



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Curso de Química (Bacharelado)

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA EXTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA UTILIZANDO POLÍMERO MOLECULARMENTE
IMPRESSO PARA DETERMINAÇÃO DE SACARINA**

**IZABELLA FERNANDA FERREIRA DOMINGUES
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Orientadora: Prof. Dr^a Ana Cristi Basile Dias

Co-orientadora: M^a Camila Santos Dourado

Brasília – 1º/2019



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Curso de Química (Bacharelado)

IZABELLA FERNANDA FERREIRA DOMINGUES

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
UTILIZANDO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO PARA
DETERMINAÇÃO DE SACARINA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química – IQ, da Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial ao programa de graduação em Química, para obtenção do título de Bacharel em Química.

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Cássia e Edi, por todo apoio, amor e dedicação e por me ensinarem a nunca desistir, essa vitória com certeza também é de vocês.

Ao meu namorado e amigo André por toda a paciência, incentivo, carinho e por estar ao meu lado mesmo nas horas difíceis.

Aos meus amigos Malu, Carol, Isabelle, Liz, Ana Elisa, Eric, Eduardo, Miguel e Enzo pelo companheirismo e por fazerem dessa etapa da minha vida uma das mais felizes e divertidas.

Às minhas amigas de laboratório Maria Vitoria e Juliana por deixarem meus dias de trabalho mais felizes.

Às minhas orientadoras Ana Cristi e Camila por me guiarem durante todo o processo e me ensinarem o que é pesquisa científica.

A todos os integrantes do grupo AQQUA/LIAMA pelo acolhimento e por me mostrarem que ninguém faz pesquisa sozinho.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAP-DF pelo apoio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa jornada meu muito obrigada.

RESUMO

A sacarina (SAC) é amplamente usada como adoçante em diversos alimentos. Pesquisas atuais apontam riscos à saúde humana relacionados ao consumo prolongado da SAC. Devido ao fato de ser formulada em combinação com outros edulcorantes, a sua determinação depende de métodos laboriosos. Assim, este trabalho objetivou estudar os parâmetros de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) seletiva a SAC para o preparo de amostras de chás. Para otimizar as etapas da MISPE empregou-se um planejamento fatorial 2^3 e a determinação da SAC foi realizada com o auxílio de espectrômetro UV-Vis. Os fatores avaliados em dois níveis foram: (1) solvente de condicionamento, (2) massa do polímero molecularmente impresso (MIP) e (3) solvente de eluição. Observou-se que os fatores com os efeitos significativos para 95% de confiança foram o (2) e a interação (23). A combinação desses fatores resultou em recuperação média de 95 % da SAC confirmada por HPLC-UV com fator de preconcentração de 3 vezes. Foi feita a comparação entre MIP e NIP e o MIP demonstrou-se 4 vezes mais seletivo. O volume de *breakthrough* do cartucho foi de 60 mL e sua capacidade adsortiva, $0,45 \text{ mg g}^{-1}$. O método foi aplicado em amostras de chá diet comerciais e os fatores de recuperação obtidos ficaram acima de 75%. Os dados demonstram que o planejamento fatorial foi eficaz na otimização das etapas da SPE com menor consumo de reagentes. O método em desenvolvimento aponta aspectos inovadores ao utilizar o MIP na extração da SAC e maior simplicidade de detecção.

Palavras chave: chás, preparo de amostra, MIP, sacarina, SPE, alimentos, MISPE

ABSTRACT

Saccharin (SAC) is widely used as a sweetener in various foods. Current research points out risks to human health related to prolonged consumption of SAC. Due to the fact that it is formulated in combination with other sweeteners, its determination depends on laborious methods. Thus, this work's aim was to study the parameters of a molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) selective to SAC for preparation of tea samples. In order to optimize the MISPE steps, a 2^3 factorial design was used, and the SAC determination was performed using a UV-Vis spectrometer. The factors evaluated were: (1) conditioning solvent, (2) quantity of molecularly imprinted polymer (MIP) per cartridge and (3) elution solvent. It was observed that the factors with the significant effects at a confidence level of 95% were (2) and the interaction (23). The combination of these factors resulted in an average recovery of 95% of the SAC confirmed by HPLC-UV with 3-fold preconcentration factor. A comparison between MIP and NIP was made and MIP was shown to be 4 times more selective to SAC. The cartridge breakthrough volume was of 60 mL and its adsorptive capacity, 0.45 mg g^{-1} . This method was applied in commercially available diet tea samples and SAC recoveries were above 75%. These results show that the factorial design applied was effective in optimizing MISPE steps with lower reagent consumption. The developing method points to innovative aspects when using MIP to extract SAC and greater simplicity of detection.

Key-words: tea, sample preparation, MIP, saccharin, SPE, foodstuffs, MISPE

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE EQUAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Sacarina.....	4
3.2. Extração em Fase Sólida.....	4
3.4. MISPE.....	7
3.5. Breakthrough	8
3.3. Planejamento Fatorial.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1. Reagentes	11
4.2. Equipamentos e materiais	11
4.3. Vidrarias e utensílios.....	11
4.4. Polímero molecularmente impresso (MIP).....	12
4.5. Estudos de pH	12
4.6. Preparação dos cartuchos de extração	13
4.7. Montagem do sistema de extração	14
4.8 Construção do planejamento fatorial	14
4.8.1. Experimentos do planejamento	15
4.9. Método HPLC-UV para determinação de sacarina	18
4.10. Estudos do efeito de vazão do carreamento.....	18
4.11. Avaliação da impressão molecular com polímero controle	18
4.12. <i>Breakthrough</i> e capacidade adsortiva da fase sólida	18
4.13. Estudos preliminares de regeneração	19
4.14. Aplicação de amostra de chá.....	19
4.14.1. Preparo das amostras	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
5.1. Estudos de pH	21
5.2. Planejamento fatorial	22
5.3. Estudos de vazão	25

5.4. Estudos de impressão com polímero controle	25
5.5. Volume de <i>breakthrough</i>	26
5.6. Estudos preliminares de regeneração	27
5.7. Aplicação de amostras de chá.....	28
6. CONCLUSÕES	32
7. BIBLIOGRAFIA	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ALC: agente de ligação cruzada

AMA-APTES: ácido metacrílico – (3-amipropil)trietoxissilano)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18: fase sólida octadecil

HCl: ácido clorídrico

HPLC: *high performance liquid chromatography*

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MF: monômero funcional

MIP: polímero molecularmente impresso

MISPE: *molecularly imprinted polymers*

MM: molécula molde

NaOH: hidróxido de sódio

NIP: polímero não impresso

Q: capacidade adsortiva

RPM: rotações por minuto

SAC: sacarina

SPE: *solid phase extraction*

UV-Vis: ultravioleta – visível

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da capacidade adsorptiva, em que C_i =concentração inicial da solução, C_f =concentração após adsorção, v =volume de solução utilizada e m =massa de MIP.	13
Equação 2. Cálculo para determinação da recuperação de cada experimento em que C_E = concentração do eluato.	16
Equação 3. Cálculo de variância.	17
Equação 4. Cálculo da variância das observações.	17
Equação 5. Cálculo da variância dos efeitos.	17
Equação 6. Cálculo do desvio padrão dos efeitos.	17
Equação 7. Cálculo de intervalo de confiança para 95%.	17
Equação 8. Média das respostas referentes ao nível superior do planejamento fatorial.	17
Equação 9. Média das respostas referentes ao nível inferior do planejamento fatorial.	17
Equação 10. Cálculo do efeito, referente à diferença das médias inferior e superior.	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores estudados no planejamento fatorial e seus níveis.....	15
Tabela 2. Tabela codificada de experimentos.....	15
Tabela 3. Valores de concentração de SAC no sobrenadante e Q em cada pH.	21
Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial.	23
Tabela 5. Valores calculados para cada efeito.....	24
Tabela 6. Concentração de SAC obtida para cada vazão estudada.	25
Tabela 7. Recuperação (Rec) de SAC após aplicação do método de SPE utilizando cartuchos de MIP e de NIP.	26
Tabela 8. Concentração de SAC presente nas soluções coletadas após cada ciclo de regeneração.	28
Tabela 9. Aplicações das amostras no método sem preparo de amostra.....	29
Tabela 10. Resultados de recuperação após preparo de amostra.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da SAC na sua forma orgânica.	1
Figura 2. Cartucho utilizado na extração em fase sólida.	5
Figura 3. Esquema das etapas envolvidas em SPE (DOURADO, 2016).	6
Figura 4. Esquema genérico da síntese do Polímero Molecularmente Impresso. Adaptado de Figueiredo et al., 2008.	8
Figura 5. Curva de breakthrough para SPE relacionando a concentração do percolado (C) e o volume de amostra percolada (V). VB=volume de breakthrough, VE=volume de equilíbrio, C0=concentração da amostra. Adaptado de Bielicka-Daszkiwicz; Voelkel, 2009..	9
Figura 6. Cartuchos de extração montados com a ordem da montagem indicada: 1) Fritz; 2) Membrana de filtração; 3) MIP; e 4)Fritz.....	13
Figura 7. Sistema montado para a SPE. A) Cartucho de extração. B) Tubo de Vitton.	14
Figura 8. Curva de calibração no UV de SAC em água destilada.	21
Figura 9. Curvas de calibração no UV de SAC em: A) tampão hidrogenocarbonato pH 9 e B) metanol pH 9	22
Figura 10. Representação esquemática do planejamento fatorial realizado. Cada vértice representa um experimento realizado e contém o valor de resposta obtido. Os níveis inferiores resultantes da interação estão evidenciados em azul e os superiores, em vermelho.....	23
Figura 11. Curva de breakthrough. VB (volume de breakthrough) indica o volume em que é atingida a capacidade adsortiva máxima do cartucho.	27
Figura 12. Curva de calibração do método HPLC-UV.....	28
Figura 13. Cromatograma separação dos compostos: ciclamato de sódio, acessulfame de potássio, SAC e cafeína.....	29
Figura 14. Cromatograma da amostra antes (amostra) e após preparo de amostra com MISPE (eluato).	31

1. INTRODUÇÃO

A sacarina (SAC) é um dos adoçantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia em substituição ao açúcar. No geral, os adoçantes auxiliam no controle dos níveis de açúcar no sangue em diabéticos e podem, ainda, aumentar o tempo de vida útil dos alimentos. Diante disso, esse edulcorante está presente na maioria dos alimentos, principalmente em bebidas como refrigerantes e chás, classificados como dietéticos ou “*diet*” sendo vastamente consumido por indivíduos que buscam dietas com restrições calóricas (SPOELSTRA; SCHIFF; BROWN, 2013).

