $\mu\text{L}$ , 20 mmol) de reticulador dimetacrilato de etilenoglicol (DMAEG) e (33,5 mg, 0,2 mmol) de iniciador radicalar AIBN. Novamente agitou-se a mistura até completa dissolução dos componentes. Submeteu-se a solução a ultrassom em banho de gelo por 10 minutos para remoção dos gases dissolvidos. Em seguida purgou-se o conjunto com argônio por 5 minutos.

Fechou-se o tubo e aqueceu-se gradualmente a até  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , ficando nessa temperatura por 24 horas. Quebrou-se o tubo e o bloco polimérico resultante foi seco a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  sob vácuo por 48 horas.

Após seco, moeu-se o polímero em moinho de facas e posteriormente em gral com pistilo e peneirou-se em três frações conforme o tamanho das partículas: F1 com diâmetro  $< 45\text{ }\mu\text{m}$ ; F2 com diâmetro  $> 45\text{ }\mu\text{m}$  e  $< 125\text{ }\mu\text{m}$  e F3 com diâmetro  $> 125\text{ }\mu\text{m}$ .

Submeteu-se as frações F1 e F2 a extração contínua em Soxhlet com ácido acético (10%) em metanol por 24 horas para extração do modelo e de monômeros, iniciador, reticulador e progéneo, em

seguida, com metanol por mais 24 horas para extração do ácido acético. Os rendimentos das frações F1 e F2 após extração foram de aproximadamente 15 e 80%, respectivamente. IV em KBr (número de onda em  $\text{cm}^{-1}$ , atribuição): 1730, estiramento C=O; 1162, estiramento C-O; 2960, estiramento alifático simétrico de C-H; 2992, estiramento alifático assimétrico de C-H (**Figura 18**).

### 6.3.2 PREPARO DE MIP2

Utilizou-se o método descrito para o preparo de MIP1 empregando-se, porém, fosfato de dipentila (119,1 mg, 0,5 mmol). IV em KBr (número de onda em  $\text{cm}^{-1}$ , atribuição): 1731, estiramento C=O; 1161, estiramento C-O; 2959, estiramento alifático simétrico de C-H; 2992, estiramento alifático assimétrico de C-H (**Figura 19**).

### 6.3.3 PREPARO DE MIP3

Utilizou-se o método descrito para o preparo de MIP1 empregando-se, porém, fosfato de dipentila (79,4 mg, 0,33 mmol). IV em KBr (número de onda em  $\text{cm}^{-1}$ , atribuição): 1731, estiramento C=O; 1161, estiramento C-O; 2961, estiramento alifático simétrico de C-H; 2992, estiramento alifático assimétrico de C-H (**Figura 20**).

### 6.3.4 PREPARO DE NIP

Utilizou-se o método descrito para o preparo de MIP1, porém, sem a presença do modelo fosfato de dipentila. IV em KBr (número de onda em  $\text{cm}^{-1}$ , atribuição): 1730, estiramento C=O; 1159, estiramento C-O; 2959, estiramento alifático simétrico de C-H; 2991, estiramento alifático assimétrico de C-H (**Figura 17**).

## 6.4 TESTE DE POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

Preparou-se um teste com polimerização por precipitação conforme previamente descrito.<sup>(65)</sup> Em tubo de ensaio de capacidade 100 mL dissolveram-se o reticulador DMAEG (867  $\mu\text{L}$ , 4,5 mmol) e o monômero funcional AMA (129  $\mu\text{L}$ , 1,5 mmol) em clorofórmio (30 mL). Purgou-se a solução resultante com argônio por 15 minutos. Após a purga, adicionou-se o iniciador radicalar AIBN (17,5 mg, 0,1 mmol),

quando selou-se o sistema e imergiu-se o mesmo em banho a 60 °C por 24 horas sem agitação.

Rotaevaporou-se a suspensão obtida para retirada do porogênio. Submeteu-se o polímero resultante à extração em Soxhlet com metanol por 24 horas e secou-se sob vácuo por 24 horas a 40 °C. IV em KBr (número de onda em  $\text{cm}^{-1}$ , atribuição): 1731, estiramento C=O; 1156, estiramento C-O; 2955, estiramento simétrico C-H alifático; 2988, estiramento assimétrico C-H alifático (**Figura 23**). Análise elementar: C 56 %, H 8 % e N 0 %.