Apesar de não ser metabolizada pelo corpo humano, diversos estudos apontam a relação entre o consumo regular da SAC e efeitos adversos à saúde, como o desenvolvimento de problemas dermatológicos, respiratórios e câncer. (BRNARDO et al., 2016; NOVATO et al., 2018; PUROHIT; MISHRA, 2018). Nesse contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) limita a presença desse edulcorante em alimentos à uma concentração de 150 mg L⁻¹ (ANVISA, 2007).

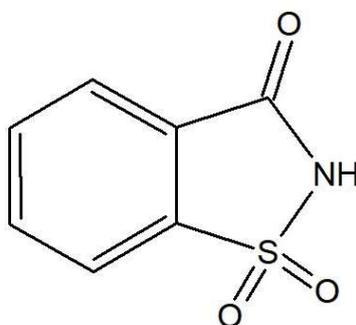


Figura 1. Estrutura molecular da SAC na sua forma orgânica.

Diante da complexidade das matrizes alimentícias, a determinação de SAC depende de métodos laboriosos, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, HPLC *High Performance Liquid Chromatography*) o método ditado pela ANVISA (ANVISA, 2007). Uma alternativa que viabiliza a utilização de métodos mais simples de detecção é a aplicação de uma etapa de preparo de amostra, (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015).

Atualmente, o procedimento mais utilizado para a realização dessa etapa na análise de bebidas é a Extração em Fase Sólida (do inglês, SPE,

Solid Phase Extraction) (JARDIM, 2015; ORDÓÑEZ et al., 2012). O princípio dessa técnica é baseado na utilização de um sorvente (fase sólida) que possua afinidade química ao analito de interesse de modo a deixá-lo retido na fase sólida para posterior recuperação e determinação analítica (JARDIM, 2015).

Visando o desenvolvimento de métodos seletivos baseados em SPE, é frequente a utilização de polímeros molecularmente impressos (do inglês, MIP, *Molecularly Imprinted Polymer*) como fase sólida (MISPE – *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*) para o preparo de amostras complexas. Isso porque esses polímeros apresentam sítios seletivos de interação com o analito de interesse resultantes do processo de impressão que ocorre durante a sua síntese (SZATKOWSKA et al., 2013; TAMAYO; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2007).

Todavia, para qualquer fase sólida utilizada, é necessária a avaliação das etapas básicas envolvidas na extração. No procedimento de SPE estas etapas podem ser otimizadas de modo a encontrar as condições que proporcionem índices de retenção e recuperação mais eficazes (ANDRADE-EIROA et al., 2016). Atualmente, as ferramentas de otimização multivariadas estão sendo bastante empregadas para este fim, visto que podem produzir resultados mais realistas ao considerar a interdependência de variáveis aliadas a economia de tempo de bancada (FILHO, 2015; NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

Nesse contexto, este presente trabalho tem como principal objetivo a otimização multivariada dos parâmetros da SPE por meio de planejamento fatorial utilizando MIP como fase sólida para a extração de SAC em amostras de chás.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um método de preparo de amostra baseado em MISPE para a determinação de sacarina em amostra de chá.

2.1. Objetivos específicos

- Otimizar o sistema de extração de forma multivariada por meio da realização de um planejamento fatorial;
- Determinar o volume de breakthrough e capacidade adsortiva do MIP como fase sólida;
- Aplicar o MISPE para extração de sacarina em amostras de chás.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Sacarina

A SAC é o adoçante não calórico sintético mais antigo no mercado, sendo descoberto em 1879, e é, atualmente, o edulcorante mais utilizado devido ao seu baixo custo de produção e alto poder adoçante. Em alimentos, é geralmente utilizada em conjunto com o ciclamato de sódio, pois este mascara o gosto amargo da SAC (CARVALHO, 2007).

Desde sua aprovação como aditivo alimentar, diversos estudos foram realizados para verificar seus potenciais efeitos na saúde. Em 1977, um estudo apontou o potencial carcinogênico da SAC quando ingerida em altas quantidades após testes realizado em ratos (NOVATO et al., 2018; PUROHIT; MISHRA, 2018). Estudos mais recentes mostram uma relação entre o consumo contínuo de SAC e a alteração da microbiota intestinal, a resistência à insulina, problemas respiratórios, convulsões. Além disso, a sua adição em alimentos aumenta consideravelmente o teor de sódio, visto que a SAC é utilizada na sua forma sódica como aditivo. (BERNARDO et al., 2016; LOHNER; TOEWS; MEERPOHL, 2017; SWITHERS, 2013). Apesar dos efeitos adversos da sua ingestão, a utilização de SAC é permitida em mais de 90 países, sendo consumida, principalmente, por meio de bebidas dietéticas como chás (CHANG; YEH, 2014; LORENZO et al., 2015; ZYGLER; WASIK; NAMIEŚNIK, 2009).

Tendo em vista seu alto consumo e os possíveis efeitos à saúde, é essencial a estipulação de limites máximos e o monitoramento de SAC em bebidas dietéticas comercializadas. No Brasil, esse controle é feito pela ANVISA, que preconiza um limite de 0,015 g de SAC para cada 100 g ou 100 mL de produto e o método empregado para seu monitoramento é por cromatografia líquida com detecção no ultravioleta (ANVISA, 2007; MAPA, 2013).

3.2. Extração em Fase Sólida

Apesar do avanço das técnicas analíticas nos últimos anos, estas apresentam seletividade limitada em determinações diretas. Isso se apresenta como um desafio analítico ao se trabalhar com amostras complexas. Nesse

sentido, o preparo de amostras é uma etapa fundamental para o desenvolvimento do método analítico. Essa etapa pode ser destinada para a limpeza da amostra, ou *clean up*, através da remoção dos interferentes da matriz, e/ou separação e concentração do analito, promovendo a sua disponibilidade para detecção. (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015). Entre as diversas técnicas de preparo de amostra existentes, a SPE é a mais utilizada para o preparo de amostras de bebidas, visto que promove uma limpeza da amostra com um baixo consumo de reagentes (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015; ORDÓÑEZ et al., 2012; ZYGLER; WASIK; NAMIEŚNIK, 2009).

A SPE é uma técnica de preparo de amostra baseada na extração do analito ou dos interferentes da amostra, sendo uma das mais utilizadas devido às suas vantagens sobre a extração líquido-líquido, tais como: menor consumo de solvente orgânico, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação, volumes reduzidos de resíduos tóxicos e melhoria em seletividade (JARDIM, 2015).

Nessa técnica, a separação do analito ocorre por meio das interações entre as espécies presentes em uma solução de amostra e uma fase sólida de elevada área superficial. Essas interações podem ocorrer por meio de forças químicas como: interação iônica, forças de London, ligação de hidrogênio, partição, entre outras. Elas permitem que essas espécies, sendo elas o analito ou interferente, fiquem retidas na fase sólida e sejam separadas da matriz. Para a realização da SPE é empregado um cartucho de extração, este apresenta o formato de uma seringa, em sua maioria feita de polipropileno, preenchido com uma massa determinada de material extrator fixado entre dois filtros (Figura 2) (DOURADO, 2016; JARDIM, 2015).

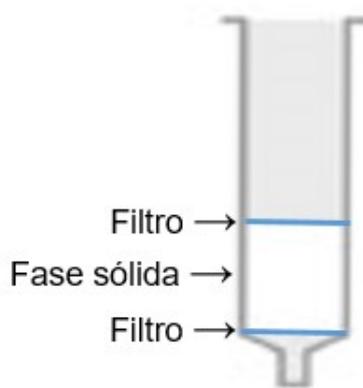


Figura 2. Cartucho utilizado na extração em fase sólida.

As etapas envolvidas no procedimento de SPE são: (1) condicionamento/ativação; (2) carregamento/*loading* da amostra; (3) lavagem; e (4) eluição, representadas esquematicamente na Figura 3. No condicionamento, percola-se um solvente pela fase sólida, de modo que a área superficial disponível desta aumente e ative os sítios de interação, melhorando a sua performance como material adsorvente. Após o condicionamento, a amostra é percolada pela fase sólida de modo que as espécies presentes em solução que apresentarem maior afinidade com a fase sólida fiquem retidas nesta, sendo extraídas da matriz. Em fases sólidas comerciais, não apenas o analito pode ficar retido na superfície do material, mas também alguns interferentes podem encontrar-se adsorvidos. Diante disso, necessita-se da etapa posterior, denominada de lavagem, a qual utiliza-se um solvente que interaja bem com as espécies interferentes, de modo que elas sejam removidas e mais espécies do analito fiquem na fase sólida. Por fim, promove-se a extração do analito por meio de um eluente, que deve realizar interações o suficiente para romper a ligação do analito com a fase sólida e deixá-lo disponível no eluato para posterior detecção (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015; JARDIM, 2015).

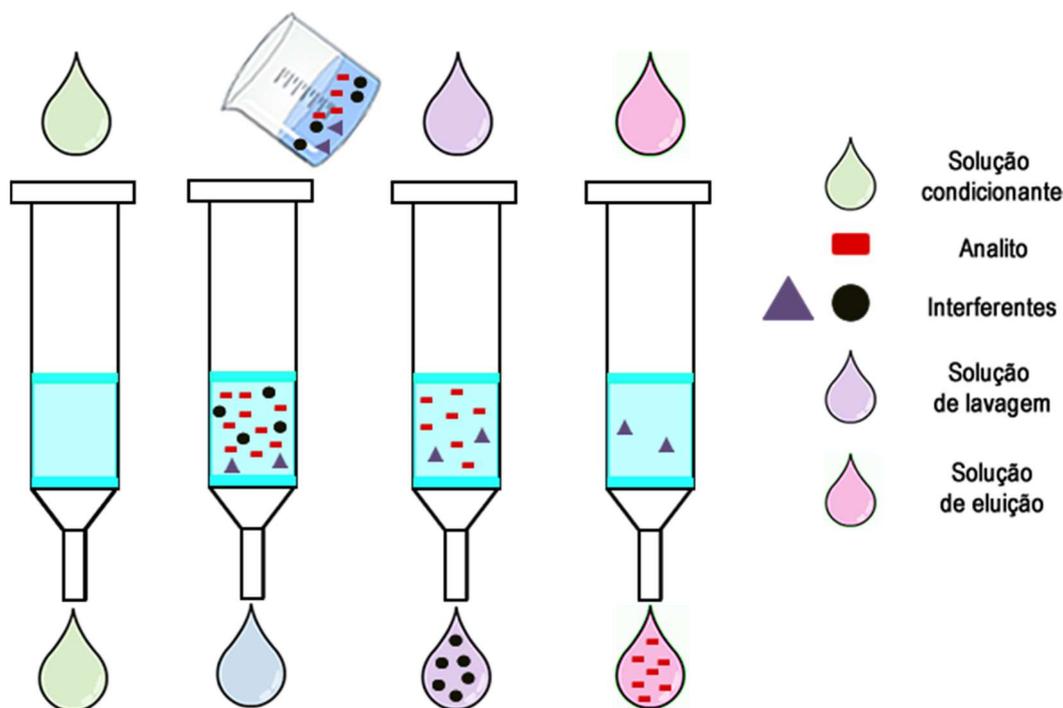


Figura 3. Esquema das etapas envolvidas em SPE (DOURADO, 2016).

No entanto, devido à baixa seletividade das fases comerciais disponíveis, o desenvolvimento do método baseado em SPE é, muitas vezes, oneroso e , no caso de amostras de bebidas, ainda é necessário a utilização de técnicas de detecção sofisticadas como HPLC e espectrometria de massas (CHANG; YEH, 2014; LORENZO et al., 2015). De modo a solucionar isso, SPE baseadas em fases sólidas mais específicas, como os MIP, têm chamado a atenção dos pesquisadores na área diante das suas vantagens, como: maior seletividade e especificidade na separação do analito de interesse (SANTOS; FIGUEIREDO, 2015; SPIVAK, 2005) por meio de cavidades construídas no material direcionadas a este. Assim, os MIP substituem as fases solidas comuns proporcionando maiores índices de recuperação do analito e menor coextração de interferentes (SZATKOWSKA et al., 2013; ZHAO et al., 2015).

3.4. MISPE

O conceito de impressão molecular foi baseado no processo de formação de anticorpos *in vitro* proposto por Pauling (PAULING, 1940). Em seus estudos, Pauling percebeu que o anticorpo era modelado ao redor do antígeno mediante ligações seletivas. Nesse contexto, surgiu a ideia da síntese de um material sintético similar a esse processo antígeno-anticorpo, com o objetivo de formar cavidades específicas para uma molécula molde (MM) (SZATKOWSKA et al., 2013).

Os MIP apresentam sítios de interação seletivos à MM, que são formados durante a sua síntese por meio de um processo de impressão (Figura 4). Esse processo ocorre por meio da interação entre grupos funcionais presentes na MM com os grupos funcionais do monômero funcional (MF), seguida da polimerização feita por meio de um agente de ligação cruzada (ALC) (KUBO; OTSUKA, 2016). Ao fim, a MM é retirada da matriz polimérica, resultando em um material resistente e poroso com cavidades tridimensionais específicas para a MM. Visto que materiais poliméricos, no geral, são porosos e possuem capacidade adsortiva, para determinar se a impressão do MIP foi efetiva é necessária a síntese de um polímero de controle NIP (do inglês *Non Imprinted Polimer*). Essa síntese é idêntica à do MIP, utilizando-se os mesmos

MF e ALC, mas sem adição de MM, dessa maneira não ocorre o processo de impressão.

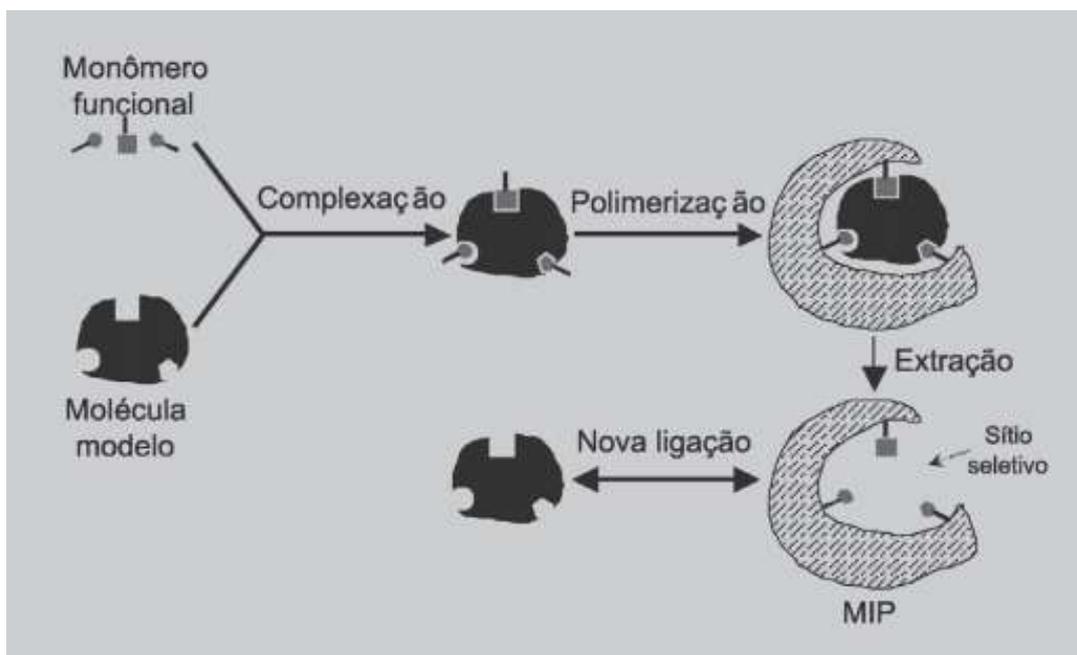


Figura 4. Esquema genérico da síntese do Polímero Molecularmente Impresso. Adaptado de Figueiredo et al., 2008.

Logo, a MISPE vem se destacando como uma técnica altamente seletiva (JARDIM, 2015) com grande aplicação em preparo de amostras de bebidas (DING et al., 2006; YANG et al., 2014). Além da seletividade do MIP, outras características do material influenciam no fator de recuperação da MISPE, como, por exemplo, o volume de *breakthrough*.

3.5. Breakthrough

Volume de breakthrough (V_B) pode ser definido como o volume de amostra que pode ser passada pela fase sólida sem que ocorra a perda de analitos. Podendo ser determinado tanto de maneira teórica como experimental. A última é feita relacionando o volume de amostra percolada pela fase sólida com a concentração de analito presente no percolado (BIELICKA-DASZKIEWICZ; VOELKEL, 2009).

Com esses dados é construída uma curva de *breakthrough* (Figura 5), onde V_B corresponde ao volume de percolado em que não há a presença do analito e V_E , ao volume em que a concentração do percolado é igual à concentração total da amostra utilizada (C_0). O comportamento da curva

depende da superfície de contato, a capacidade adsortiva da fase sólida e a cinética da interação do material com o analito. (BIELICKA-DASZKIEWICZ; VOELKEL, 2009; MOLDOVEANU; DAVID, 2002)

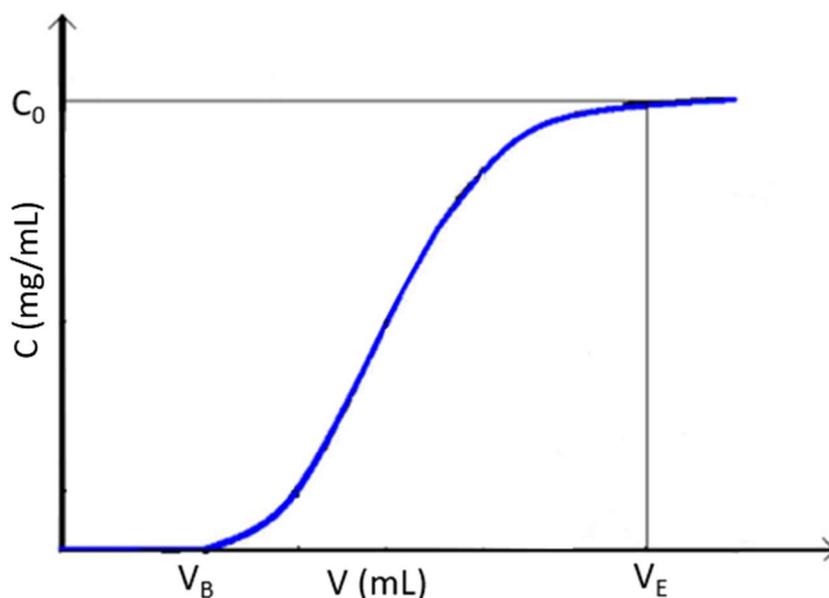


Figura 5. Curva de breakthrough para SPE relacionando a concentração do percolado (C) e o volume de amostra percolada (V). V_B =volume de breakthrough, V_E =volume de equilíbrio, C_0 =concentração da amostra. Adaptado de (BIELICKA-DASZKIEWICZ; VOELKEL, 2009).

Em suma, é possível observar que a eficácia de uma SPE é dependente de diversos fatores (regentes utilizados no processo de extração, interação entre o analito e a fase sólida utilizada e volume de *breakthrough* da fase sólida) que devem ser levados em consideração quando se deseja utilizá-la para o preparo de amostras. No entanto, para aumentar a eficiência do método de MISPE, é necessária uma avaliação das etapas envolvidas no processo de extração do analito para que a recuperação deste seja a melhor possível, ou seja, é necessária a realização de uma otimização.

3.3. Planejamento Fatorial

O processo de otimização de um sistema pode ser realizado ajustando cada parâmetro individualmente, porém essa abordagem pode acarretar em um resultado ótimo relativo ou local, visto que as variáveis podem ser interdependentes. Logo, para que um ponto ótimo global seja determinado para o sistema, pode-se empregar uma otimização multivariada dos parâmetros por meio de um planejamento fatorial (NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010;

OLIVEIRA et al., 2015) que pode proporcionar ao método melhores índices de recuperação.

Para a construção de um planejamento fatorial é necessário, primeiramente, que sejam determinados os fatores a serem avaliados e as respostas que se deseja avaliar. No caso de uma SPE, os fatores são, normalmente, os parâmetros envolvidos na técnica e uma otimização desses parâmetros tem como objetivo uma combinação que resultem em um bom índice de recuperação (quanto de analito adicionado é recuperado ao fim do processo). Esses fatores são aplicados à SPE em diferentes níveis de modo a determinar se têm influência sobre a resposta obtida e como influenciam esse resultado (NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

Na avaliação inicial de uma SPE, pode ser aplicado um planejamento fatorial de apenas dois níveis para determinar se os fatores que serão estudados influenciam os resultados obtidos. Nesse caso são escolhidos n fatores a serem avaliados em cada um dos dois níveis e são realizados, no mínimo, 2^n experimentos, de modo a avaliar todas as possíveis combinações entre os fatores estudados. Após a realização desses experimentos, por meio dos resultados, é possível avaliar se há, de fato, uma interação entre os fatores estudados. Ao fim do planejamento, é possível determinar os fatores e níveis mais adequados para serem aplicados na SPE de modo que esta apresente boas taxas de recuperação do analito (NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

Tendo em vista o contexto atual, este trabalho de conclusão de curso objetiva o desenvolvimento de um método de preparo de amostra baseado em MISPE por meio de um planejamento fatorial para a extração de SAC em chá *diet*, bem como avaliar o volume de *breakthrough* do MIP como fase sólida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

- Sacarina, pureza > 99%, Sigma Aldrich;
- Metanol, grau HPLC, pureza > 99%, Tedia;
- Acetonitrila, grau HPLC, pureza > 99%, Tedia;
- Ácido clorídrico, 37%, Bio-Grade;
- Ácido acético glacial, > 99%, Sigma Aldrich;
- Hidróxido de sódio, 98%, Sigma Aldrich;
- Bicarbonato de sódio, 99%, J Baker;
- Fosfato de sódio monopotássico, 98%, Vetec.