## 6.5 PREPARO DE MIPS/NIPS POR POLIMERIZAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

Os polímeros MIP6 a MIP10 foram preparados conforme método previamente descrito.<sup>(65)</sup>

### 6.5.1 PREPARO DE MIP6

Em tubo de ensaio de capacidade 100 mL adicionaram-se o modelo fosfato de dibutila (156  $\mu\text{L}$ , 0,76 mmol), o monômero funcional AMA (261  $\mu\text{L}$ , 3,0 mmol), o reticulador DVB-80 (2603  $\mu\text{L}$ , 14,6 mmol), o porogênio acetonitrila:tolueno (3:1 v/v)(65 mL) e, por último, o iniciador radicalar AIBN (161,6 mg, 0,96 mmol). Fecharam-se os tubos e, em banho de gelo, purgou-se a mistura reacional com argônio por 5 minutos e submeteu-se o conjunto (ainda no banho de gelo) a 10 minutos de sonicação. Submergiu-se o tubo em banho de aquecimento (inclinação de 45 °) a 25 °C girando-os a 30 rpm e aqueceu-se de 25 a 60 °C em 2 horas. Manteve-se a rotação e temperatura de 60 °C por mais 24 horas. Filtrou-se o polímero precipitado, lavando-se com porogênio e secou-se ao ar. Submeteram-se os polímeros à extração contínua em Soxhlet com solução de ácido acético 10 % em metanol por 24 horas e em seguida com metanol por mais 24 horas. Secou-se sob vácuo a 40 °C.

### 6.5.2 PREPARO DE MIP7

Utilizou-se o método descrito para o preparo de MIP6 empregando-se, porém, o monômero funcional AA (211  $\mu\text{L}$ , 3,0 mmol).

### 6.5.3 PREPARO DE MIP8

Utilizou-se o método descrito para o preparo de MIP6 empregando-se, porém, o modelo fosfato de dibutila (208  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol), os monômeros funcionais metacrilato de 2-hidroxieta (127  $\mu\text{L}$ , 1,02 mmol), ácido metacrílico (87  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol) e 1-vinilimidazol (93  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol).

### 6.5.4 PREPARO DE MIP9

Utilizou-se o método descrito para o preparo de MIP6 empregando-se, porém, o modelo fosfato de dibutila (208  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol), os monômeros funcionais AMA (174  $\mu\text{L}$ , 2,0 mmol) e 1-vinilimidazol (93  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol).

### 6.5.5 PREPARO DE MIP10

Utilizou-se o método descrito para o preparo de MIP6 empregando-se, porém, o modelo fosfato de dibutila (208  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol), o monômero funcional AMA (87  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol) e 1-vinilimidazol (186  $\mu\text{L}$ , 2,0 mmol).