4.2. Equipamentos e materiais

- Espectrofotômetro UV-Vis, modelo: Cary 8454, Agilent;
- Centrífuga de bancada, modelo: KC5, velocidade máxima 4000 rpm, Kindly;
- Bomba peristáltica, modelo: CP 78001-12, ISMATEC;
- Concentrador, modelo: TE-019, TECNAL;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, modelo LC-20 AD, composto por uma bomba de alta pressão, detector: PDA Flexar, alça de amostragem: 20 µL, software: Chromera 3.4.0 5712, Perkin Elmer;
- Coluna C 18, 5 µm, dimensões: 250 mm x 4,6 mm, Browniee Analytical Perkin Elmer;
- MIP e NIP sintetizado pelo grupo LIAMA;
- Balança analítica, precisão de 0,0001 g, Shimadzu;
- Banho ultrassom, modelo: 1400, Unique;
- Homogeneizador hematológico, modelo: SP – 260H, SPLabor;
- Estufa, Nova Ética.

4.3. Vidrarias e utensílios

- Micro pipetas automáticas;
- Bureta de 25 mL;
- Suporte universal;

- Cubeta de quartzo com tampa, volume: 3,5 mL, loncell;
- Tubos de Vitton, Cole-Parmer Instrument Co;
- Tubos de ensaio com tampa, capacidade 10 mL
- Tubos Falcon de 15 mL e 45 mL;
- Seringas de 5 mL;
- Frits de polipropileno, 0.22 μm ;
- Membrana de filtração 0,22 μm , Millipore;
- Bastão de vidro;
- Béqueres;
- Balões volumétricos;
- Pipetas Pasteur;
- Vials âmbar, capacidade máxima 2 mL.

4.4. Polímero molecularmente impresso (MIP)

O MIP utilizado foi sintetizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica (LIAMA) por meio do processo de suspensão utilizando o monômero híbrido ácido metacrílico – (3-amipropiltriétoxissilano) (AMA-APTES). O material possui fator de impressão igual a 4,69; capacidade adsortiva de 4,88 mg g⁻¹ e coeficiente de seletividade relativo igual a 4,9; sendo 9 vezes mais seletivo à SAC que à cafeína e 3 vezes que ao ciclamato (DOURADO et al., 2018).

4.5. Estudos de pH

Para determinar o melhor pH para adsorção do analito foram colocados 40 mg de MIP em tubos falcon e 10 mL de solução de sacarina 20 mg L⁻¹ em diferentes pH: 3, 5, 7 e 10. Esses tubos foram agitados por 2 horas, centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram analisados no espectrômetro UV-Vis. Por fim, foi calculado a capacidade adsortiva (Q) do material para cada pH utilizando a Equação 1.

$$Q = \frac{(C_i - C_f) \times v}{m}$$

Equação 1. Cálculo da capacidade adsortiva, em que C_i =concentração inicial da solução, C_f =concentração após adsorção, v =volume de solução utilizada e m =massa de MIP.

A curva de calibração utilizada nesses estudos foi construída utilizando soluções de padrão de SAC em água destilada nas concentrações 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 12,0; 15,0; 20,0; 25,0; 35,0 e 40,0 mg L⁻¹. As medidas foram feitas em replicata (n=3) e foi feita a relação entre a média das absorbâncias e a concentração de SAC.

4.6. Preparação dos cartuchos de extração

Os cartuchos de extração utilizados na SPE (Figura 6) foram montados utilizando seringas de 5 mL e fritz removidos de cartuchos comerciais já utilizados e que seriam descartados. Para a sua utilização, essas seringas e fritz foram sonicados por 1 h em solução 10% de Extran neutro e, após seu enxague com água, foram sonicados por 1 h em água destilada.

A montagem dos cartuchos foi feita colocando um fritz na ponta da seringa, seguido de uma membrana de filtração 0,22 µm e 200 mg de MIP e, por fim, outro fritz. O MIP foi pesado diretamente no cartucho, utilizando-se uma balança analítica, e a colocação do fritz foi realizada com o auxílio de um bastão de vidro.

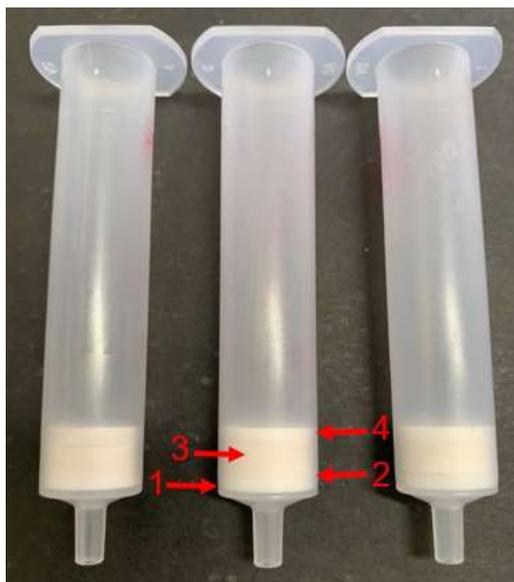


Figura 6. Cartuchos de extração montados com a ordem da montagem indicada: 1) Fritz; 2) Membrana de filtração; 3) MIP; e 4) Fritz.

4.7. Montagem do sistema de extração

O sistema de extração foi montado acoplando-se o cartucho a uma bomba peristáltica por meio de um tubo de Vitton. Para apoiar o cartucho, de modo que ficasse na posição vertical, este foi preso a uma garra fixada em um suporte universal (Figura 7).

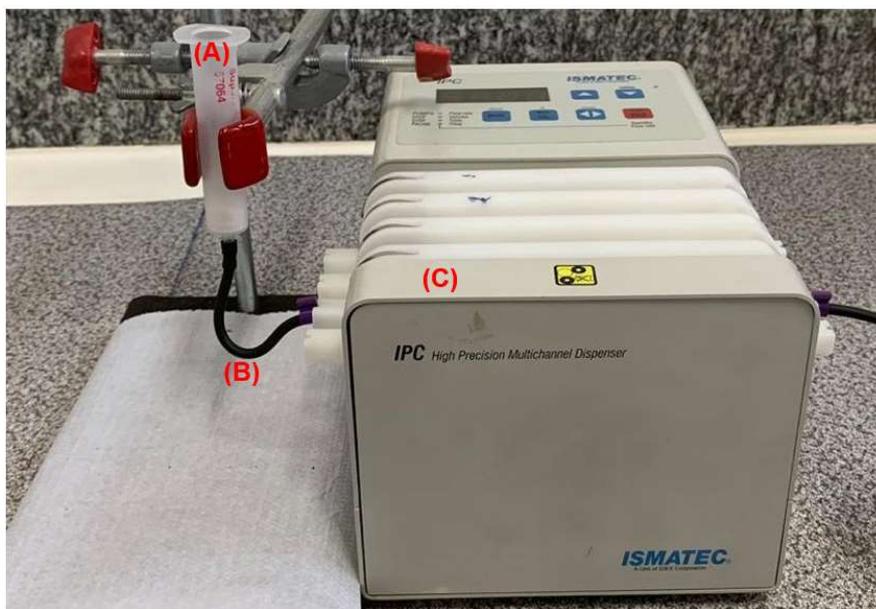


Figura 7. Sistema montado para a SPE. A) Cartucho de extração. B) Tubo de Vitton.

4.8 Construção do planejamento fatorial

De modo a se obter a melhor recuperação possível, ou seja, próxima de 100%, foi realizada uma otimização multivariada da SPE. Devido à possível interação entre as etapas que constituem a técnica, optou-se por realizar um planejamento fatorial completo 2^3 .

Os fatores selecionados foram as etapas de condicionamento, eluição e massa de MIP. A etapa de condicionamento da fase sólida foi composta de uma etapa de equilíbrio seguida de uma de ativação, portanto, avaliou-se a influência dos solventes utilizados nessas etapas. Então, o primeiro fator escolhido foi o condicionamento e seus níveis foram: solução $3,11 \text{ mmol L}^{-1}$ de HCl (pH 3) no equilíbrio e metanol na ativação e; metanol no equilíbrio e solução de HCl na ativação.

Devido a heterogeneidade do material polimérico sintetizado (DOURADO et al., 2018), decidiu-se, também, avaliar a influência da massa de MIP utilizada no sistema. Portanto, o segundo fator foi a massa de MIP e seus níveis foram: 200 mg e 100 mg. Foi escolhido para o terceiro fator, o solvente

utilizado na etapa de eluição, sendo eles: tampão de hidrogenocarbonato pH 9 ou metanol pH 9, alcalinizada com uma solução 0,1 mmol L⁻¹ de hidróxido de sódio, os fatores e níveis escolhidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores estudados no planejamento fatorial e seus níveis.

Fatores	Níveis	
	-1	1
1 Condicionamento (equilíbrio / ativação)	Metanol / HCl pH 3	HCl pH 3 / Metanol
2 Massa MIP	100 mg	200 mg
3 Eluição	Tampão pH 9	Metanol pH 9

4.8.1. Experimentos do planejamento

Para os experimentos realizados no planejamento fatorial foram construídas duas curvas analíticas no espectrofotômetro UV-Vis, uma em tampão hidrogenocarbonato pH 9 e outra em metanol pH 9. Para ambas, foram preparadas soluções de SAC nas concentrações: 2,5; 5,0; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0 e 22,5 mg L⁻¹. Cada medida foi feita em triplicata e as curvas foram construídas a partir da relação entre a média das absorbâncias em 232 nm e a concentração de SAC.

Após escolhidos os fatores e os níveis, foi montada a tabela codificada de experimentos (Tabela 2) a partir dos valores atribuídos na Tabela 1. Visto que se trata de um planejamento fatorial 2³, foram necessários 8 experimentos para avaliar as influências de cada fator no sistema.

Tabela 2. Tabela codificada de experimentos.