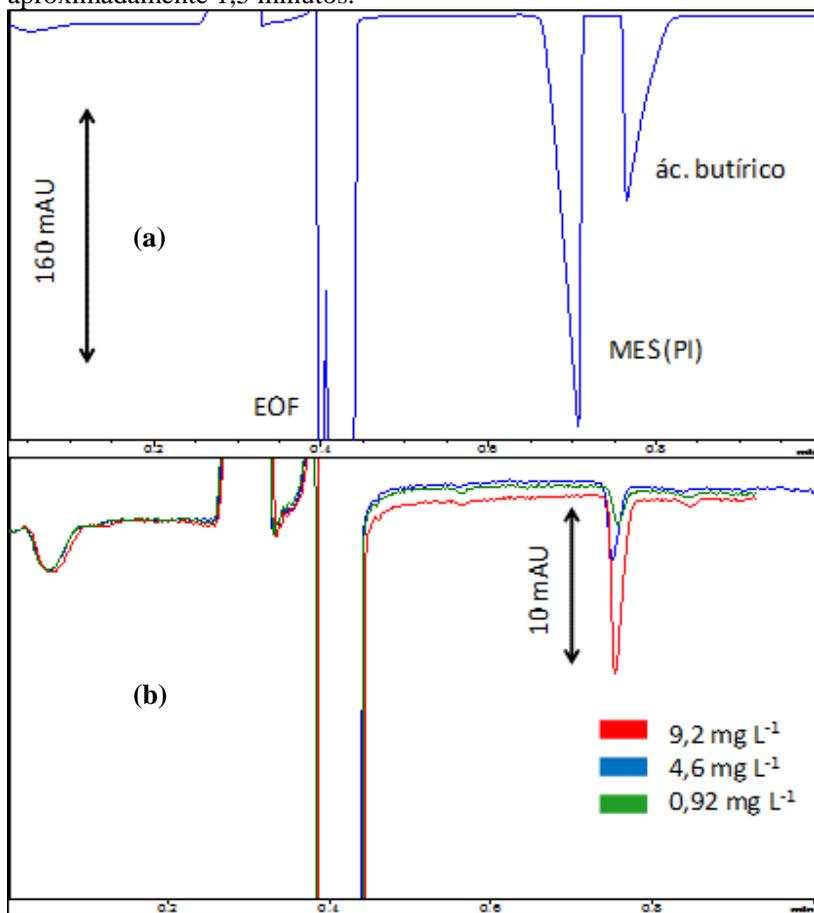
### 6.5.6 PREPARO DE NIP6 A NIP10

Utilizaram-se os métodos descritos para o preparo dos respectivos MIPs, contudo sem o emprego de modelo fosfato de dibutila.

## 6.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS BUTÍRICO E VALÉRICO POR ELETROFORESE CAPILAR

Efetuu-se a determinação de ácido valérico com capilar de sílica fundida com 32 cm de comprimento total, 8,5 cm de tamanho efetivo (comprimento da injeção até o detector) e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno. A injeção foi hidrodinâmica (por pressão) por 5 s a 50 mbar. A detecção deu-se por método indireto, utilizando-se como eletrólito de corrida TRIS 30 mmol  $\text{L}^{-1}$  + ácido 3,5-dinitrobenzóico (BGE) 15 mmol  $\text{L}^{-1}$  a pH 8,1 e comprimento de onda de 254 nm. A injeção foi por polaridade positiva, com tensão de 30 kV aplicada para a separação. Como padrão interno utilizou-se ácido 2-(*N*-morfolino)etanossulfônico

(MES). Realizou-se um pré-condicionamento com BGE por 0,5 minutos (**Figura 43**). O tempo total de análise de cada amostra foi de aproximadamente 1,5 minutos.



**Figura 43** Exemplo de eletroferograma para eletroforese capilar de ácido butírico (a) e variação da área de sinal do analito com variação da concentração (b)

## 6.7 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO UTILIZADAS NO ESTUDO DE CATÁLISE

A reação de butanólise de ácido butírico efetuou-se com o seguinte método: em balão de duas bocas de capacidade 10 mL adicionou-se 200 mg de Amberlyst 15 e 9,7 mL de 1-butanol. O conjunto foi submetido a aquecimento em banho a 60 °C, sob agitação magnética, por 30 minutos. Adicionaram-se 324  $\mu\text{L}$  (1/30 mol em relação ao álcool) de ácido butírico (considerado tempo zero). A primeira alíquota de 5  $\mu\text{L}$  foi coletada em 5 minutos de reação e as demais (de mesmo volume) a intervalos pré-determinados (5 min; 0,5; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5h; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 26,0 e 50 horas). Congelou-se cada alíquota tão logo foi coletada. Enviou-se o conjunto total das alíquotas de cada reação para determinação da concentração de ácido por eletroforese capilar.

Todas as reações estudadas foram efetuadas conforme a reação de butanólise de ácido butírico, com modificações no ácido empregado, álcool, massa de catalisador e temperatura. Estas variáveis são apresentadas na **Tabela 7**.

## 6.8 MIPS COMO MODIFICADORES DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATOS

### 6.8.1 PREPARO DE SENSORES

O EPC convencional foi obtido pela mistura de grafite em pó e óleo mineral. Os EPCs modificados foram preparados misturando-se 30 mg de MIP ou NIP (modificadores) com 200 mg de grafite, representando 15 % (em massa) do agente modificador no conteúdo total, e em seguida, adicionado-se óleo mineral. Os eletrodos modificados foram nomeados de acordo com o componente modificador adicionado, sendo eles: EPCMIP1, EPCMIP2, EPCMIP3 e EPCNIP.

## 6.8.2 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Utilizaram-se voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada como as técnicas principais para o desenvolvimento dos procedimentos analíticos. O pré-tratamento eletroquímico consistiu de aplicação de 25 ciclos voltamétricos sobre os eletrodos de trabalho (EPCs) em HCl/KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito de suporte e posteriormente foram aplicados mais 25 ciclos voltamétricos em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito de suporte, aplicando-se um potencial (E) de 2,0 a -2,0 V com uma velocidade de varredura (v) de 200 mV.s<sup>-1</sup>. A técnica de voltametria cíclica foi também utilizada para caracterização do sinal eletroquímico do analito sobre os eletrodos modificados. Foram aplicados ciclos voltamétricos entre 1,5 e -1,0 V na ausência e na presença do analito para os EPCs sem e com modificação. A técnica de voltametria de onda quadrada foi aplicada de 1,5 a -0,3 V à frequência (f) de 40 Hz, amplitude (a) de 100 mV e incremento de potencial (ΔE) de 8 mV, com todos os parâmetros sendo otimizados anteriormente.

A célula eletroquímica foi purgada com N<sub>2(g)</sub> por 30 minutos para eliminar o O<sub>2(g)</sub> dissolvido na solução. Durante a voltametria de onda quadrada o eletrodo foi submetido ao condicionamento com a aplicação de -0,3 V por 30 s para limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho, seguido pela aplicação de 1,5 V por 30 s para pré-concentração do analito junto à superfície do eletrodo de trabalho antes da varredura na faixa de potencial previamente estabelecida.

## 6.8.3 CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

Os valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos utilizando o método baseado nos parâmetros das curvas de calibração para os quatro eletrodos modificados. O método baseado nos parâmetros Ca curva de calibração é estatisticamente mais confiável<sup>(105)</sup>, pois desconsidera a relação sinal-ruído causadora de muito erros por representar um parâmetro dependente da técnica que se usa. Neste método, o LD pode ser calculado de acordo com a expressão:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S_b}$$

onde 3,3 representa o intervalo de confiança de 95%, s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação para a melhor reta da curva de calibração, e S<sub>b</sub> representa a inclinação da equação da melhor reta da curva de calibração, para cada uma das curvas de calibração dos

eletrodos modificados. Para um intervalo de confiança de 95%, o LQ pode ser calculado de acordo com a equação:

$$LQ = 10 \frac{s}{S_b}$$

O cálculo da estimativa do desvio padrão se dá como descrito em Skoog<sup>(106)</sup>:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y}_i)^2}{(n - 2)}}$$

Os valores de s estão reunidos na tabela 2, assim como os valores para S<sub>b</sub>, que são aqueles indicados nas equações de reta.



## REFERÊNCIAS

- 1 SALIMON, J. *et al.* Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 112, n. 5, p. 519-530, 2010;
- 2 TOKONAMI, S. *et al.* Review: Micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications. *Analytica Chimica Acta*, v. 641, n. 1-2, p. 7-13, 2009;
- 3 OTERA, J. *Esterification: Methods, Reactions and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
- 4 OTERA, J. Transesterification. *Chemical Reviews*, v. 93, n. 4, p. 1449-1470, 1993/06/01 1993;
- 5 SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 200-216, 2010;
- 6 DÍAZ, I. *et al.* Synthesis, characterization and catalytic activity of MCM-41-type mesoporous silicas functionalized with sulfonic acid. *Applied Catalysis A: General*, v. 205, n. 1-2, p. 19-30, 2001;
- 7 ÖZBAY, N. *et al.* Esterification of free fatty acids in waste cooking oils (WCO): Role of ion-exchange resins. *Fuel*, v. 87, n. 10-11, p. 1789-1798, 2008;
- 8 SAKA, S.; KUSDIANA, D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel*, v. 80, n. 2, p. 225-231, 2001;
- 9 VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 421-430, 2008;
- 10 MARCHETTI, J. M. *et al.* Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, n. 6, p. 1300-1311, 2007;