Experimento	Condicionamento	Massa MIP	Eluição
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Esses experimentos foram realizados em triplicata e de maneira aleatória, de modo a diminuir a ocorrência de erros sistemáticos, seguindo procedimento: primeiro foi adicionado 1 mL de solvente para equilíbrio da fase

seguido de 1 mL de solvente para a ativação da fase, constituindo a etapa de condicionamento. Seguidamente, para o carregamento do cartucho, foram percolados 9 mL de solução 5 mg L⁻¹ de SAC em HCl pH 3. Foi, então, realizada uma etapa de lavagem com 2 mL de água destilada e, por fim, a SAC contida no cartucho foi eluída com 3 mL do solvente avaliado, que foram coletados em um tubo de ensaio. As etapas de condicionamento e lavagem foram realizadas a uma vazão de 1 mL min⁻¹ e as de carregamento e eluição a 0,7 mL min⁻¹.

Após cada replicata, para a reutilização do cartucho, este era lavado com 5 mL de metanol à uma vazão de 0,3 mL min⁻¹, em seguida era centrifugado a uma velocidade de 4000 rpm por 10 minutos e, por fim, levado à estufa por 20 minutos à 80 °C para garantir a secagem total da fase.

Os eluatos obtidos foram analisados no espectrofotômetro UV-Vis, com o auxílio de uma cubeta de quartzo, e a determinação da quantidade de SAC foi feita com o valor de absorvância apresentada em 232 nm utilizando as relações absorvância/concentração ditadas pelas curvas analíticas descritas no início desta seção.

Como o carregamento do cartucho foi feito com 9 mL de amostra e a eluição com 3 mL, o eluato apresentaria o triplo da concentração da amostra (15 mg L⁻¹), caso fosse recuperado 100% da SAC. Logo, foi utilizada a Equação 2, que relaciona a concentração do eluato com a da amostra, para determinar a recuperação obtida em cada replicata, sendo que a resposta do sistema estudado foi a média das recuperações.

$$Recuperação = \frac{C_E (mg \cdot L^{-1})}{5 (mg \cdot L^{-1})} \times 100\%$$

Equação 2. Cálculo para determinação da recuperação de cada experimento em que C_E= concentração do eluato.

A partir das respostas obtidas, foram calculados os seguintes parâmetros estatísticos: as variâncias de cada resposta (Equação 3); a variância das observações (Equação 4), referente à variância total do planejamento realizado; a variância dos efeitos (Equação 5), que diz respeito à variância de cada efeito estudado, o desvio padrão das observações

(Equação 6) e o intervalo de confiança à um nível de 95% para 16 graus de liberdade (Equação 7) (NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Equação 3. Cálculo de variância.

$$s_{\text{observações}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n s_i^2}{n}$$

Equação 4. Cálculo da variância das observações.

$$s_{\text{efeitos}}^2 = \frac{s_{\text{observações}}^2}{6}$$

Equação 5. Cálculo da variância dos efeitos.

$$s_{\text{observações}} = \sqrt{s_{\text{efeitos}}^2}$$

Equação 6. Cálculo do desvio padrão dos efeitos.

$$IC_{95\%} = s_{\text{efeitos}} \times t_{\text{tabelado}}$$

Equação 7. Cálculo de intervalo de confiança para 95%.

O cálculo dos efeitos foi realizado seguindo o seguinte algoritmo: a princípio as respostas (y_i) foram separadas entre as referentes ao nível inferior (y_i^-) e as referentes ao nível superior (y_i^+), em seguida foram feitas médias dessas respostas (Equação 8 e 9) e por fim foi calculada diferença dessas médias (Equação 10) (FILHO, 2015; NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

$$\bar{Y}^+ = \frac{\sum_{i=1}^4 y_i^+}{4}$$

Equação 8. Média das respostas referentes ao nível superior do planejamento fatorial.

$$\bar{Y}^- = \frac{\sum_{i=1}^4 y_i^-}{4}$$

Equação 9. Média das respostas referentes ao nível inferior do planejamento fatorial.

$$Efeito = \bar{Y}^+ - \bar{Y}^-$$

Equação 10. Cálculo do efeito, referente à diferença das médias inferior e superior.

4.9. Método HPLC-UV para determinação de sacarina

As condições cromatográficas foram baseadas no método descrito pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2013) para determinação de edulcorantes. Foram feitas corridas de 27 minutos em um fluxo de 1 mL min⁻¹, sendo que, nos primeiros 15 minutos, este foi realizado de forma isocrática utilizando uma mistura de tampão fosfato pH 4 e acetonitrila (95:5). A partir dos 15 minutos foi aplicado um gradiente de 40% dessa solução e 60% acetonitrila. A detecção da SAC foi feita em 190 nm. Uma curva analítica foi construída utilizando padrões nas concentrações 0,05; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mg L⁻¹.

O método foi aplicado em uma solução preparada com padrões de ciclamato de sódio, acessulfame de potássio, sacarina e cafeína, todas na concentração de 50 mg L⁻¹

4.10. Estudos do efeito de vazão do carregamento

Para avaliar o efeito causado pela vazão durante o carregamento do cartucho, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.8.1, a partir dos fatores que apresentaram melhor resposta no planejamento fatorial, mudando a vazão para 0,5; 0,7; e 1 mL min⁻¹, os eluatos foram analisados por meio do método HPLC-UV descrito no item 4.9.

4.11. Avaliação da impressão molecular com polímero controle

De modo a verificar a seletividade do MIP, o procedimento da SPE determinado pelo planejamento fatorial foi realizado utilizando um cartucho contendo 200 mg do NIP como fase sólida. O eluato foi analisado por HPLC-UV e foi determinada a recuperação foi obtida por meio da Equação 2.

4.12. Breakthrough e capacidade adsortiva da fase sólida

Para a determinação do volume de breakthrough, foram percolados 250 mL de uma solução 1,5 mg L⁻¹ de SAC pH 3 no cartucho de extração já condicionado. Com o auxílio de uma bureta de 25 mL, as adições foram feitas de 5 em 5 mL e o percolado foi coletado em tubos de ensaio. Uma alíquota de 2 mL de cada tubo de ensaio foi analisada no HPLC-UV e as concentrações

foram determinadas de acordo com a curva analítica obtida no item 4.9. Para a construção da curva, foi feita a relação entre a concentração de SAC presente no percolado e o volume total de solução passado pelo cartucho.

4.13. Estudos preliminares de regeneração

De modo a determinar se seria possível recuperar a fase sólida após a sua saturação, foi realizado um procedimento de lavagem no cartucho utilizado no estudo de *breakthrough*. Esse procedimento foi feito da seguinte forma: primeiramente foram adicionados 9 mL de metanol pH 9 seguido de 5 mL de metanol. Em seguida foi realizado o primeiro ciclo de regeneração, que consistiu na adição de 5 mL de uma solução de metanol e ácido acético (90:10) seguida de 5 mL de metanol. Este ciclo foi realizado duas vezes e, ao fim de cada um, foi coletado uma alíquota de 2 mL em vials âmbar para ser analisado no HPLC-UV.

4.14. Aplicação de amostra de chá

Foram analisados três tipos de chá adquiridos em comércio local: dois chás *diet* de latinha da marca A (chá verde e chá branco) e um chá vermelho solúvel da marca B. De acordo com os rótulos, as concentrações de SAC eram de 40 mg L⁻¹ no chá verde, 35 mg L⁻¹ no chá branco e 31 mg L⁻¹ no chá vermelho.

4.14.1. Preparo das amostras

O preparo das soluções utilizadas foi realizado da seguinte maneira: um pequeno volume de chá verde e chá branco foram sonicados no banho de ultrassom por 15 minutos. Em seguida foram adicionadas alíquotas de 3 mL de chá em balões volumétricos de 25 mL que foram avolumados com uma solução de HCl pH 3, as soluções foram feitas em triplicata.

Para o chá solúvel, foram pesados 129 mg em um balão de 100 mL, que foi avolumado com uma solução de HCl pH 3, esta solução foi colocada no ultrassom por 5 min para garantir a dissolução total da amostra. Em seguida, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min e seu sobrenadante foi filtrado

com uma membrana de 0,22 μm . Esse procedimento também foi feito em triplicata.

O método de SPE otimizado empregou 1 mL de metanol seguido de 1 mL de solução HCl pH 3 na etapa de condicionamento, 9 mL de solução de amostra na etapa de carregamento, 2 mL de água destilada para lavagem do cartucho e, por fim, 3 mL de metanol pH 9 na eluição. Os eluatos foram coletados em tubos de ensaio que foram colocados em um concentrador até a evaporação total do solvente de eluição. Em seguida foi realizada a redissolução das amostras com 6 mL de tampão fosfato pH 4. Estas amostras foram analisadas por meio do método cromatográfico descrito no item 4.9.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Estudos de pH

Estes estudos foram realizados de modo a determinar em qual pH o MIP apresentaria maior Q, dessa forma, foram realizados os experimentos descritos no item 4.5.

As concentrações no sobrenadante foram determinadas a partir da curva contida na Figura 8 e, com esses valores, foi calculado o valor de Q (Equação 1) do MIP em cada pH (Tabela 3).

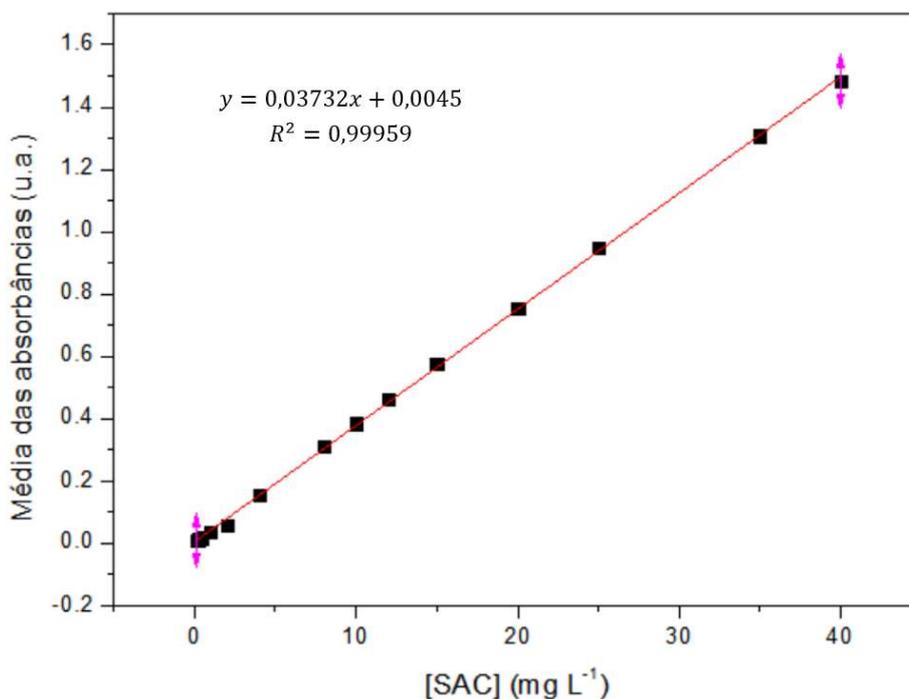


Figura 8. Curva de calibração no UV de SAC em água destilada.

Tabela 3. Valores de concentração de SAC no sobrenadante e Q em cada pH.

pH	[SAC] (mg L ⁻¹)	C _f (mg L ⁻¹)	Q (mg g ⁻¹)
3	20	11,90	2,03
5		13,87	1,53
7		13,89	1,53
10		19,88	0,03

A partir desses resultados é possível perceber que o MIP adsorve mais em pH 3, isso pode ser explicado pelo fato de que as interações entre a fase e o analito são ligações de hidrogênio. Como a SAC possui três sítios de interação receptores de H (carbonilas dos grupos sulfônico e amida) e um sítio doador de H (nitrogênio da amida), ela interage melhor com a fase quando todos os sítios doadores de H, tanto da fase sólida (grupos amida advindos do monômero híbrido AMA-APTES) quanto da SAC, estão protonados (DU et al., 2016).

5.2. Planejamento fatorial

Os experimentos realizados para a otimização do sistema de SPE proposto e a construção das curvas de calibração para determinação de SAC no UV-Vis foram realizados como descrito no item 4.8. Estas curvas estão representadas na Figura 9 e suas equações foram utilizadas para determinar a concentração de SAC presente nos eluatos de cada experimento do planejamento fatorial. O fator de recuperação para cada replicada foi calculado com a Equação 2, assim como descrito no item 4.8.1. Uma representação esquemática do planejamento fatorial realizado está contida na Figura 10 e a média dos fatores de recuperação para cada experimento encontram-se na Tabela 4, assim como a descrição dos experimentos em fatores codificados.

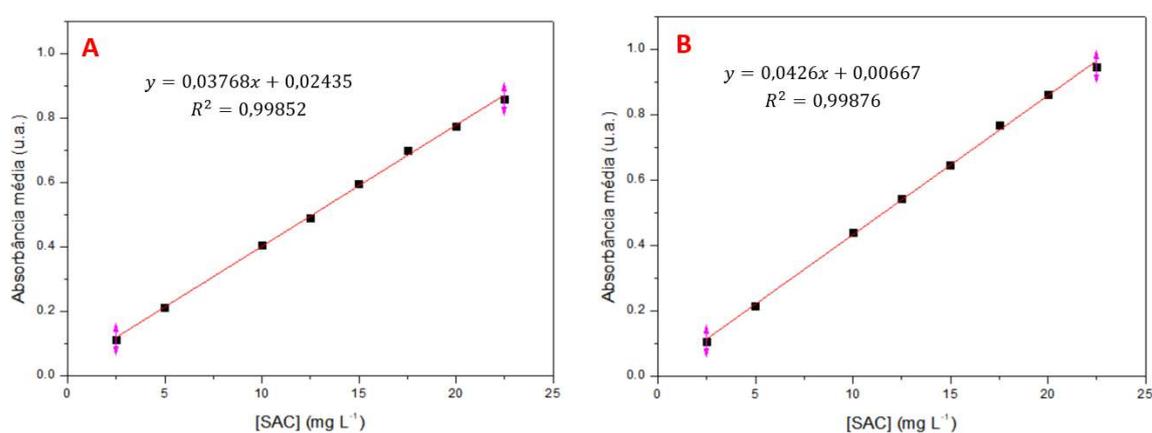


Figura 9. Curvas de calibração no UV de SAC em: A) tampão hidrogenocarbonato pH 9 e B) metanol pH 9.

Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial.

Experimento	Condicionamento	Massa MIP	Eluição	Recuperação média (%)
1	-1	-1	-1	85,5
2	1	-1	-1	81,5
3	-1	1	-1	76,4
4	1	1	-1	76,7
5	-1	-1	1	64,1
6	1	-1	1	54,8
7	-1	1	1	107,5
8	1	1	1	102,1

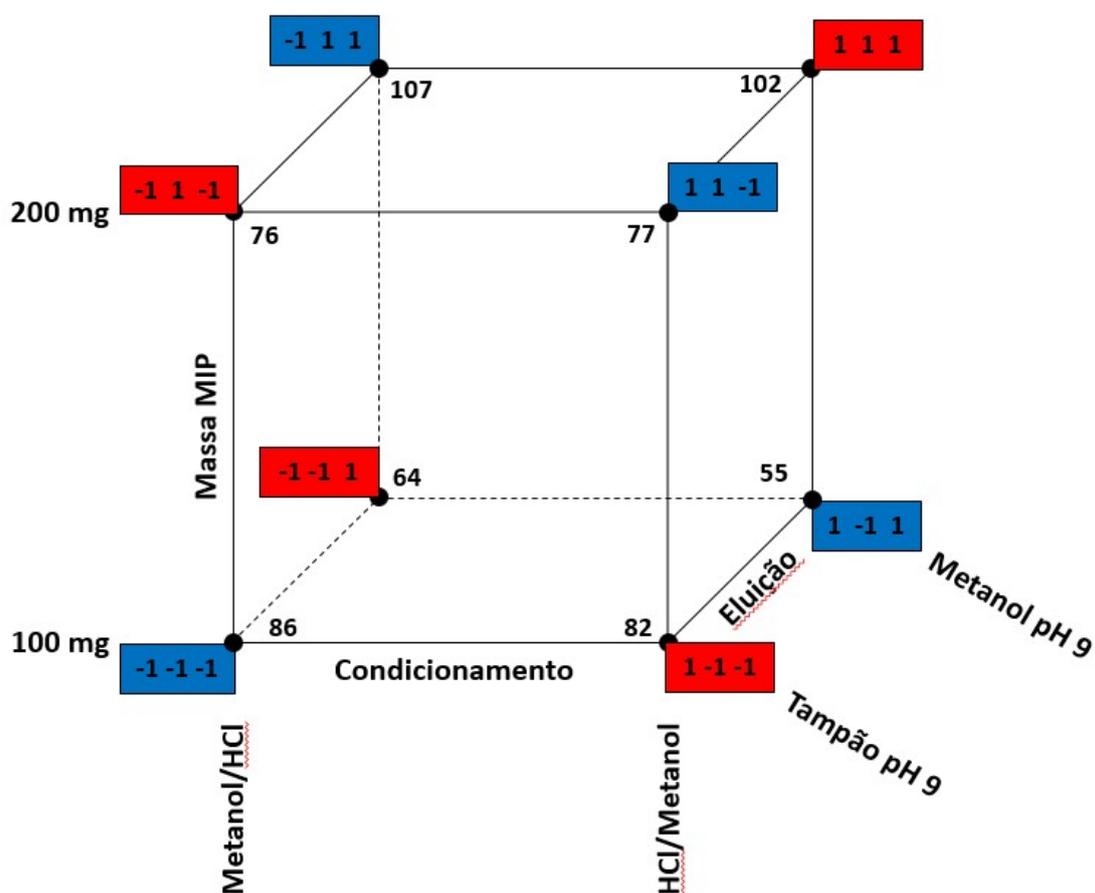


Figura 10. Representação esquemática do planejamento fatorial realizado. Cada vértice representa um experimento realizado e contém o valor de resposta obtido. Os níveis inferiores resultantes da interação estão evidenciados em azul e os superiores, em vermelho.

Primeiramente, foram calculados os parâmetros estatísticos como descrito no item 4.8.1, a variância das observações apresentou valor de 58,0, a

variância dos efeitos, de 9,7, o desvio padrão dos efeitos, de 3,1 e o intervalo de confiança, 6,6.

Em seguida foram feitos os cálculos para cada efeito, primeiramente, determinou-se todos os efeitos presentes no sistema. Visto que o planejamento foi construído com três fatores, estes constituem os efeitos primários 1, 2 e 3. As interações binárias entres esses fatores constituem os efeitos de segunda ordem 12, 13 e 23, e, por fim, a interação ternária de todos os fatores dá origem ao único efeito de terceira ordem: 123. Estes cálculos foram realizados como descrito no item 4.8.1 e os valores obtidos se encontram na Tabela 5 sendo, então, interpretados de acordo com o intervalo de confiança calculado.

Tabela 5. Valores calculados para cada efeito.

Efeitos	
1	-4.599
2	19.174
3	2.083
12	2.046
13	-2.753
23	26.159
123	-0.103

Os efeitos que se mostraram significativos para o sistema para um nível de confiança de 95% foram o efeito primário 2, referente a massa de MIP, e a interação binária 23, referente a combinação do fator de massa do MIP e solvente de eluição. Ambos os efeitos apresentaram valores positivos, demonstrando que as melhores repostas para o sistema foram obtidas utilizando 200 mg de MIP no cartucho e eluindo com Metanol pH 9.

Também foi possível perceber que o fator 1, condicionamento, se mostrou inerte no sistema, visto que tanto ele quanto suas interações binárias e ternária não foram significativos. Mostrando que a ordem dos solventes utilizados nas etapas de equilíbrio e ativação da fase não afetam a recuperação final do sistema (NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

Em vista desses resultados, o procedimento de SPE utilizado para a continuação dos estudos foi o seguinte: 1 mL de metanol seguido de 1 mL de HCl pH 3 para o condicionamento, 9 mL de amostra para carregamento do

cartucho, 2 mL de água destilada para lavagem e 3 mL de metanol pH 9. Optou-se por essa ordem na etapa de condicionamento devido ao fato de que a fase adsorve melhor quando está protonada, visto que a maior parte das interações realizadas são por meio de ligações de hidrogênio com a SAC (DU et al., 2016).

5.3. Estudos de vazão

O tempo em que a fase móvel e a fase estacionária ficam em contato é um fator que afeta fortemente o processo de extração. Isso é devido à cinética e o equilíbrio das interações formadas entre o analito e a fase sólida, ou seja, o tempo que ele leva para migrar da fase líquida para a fase sólida (DOURADO, 2018).

Porém, como mostra a Tabela 6, foi observado que a quantidade de SAC recuperada utilizando a vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ não foi significativamente maior que aquela obtida para uma vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, vazão utilizada nos experimentos do planejamento fatorial. Em vista desses resultados, optou-se por manter a vazão de carregamento da SPE em $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ já que a diminuição da vazão aumentaria o tempo necessário para a realização do método proposto.

Tabela 6. Concentração de SAC obtida para cada vazão estudada.