- 11 MESIANO, A. J. *et al.* Supercritical Biocatalysis. ***Chemical Reviews***, v. 99, n. 2, p. 623-634, 1999/02/01 1999;
- 12 CHOWDARY, G. V.; PRAPULLA, S. G. Kinetic study on lipase-catalyzed esterification in organic solvents. ***Indian Journal of Chemistry***, v. 44B, p. 2322-2327, 2005;
- 13 AKOH, C. C. *et al.* Enzymatic Approach to Biodiesel Production. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 55, n. 22, p. 8995-9005, 2007;
- 14 CARREA, G.; RIVA, S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. ***Angewandte Chemie International Edition***, v. 39, n. 13, p. 2226-2254, 2000;
- 15 KUNISHIMA, M. *et al.* Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and water-soluble condensing agent: DMT-MM. ***Tetrahedron***, v. 57, n. 8, p. 1551-1558, 2001;
- 16 KUNISHIMA, M. *et al.* 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride: an efficient condensing agent leading to the formation of amides and esters. ***Tetrahedron***, v. 55, n. 46, p. 13159-13170, 1999;
- 17 DI SERIO, M. *et al.* Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production. ***Energy & Fuels***, v. 22, n. 1, p. 207-217, 2008/01/01 2007;
- 18 SCHUCHARDT, U. *et al.* Transesterification of vegetable oils: a review. ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, v. 9, p. 199-210, 1998;
- 19 SUPPES, G. *et al.* Calcium carbonate catalyzed alcoholysis of fats and oils. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 78, n. 2, p. 139-146, 2001;
- 20 LIU, X. *et al.* Calcium Ethoxide as a Solid Base Catalyst for the Transesterification of Soybean Oil to Biodiesel. ***Energy & Fuels***, v. 22, n. 2, p. 1313-1317, 2008/03/01 2008;

- 21 ZABETI, M. *et al.* Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review. ***Fuel Processing Technology***, v. 90, n. 6, p. 770-777, 2009;
- 22 TODA, M. *et al.* Green chemistry: Biodiesel made with sugar catalyst. ***Nature***, v. 438, n. 7065, p. 178-178, 2005;
- 23 ZIMMERMAN, S. C.; LEMCOFF, N. G. Synthetic hosts via molecular imprinting?are universal synthetic antibodies realistically possible? ***Chemical Communications***, n. 1, p. 5, 2004;
- 24 YE, L.; MOSBACH, K. Molecular Imprinting: Synthetic Materials As Substitutes for Biological Antibodies and Receptors†. ***Chemistry of Materials***, v. 20, n. 3, p. 859-868, 2008/02/01 2008;
- 25 WULFF, G. Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers. ***Chemical Reviews***, v. 102, n. 1, p. 1-28, 2001;
- 26 VANNOSTRUM, C. Molecular imprinting: A new tool for drug innovation. ***Drug Discovery Today: Technologies***, v. 2, n. 1, p. 119-124, 2005;
- 27 TAKEUCHI, T. *et al.* Combinatorial Molecular Imprinting: An Approach to Synthetic Polymer Receptors. ***Analytical Chemistry***, v. 71, n. 2, p. 285-290, 1998;
- 28 SPIVAK, D. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 57, n. 12, p. 1779-1794, 2005;
- 29 SIBRIAN-VAZQUEZ, M.; SPIVAK, D. A. Molecular Imprinting Made Easy. ***Journal of the American Chemical Society***, v. 126, n. 25, p. 7827-7833, 2004/06/01 2004;
- 30 POTYRAILO, R. A.; MIRSKY, V. M. Combinatorial and High-Throughput Development of Sensing Materials: The First 10 Years. ***Chemical Reviews***, v. 108, n. 2, p. 770-813, 2008/02/01 2008;

- 31 PETCU, M. *et al.* Probing the limits of molecular imprinting: strategies with a template of limited size and functionality. *Journal of Molecular Recognition*, v. 22, n. 1, p. 18-25, 2009;
- 32 PATEK, M.; DREW, M. Chemical synthesis in nanosized cavities. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 12, n. 3, p. 332-339, 2008;
- 33 MEREDITH, J. C. A current perspective on high-throughput polymer science. *Journal of Materials Science*, v. 38, n. 22, p. 4427-4437, 2003;
- 34 MCCLUSKEY, A. *et al.* Molecularly imprinted polymers (MIPs): sensing, an explosive new opportunity? *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 5, n. 20, p. 3233-3244, 2007;
- 35 MAYES, A.; WHITCOMBE, M. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 12, p. 1742-1778, 2005;
- 36 MAHONY, J. *et al.* Molecularly imprinted polymers-potential and challenges in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, v. 534, n. 1, p. 31-39, 2005;
- 37 KARIM, K. *et al.* How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 12, p. 1795-1808, 2005;
- 38 HILLBERG, A.; TABRIZIAN, M. Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems. *Irbm*, v. 29, n. 2-3, p. 89-104, 2008;
- 39 HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chemical Reviews*, v. 100, n. 7, p. 2495-2504, 2000/07/01 2000;
- 40 DAVIS, M. E. *et al.* Rational Catalyst Design via Imprinted Nanostructured Materials. *Chemistry of Materials*, v. 8, n. 8, p. 1820-1839, 1996;

- 41 DAVIES, M. Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, v. 504, n. 1, p. 7-14, 2004;
- 42 BATRA, D. Combinatorial methods in molecular imprinting. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 7, n. 3, p. 434-442, 2003;
- 43 ALVAREZLORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *Journal of Chromatography B*, v. 804, n. 1, p. 231-245, 2004;
- 44 ALEXANDER, C. *et al.* Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, v. 19, n. 2, p. 106-180, 2006;
- 45 ALEXANDER, C. *et al.* Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis. *Tetrahedron*, v. 59, n. 12, p. 2025-2057, 2003;
- 46 MARCHETTI, L.; LEVINE, M. Biomimetic Catalysis. *ACS Catalysis*, v. 1, n. 9, p. 1090-1118, 2011/09/02 2011;
- 47 ZHAI, C. Molecularly imprinted layer-coated silica nanoparticles toward highly selective separation of active diosgenin from *Dioscorea nipponica* Makino. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 12, p. 2254-2262, 2009;
- 48 REZAEI, B. *et al.* Solid-phase molecularly imprinted pre-concentration and spectrophotometric determination of isoxicam in pharmaceuticals and human serum. *Talanta*, v. 78, n. 2, p. 418-423, 2009;
- 49 CHENG, Z. *et al.* Synthesis of an Enzyme-like Imprinted Polymer with the Substrate as the Template, and Its Catalytic Properties under Aqueous Conditions. *Chemistry - A European Journal*, v. 10, n. 14, p. 3555-3561, 2004;
- 50 LI, S. *et al.* 'On/off'-switchable catalysis by a smart enzyme-like imprinted polymer. *Journal of Catalysis*, v. 278, n. 2, p. 173-180, 2011;

51 SVENSON, J. *et al.* A Molecularly Imprinted Polymer-Based Synthetic Transaminase. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, n. 27, p. 8554-8560, 2004/07/01 2004;

52 ZHANG, H. *et al.* Molecularly Imprinted Nanoreactors for Regioselective Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 13, p. 4178-4179, 2006/04/01 2006;

53 WULFF, G.; KNORR, K. Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting. *Bioseparation*, v. 10, n. 6, p. 257-276, 2001;

54 WULFF, G.; BIFFIS, A. Chapter 4 Molecular imprinting with covalent or stoichiometric non-covalent interactions. In: BÖRJE, S. (Ed.). *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*: Elsevier, 2000. p. 71-111;

55 WULFF, G. Selective binding to polymers via covalent bonds. The construction of chiral cavities as specific receptor sites. *Pure and Applied Chemistry*, v. 54, n. 11, p. 2093-2102, 1982;

56 WEITH, H. L. *et al.* Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components. *Biochemistry*, v. 9, n. 22, p. 4396-4401, 1970/10/01 1970;

57 LIU, J.-Q.; WULFF, G. N. Functional Mimicry of Carboxypeptidase A by a Combination of Transition State Stabilization and a Defined Orientation of Catalytic Moieties in Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 25, p. 8044-8054, 2008/06/01 2008;

58 KRUPPA, M.; KÖNIG, B. Reversible Coordinative Bonds in Molecular Recognition. *Chemical Reviews*, v. 106, n. 9, p. 3520-3560, 2006/09/01 2006;

59 WHITCOMBE, M. J. *et al.* A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for

Cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, n. 27, p. 7105-7111, 1995/07/01 1995;

60 MARTY, J. D.; MAUZAC, M. Molecular Imprinting: State of the Art and Perspectives - Microlithography: Springer Berlin / Heidelberg, 2005. p. 1-35. (Advances in Polymer Science);

61 STRIKOVSKY, A. G. *et al.* Catalytic Molecularly Imprinted Polymers Using Conventional Bulk Polymerization or Suspension Polymerization: Selective Hydrolysis of Diphenyl Carbonate and Diphenyl Carbamate. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, n. 26, p. 6295-6296, 2000;