Vazão (mL min^{-1})	[SAC] (mg L^{-1})
0,5	14,6
0,7	14,2
1,0	13,0

5.4. Estudos de impressão com polímero controle

Estes estudos foram realizados de modo a verificar a seletividade do MIP à SAC em comparação com o seu polímero controle (NIP). Dessa forma, o procedimento de SPE otimizado foi realizado utilizando cartuchos de MIP e de NIP. A quantificação de SAC nos eluatos foi realizada por meio do método cromatográfico e os valores de recuperação foram calculados com base na Equação 2.

Estes valores estão contidos na Tabela 7, assim como o desvio padrão das medidas. O NIP apresentou uma recuperação média, referente à

concentração da solução de carregamento (5 mg L^{-1}), de 23% enquanto o MIP apresentou uma recuperação média de 93%, aproximadamente quatro vezes maior. Isso mostra que o material apresenta sítios de interação seletivos aos grupos funcionais da SAC, dando ênfase a eficácia do processo de impressão do MIP.

Tabela 7. Recuperação (Rec) de SAC após aplicação do método de SPE utilizando cartuchos de MIP e de NIP.

Replicata	MIP				NIP			
	[SAC] (mg L^{-1})	Média (mg L^{-1})	Desvio padrão	Rec (%)	[SAC] (mg L^{-1})	Média (mg L^{-1})	Desvio padrão	Rec (%)
1	4,32	4,65	0,38	93,0	1,01	1,15	0,16	22,9
2	4,56				1,10			
3	5,06				1,32			

5.5. Volume de *breakthrough*

A curva de *breakthrough* (Figura 11) apresentou o perfil esperado e o volume em que a solução percolada apresenta uma quantidade detectável de SAC foi em 60 mL, caracterizando-o como o volume de *breakthrough* da fase. Como a concentração da solução utilizada foi de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, a quantidade de SAC que ficou retida no cartucho foi 0,09 mg, ou seja, a capacidade adsortiva do cartucho foi de $0,45 \text{ mg g}^{-1}$. Este valor foi menor do que o esperado, visto que o Q máximo do material era $4,88 \text{ mg g}^{-1}$ (DOURADO et al., 2018), isso é devido ao pouco tempo de interação analito – fase móvel durante o processo de extração, cerca de alguns segundos, em comparação aos testes cinéticos em que o polímero fica em contato com a solução de SAC por horas. Dessa forma, a partir desse volume, o MIP não conseguirá mais extrair todo o analito presente na amostra (BIELICKA-DASZKIEWICZ; VOELKEL, 2009).

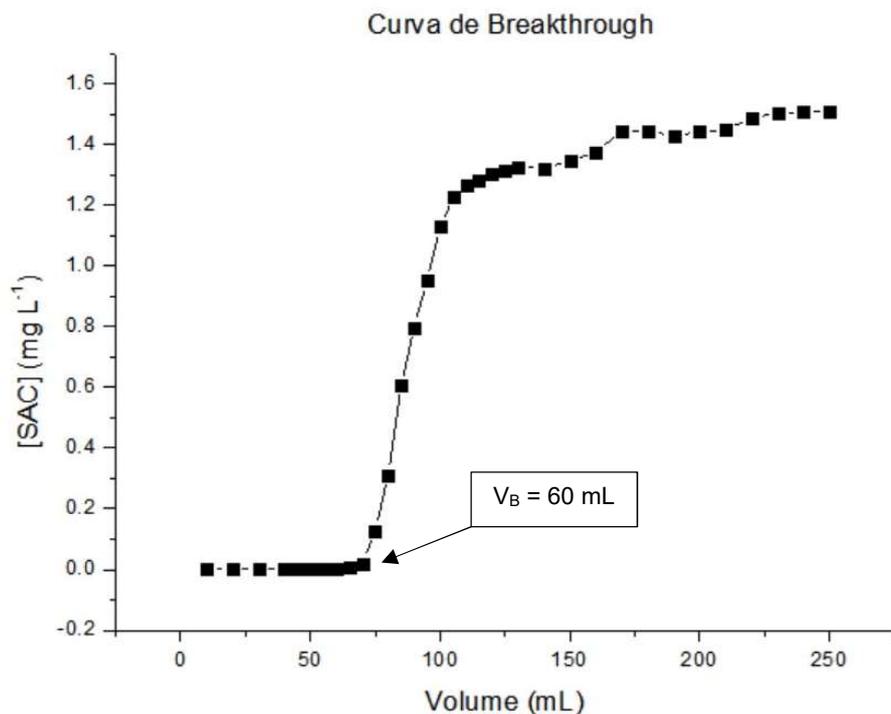


Figura 11. Curva de breakthrough. V_B (volume de breakthrough) indica o volume em que é atingida a capacidade adsorviva máxima do cartucho.

5.6. Estudos preliminares de regeneração

Fases sólidas, após um determinado tempo de utilização, podem perder a sua capacidade adsorvente. Isto se deve as interações entre a fase sólida e os compostos a serem adsorvidos, que não são mais passíveis de serem desfeitas apenas com a eluição. Consequentemente, essas fases não podem ser mais utilizadas para realizar extrações a não ser que sejam regeneradas, ou seja, tenham as suas características adsorventes restauradas, por meio de processos químicos (AMPARO, 2013). Para verificar se o MIP poderia ser recuperado após a sua saturação, foram realizados os ciclos de regeneração explicados no item 4.13.

Os estudos aqui feitos foram apenas preliminares, sendo observado, apenas, a possibilidade de retirar toda a SAC adsorvida no MIP com os ciclos de lavagem. A princípio foram realizados apenas dois ciclos, sendo que as soluções obtidas após as lavagens foram analisadas por meio do método cromatográfico.

Os resultados presentes na Tabela 8 mostram que após esses dois ciclos de regeneração não foi observado mais a presença de SAC na solução de lavagem. Isso mostra que, mesmo após a saturação total do cartucho foi

possível limpá-lo completamente, tornando possível a sua reutilização. Também é possível concluir que os solventes utilizados para esse estudo foram eficientes, o que era esperado visto que foram os mesmos utilizados para a limpeza do material após a sua síntese (DOURADO, 2018).

Tabela 8. Concentração de SAC presente nas soluções coletadas após cada ciclo de regeneração.

Ciclo de regeneração	[SAC] (mg L ⁻¹)
1°	0,197
2°	0,0

5.7. Aplicação de amostras de chá

As análises das amostras de chá pelo método cromatográfico foram realizadas antes e após a aplicação do método de preparo de amostra de modo a determinar se este promoveria uma limpeza da amostra e se seria possível realizar uma preconcentração. As quantificações foram realizadas utilizando a curva de calibração construída pelo método HPLC-UV descrito no item 4.9 (Figura 12).

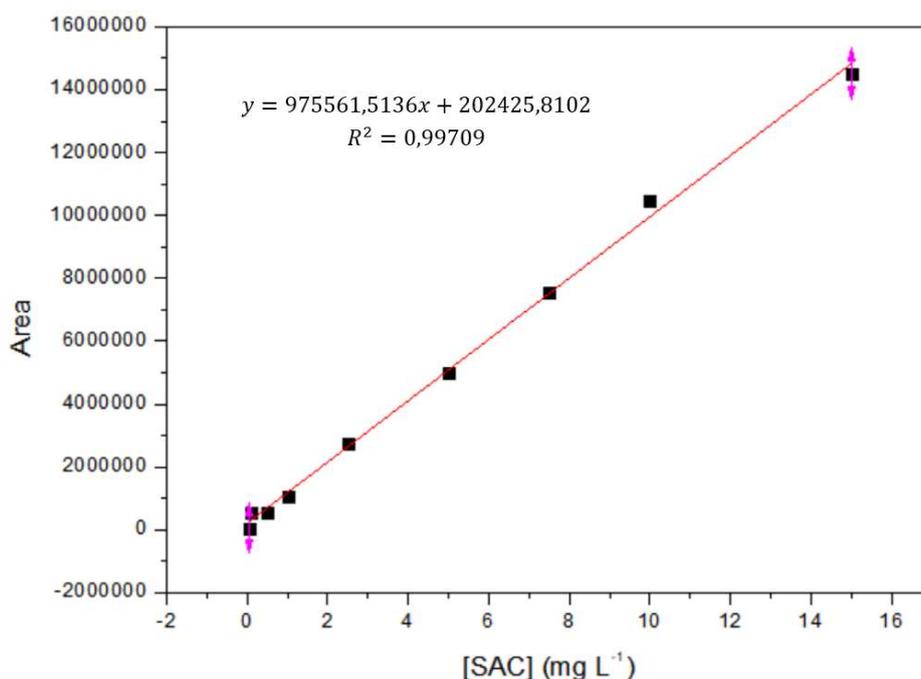


Figura 12. Curva de calibração do método HPLC-UV.

A Tabela 9 mostra os resultados das análises das amostras pelo método cromatográfico sem a aplicação prévia do procedimento de MISPE proposto. O cromatograma na Figura 13 é referente à uma solução contendo padrões de cafeína, SAC, ciclamato e acessulfame.

Tabela 9. Aplicações das amostras no método sem preparo de amostra.

Amostras	[SAC] amostra (mg L ⁻¹)	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média (mg L ⁻¹)	Desvio padrão (mg L ⁻¹)	Erro relativo (%)
Chá verde	5,0	4,743	4,713	4,585	4,680	0,084	6,4
Chá branco		4,552	4,765	4,870	4,729	0,162	5,4
Chá vermelho		4,694	4,827	4,933	4,818	0,120	3,6

É possível observar que o método utilizado apresentou boa exatidão com relação ao rótulo com baixos erros relativos. A precisão do método também foi boa, tendo em vista os valores baixos de desvio padrão entre as replicatas. A Figura 13 mostra uma boa separação dos picos, sendo cada um referente à um composto diferente contido na solução quaternária.