62 SANTOS, W. J. R. *et al.* Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 5, p. 820-825, 2009;

63 KEMPE, M.; MOSBACH, K. Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 691, n. 1-2, p. 317-323, 1995;

64 MAYES, A. G.; MOSBACH, K. Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 21, p. 3769-3774, 1996;

65 ZU, B. *et al.* Preparation of molecularly imprinted polymer microspheres via atom transfer radical precipitation polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 47, n. 13, p. 3257-3270, 2009;

66 KAN, X. Molecularly imprinted polymers microsphere prepared by precipitation polymerization for hydroquinone recognition. *Talanta*, v. 75, n. 1, p. 22-26, 2008;

67 ROESELING, D. *et al.* Microreactor-Based Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Beads Used for Explosive Detection. *Organic Process Research & Development*, v. 13, n. 5, p. 1007-1013, 2009/09/18 2009;

68 DJOZAN, D. Preparation and binding study of solid-phase microextraction fiber on the basis of ametryn-imprinted polymer. Application to the selective extraction of persistent triazine herbicides in tap water, rice, maize and onion. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 12, p. 2211-2219, 2009;

69 MENG, Z. *et al.* A molecularly imprinted catalyst designed by a computational approach in catalysing a transesterification process. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, n. 6, p. 1068-1075, 2004;

70 SELLERGREEN, B. *et al.* Enantioselective Ester Hydrolysis Catalyzed by Imprinted Polymers. 2. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 65, n. 13, p. 4009-4027, 2000;

71 VOLKMANN, A.; BRÜGGEMANN, O. Catalysis of an ester hydrolysis applying molecularly imprinted polymer shells based on an immobilised chiral template. *Reactive and Functional Polymers*, v. 66, n. 12, p. 1725-1733, 2006;

72 KAWANAMI, Y. *et al.* Imprinted polymer catalysts for the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 145, n. 1-2, p. 107-110, 1999;

73 BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*. New York: Oxford, 1994.

74 OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG, R. A. Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, v. 57, n. 1, p. 101A-110A, 1985;

75 ALIZADEH, T. *et al.* Development of a voltammetric sensor based on a molecularly imprinted polymer (MIP) for caffeine measurement. *Electrochimica Acta*, v. 55, n. 5, p. 1568-1574, 2010;

76 ALIZADEH, T. *et al.* Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode modified with molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry*, v. 130, n. 4, p. 1108-1114, 2012;

77 JAVANBAKHT, M. *et al.* A selective and sensitive voltammetric sensor based on molecularly imprinted polymer for the determination of

dipyridamole in pharmaceuticals and biological fluids. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 182, n. 0, p. 362-367, 2013;

78 JAVANBAKHT, M. *et al.* Molecularly imprinted polymer based potentiometric sensor for the determination of hydroxyzine in tablets and biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, v. 612, n. 1, p. 65-74, 2008;

79 GHOLIVAND, M. B. *et al.* Determination of lamotrigine by using molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 692, n. 0, p. 9-16, 2013;

80 GHOLIVAND, M. B.; TORKASHVAND, M. A novel high selective and sensitive metronidazole voltammetric sensor based on a molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Talanta*, v. 84, n. 3, p. 905-912, 2011;

81 GHOLIVAND, M. B.; KARIMIAN, N. Development of piroxicam sensor based on molecular imprinted polymer-modified carbon paste electrode. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 8, p. 1844-1851, 2011;

82 ALIZADEH, T.; AKHOUNDIAN, M. Promethazine determination in plasma samples by using carbon paste electrode modified with molecularly imprinted polymer (MIP): Coupling of extraction, preconcentration and electrochemical determination. *Electrochimica Acta*, v. 55, n. 20, p. 5867-5873, 2010;

83 ALIZADEH, T. *et al.* Fabrication of an Extra Sensitive Voltammetric Sensor Using Nanoparticles of Molecularly Imprinted Polymer for Determination of Ultra-Trace Promethazine in Plasma Sample. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 7, p. 10427-10441, 2012;

84 GHOLIVAND, M. B. *et al.* Computational design and synthesis of a high selective molecularly imprinted polymer for voltammetric sensing of propazine in food samples. *Talanta*, v. 89, n. 0, p. 513-520, 2012;

85 ARVAND, M.; ALIREZANEJAD, F. New sensing material of molecularly imprinted polymer for the selective recognition of

sulfamethoxazole in foods and plasma and employing the Taguchi optimization methodology to optimize the carbon paste electrode. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 10, n. 1, p. 93-105, 2013/02/01 2013;

86 SADEGHI, S. *et al.* Electroanalytical determination of sulfasalazine in pharmaceutical and biological samples using molecularly imprinted polymer modified carbon paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 168, n. 0, p. 336-344, 2012;

87 AFKHAMI, A. *et al.* Fabrication of a new electrochemical sensor based on a new nano-molecularly imprinted polymer for highly selective and sensitive determination of tramadol in human urine samples. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 44, n. 0, p. 34-40, 2013;

88 SOLEIMANI, M. *et al.* High-Selective Tramadol Sensor Based on Modified Molecularly Imprinted Polymer: Carbon Paste Electrode with Multiwalled Carbon Nanotubes. *Electroanalysis*, v. 25, n. 5, p. 1159-1168, 2013;

89 ALIZADEH, T. *et al.* A new molecularly imprinted polymer (MIP)-based electrochemical sensor for monitoring 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in natural waters and soil samples. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 5, p. 1166-1172, 2010;

90 WANG, Y. *et al.* Bisphenol A sensing based on surface molecularly imprinted, ordered mesoporous silica. *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 5, p. 2105-2109, 2011;

91 LI, J. *et al.* A strategy for constructing sensitive and renewable molecularly imprinted electrochemical sensors for melamine detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 706, n. 2, p. 255-260, 2011;

92 DENG, P. *et al.* Electrocatalytic reduction and determination of p-nitrophenol on acetylene black paste electrode coated with salicylaldehyde-modified chitosan. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 168, n. 0, p. 381-389, 2012;

93 ALIZADEH, T. *et al.* A novel high selective and sensitive para-nitrophenol voltammetric sensor, based on a molecularly imprinted

- polymer-carbon paste electrode. *Talanta*, v. 79, n. 5, p. 1197-1203, 2009;
- 94 ALIZADEH, T. High Selective Parathion Voltammetric Sensor Development by Using an Acrylic Based Molecularly Imprinted Polymer-Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*, v. 21, n. 13, p. 1490-1498, 2009;
- 95 ALIZADEH, T. Comparison of different methodologies for integration of molecularly imprinted polymer and electrochemical transducer in order to develop a paraoxon voltammetric sensor. *Thin Solid Films*, v. 518, n. 21, p. 6099-6106, 2010;
- 96 ZHIHUA, W. *et al.* Copper(II) determination by using carbon paste electrode modified with molecularly imprinted polymer. *Electrochimica Acta*, v. 58, n. 0, p. 750-756, 2011;
- 97 ASHKENANI, H.; TAHER, M. Determination of cadmium(II) using carbon paste electrode modified with a Cd-ion imprinted polymer. *Microchimica Acta*, v. 178, n. 1-2, p. 53-60, 2012/07/01 2012;
- 98 HUBER, G. W. *et al.* Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. *Chemical Reviews*, v. 106, n. 9, p. 4044-4098, 2006;
- 99 BRUMLIK, M.; BUCKLEY, J. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 7, p. 2060-2064, April 1, 1996 1996;
- 100 WITHERS-MARTINEZ, C. *et al.* A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity: crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig. *Structure*, v. 4, n. 11, p. 1363-1374, 1996;
- 101 PIPKO, S. E. *et al.* Synthesis and structure of complexes of phosphorus pentachloride with 4-dimethylaminopyridine and n-methylimidazole. *Heteroatom Chemistry*, v. 19, n. 2, p. 171-177, 2008;
- 102 WANG, J. *et al.* Monodisperse, Molecularly Imprinted Polymer Microspheres Prepared by Precipitation Polymerization for Affinity

Separation Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 42, n. 43, p. 5336-5338, 2003;

103 DOWNEY, J. S. *et al.* Poly(divinylbenzene) Microspheres as an Intermediate Morphology between Microgel, Macrogel, and Coagulum in Cross-Linking Precipitation Polymerization. *Macromolecules*, v. 34, n. 13, p. 4534-4541, 2001/06/01 2001;

104 MEHER, L. *et al.* Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006;

105 RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004;

106 SKOOG, D. A. *et al.* *Fundamentos de química analítica*. São Paulo: Reverté, 1997.