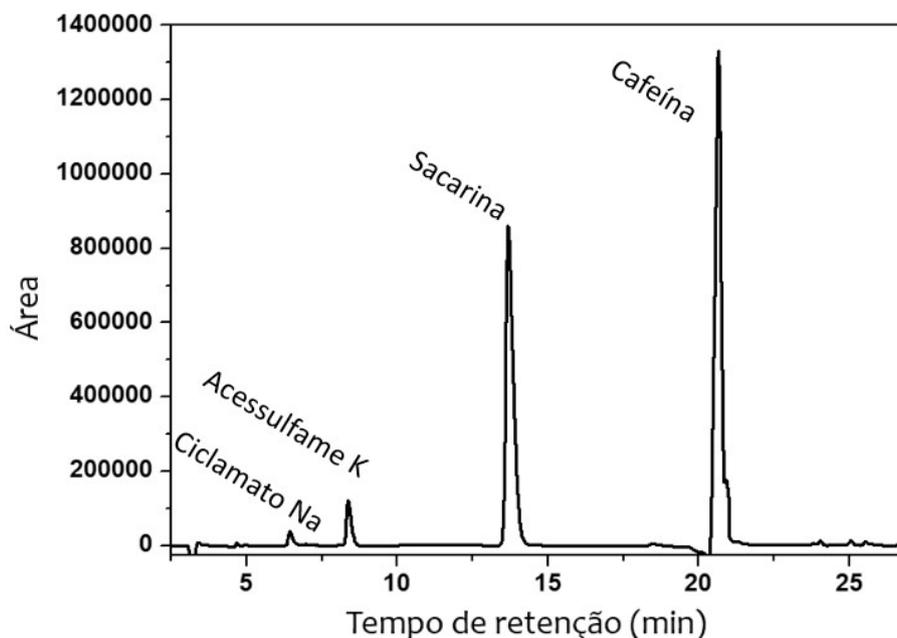


Figura 13. Cromatograma separação dos compostos: ciclamato de sódio, acessulfame de potássio, SAC e cafeína.

Na aplicação do método de SPE desenvolvido por meio do planejamento fatorial, foram percolados 9 mL de amostra durante a etapa de carregamento do cartucho. Após a etapa de eluição, a evaporação e redissolução dos eluatos resultou em um fator de preconcentração de 1,5.

Na Tabela 10 estão contidos os resultados obtidos para as amostras que passaram pelo MISPE, a concentração esperada, baseada nos valores dos rótulos, era de 7,5 mg L⁻¹ em vez de 5,0 devido ao procedimento de preconcentração. As recuperações obtidas foram satisfatórias, apresentando valores superiores a 75% para todas as amostras. E por meio da Figura 14 é possível visualizar que o método promoveu uma limpeza da amostra, sendo capaz de isolar a SAC dos interferentes presentes na amostra.

Tabela 10. Resultados de recuperação após preparo de amostra.

Amostras	Replicata	[SAC] (mg L⁻¹)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
Chá verde	1	5,901	78,68	81,105
	2	6,265	83,53	
Chá branco	1	5,893	78,57	75,91
	2	5,493	73,24	
Chá vermelho	1	5,774	76,99	77,98
	2	5,922	78,96	

Os valores de recuperação obtidos foram menores que aqueles esperados de acordo com os obtidos anteriormente utilizando soluções feitas com padrão de SAC nos estudos anteriores. Isso é devido à presença de compostos que oferecem competição pelos sítios de interação do polímero, principalmente o ciclamato de sódio que apresenta os mesmos grupos receptores de hidrogênio (sulfônico e carbonílico) e doador de hidrogênio (amina terminal). Mas ainda assim o método se mostrou extremamente seletivo a SAC, sendo possível obter ótimas recuperações quando comparado ao método proposto por Zhao et al. 2015, mesmo em uma matriz com altas concentrações de interferentes.

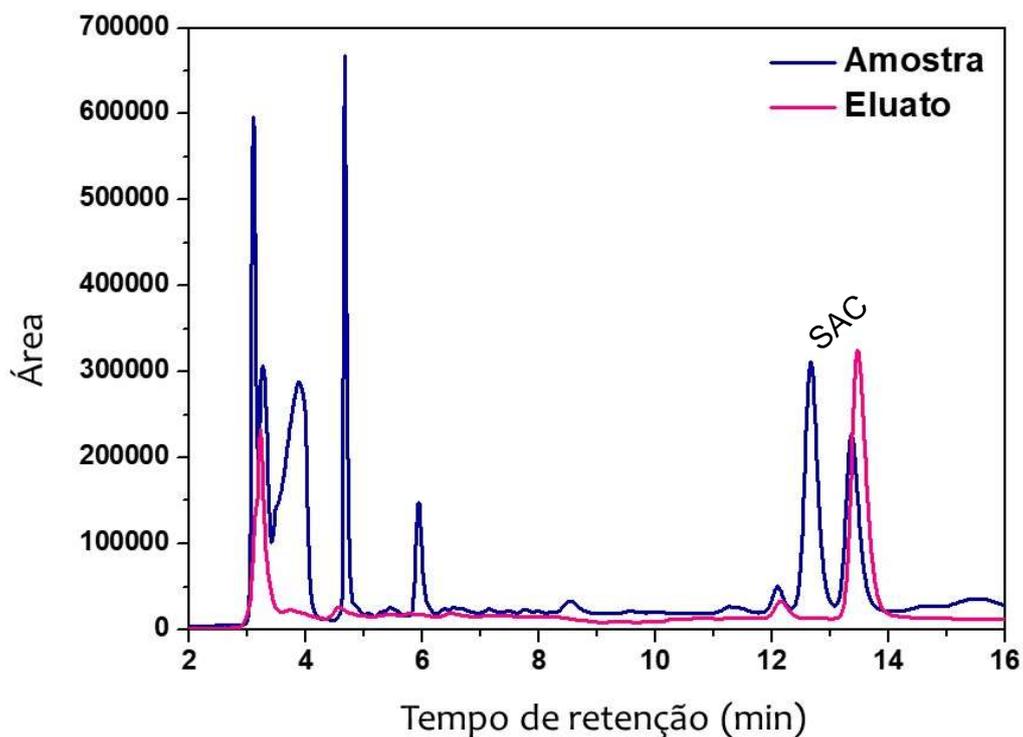


Figura 14. Cromatograma da amostra antes (amostra) e após preparo de amostra com MISPE (eluato)

Esses resultados mostram que o método de preparo de amostra desenvolvido é seletivo, sendo capaz de fazer a limpeza (*clean up*) e promover uma preconcentração da amostra. A possibilidade do método de preconcentrar uma amostra indica a possibilidade de aplicação deste para o preparo de amostras de baixa concentração, como, por exemplo, amostras ambientais.

6. CONCLUSÕES

A otimização multivariada se mostrou uma ferramenta eficaz para a estabelecer as etapas do procedimento da SPE, visto que havia uma correlação entre dois dos fatores estudados, dessa forma, foi possível definir as melhores condições para a extração da SAC nas amostras.

O MIP enquanto fase sólida apresentou uma alta seletividade para SAC, sendo passível de reutilização sem perda de capacidade adsortiva e de possível recuperação após sua saturação completa dos sítios hábeis. Com relação à capacidade adsortiva do MIP utilizado, a capacidade do cartucho foi menor, porém isso ocorreu devido ao menor tempo que o material fica em contato com a solução durante o procedimento da extração.

O método desenvolvido se mostrou eficiente para determinação de sacarina em matriz complexa, tendo em vista os valores altos de recuperação obtidos, quando comparados a procedimentos convencionais de SPE, sendo possível realizar o *clean up* e preconcentrar a amostra. Isso indica a possibilidade de determinação direta da SAC por meio de métodos mais simples como o UV-Vis sem a necessidade de separação por cromatografia.

7. BIBLIOGRAFIA

AMPARO, Maura Roquete. **Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/>>

ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>>

ANVISA, A. N. de V. S. **Consulta pública nº 88, de 25 de setembro de 2007**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 jun. 2019.

BERNARDO, W. et al. Adverse effects of the consumption of artificial sweeteners - systematic review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 2, p. 120–122, 2016.

BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; VOELKEL, A. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 614–621, 2009.

BORGES, K. B.; PEREIRA, A. C.; MANO, V. Introdução ao Preparo de Amostras. In: **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 1–8.

CARVALHO, Lucinéia Cristina de. **Estudos termoanalíticos dos edulcorantes acessulfame-K, aspartame, ciclamato, esteviosídeo e sacarina**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

DOURADO, Camila Santos. **Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises por injeção sequencial Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises**. 2016. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

DOURADO, Camila Santos et al. Avaliação da seletividade de polímeros molecularmente impressos sintetizados para a sacarina em diferentes matrizes. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 19., 2018, Caldas Novas. **Livro de Resumos**. Caldas Novas: Enqa, 2018. p. 610.

DU, J. J. et al. An analysis of the experimental and theoretical charge density distributions of the piroxicam-saccharin co-crystal and its constituents. **RSC Advances**, v. 6, n. 85, p. 81578–81590, 2016.

FIGUEIREDO, Eduardo Costa; DIAS, Ana Cristi Basile; ARRUDA, Marco Aurélio Zezzi. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de**

Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences, Campinas, v. 44, n. 3, p.361-375, 06 jul. 2008.

FILHO, E. R. P. **Planejamento fatorial em química**. 1. ed. São Carlos: EdUfSCar, 2015.

JARDIM, I. C. S. F. Princípios de extração em fase sólida. In: **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 62–78.

KUBO, T.; OTSUKA, K. Recent progress for the selective pharmaceutical analyses using molecularly imprinted adsorbents and their related techniques: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 130, p. 68–80, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.044>>

LOHNER, S.; TOEWS, I.; MEERPOHL, J. J. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, p. 55, 2017.

MAPA, M. da A. P. e A. **Quantificação de Edulcorantes (sacarina, ciclamato, aspartame e acessulfame de K) em Bebidas por CLAE**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Sorbent Extraction. In: **Journal of Chromatography Library #65: Sample Preparation in Chromatography**: Elsevier Science, 2002. p. 341–346.

NETO, B. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como Fazer Experimentos: aplicações na ciência e na indústria**. 4. ed.: Bookman, 2010.

NOVATO, L. et al. Toxicology of Saccharin. **Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals**, Ottawa, v. 80, n. 2, p. 11, 2018.

OLIVEIRA, M. A. L. De et al. Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras. In: **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 19–27.

ORDÓÑEZ, E. Y. et al. Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1256, p. 197–205, 2012.

PAULING, Linus. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies*. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p.2643-2657, out. 1940. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01867a018>.

PUROHIT, V.; MISHRA, S. The truth about artificial sweeteners - Are they good for diabetics? **Indian Heart Journal**, [s. l.], v. 70, p. 197–199, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.01.020>>.

SANTOS, M. G.; FIGUEIREDO, E. C. Preparo de amostras empregando polímeros de impressão molecular. In: **Preparo de Amostras para Análise de**

Compostos Orgânicos2. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 88–95.

SPIVAK, D. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1779–1794, 2005.

SPOELSTRA, J.; SCHIFF, S. L.; BROWN, S. J. Artificial sweeteners in a large Canadian river reflect human consumption in the watershed. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

SWITHERS, S. E. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 9, p. 431–441, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.005>>.

SZATKOWSKA, P. et al. Molecularly imprinted polymers ' applications : A short review. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 10, p. 400–408, 2013.

TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32–40, 2007.

ZHAO, S. et al. Water-compatible surface imprinting of “Saccharin sodium” on silica surface for selective recognition and detection in aqueous solution. **Talanta**, v. 144, p. 717–725, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.086>>