



UnB

Instituto de Química

**APLICAÇÃO DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO
EM AMOSTRADOR PASSIVO PARA DETERMINAÇÃO DE
CAFEÍNA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS**

Juliana Fernandes de Sousa

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Orientadora: Prof. Dr^a Ana Cristi Basile Dias

Co-Orientadora: Fabiana Casarin

Brasília – DF

2º/2019



UnB

Instituto de Química

Juliana Fernandes de Sousa

**APLICAÇÃO DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO
EM AMOSTRADOR PASSIVO PARA DETERMINAÇÃO DE
CAFEÍNA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS**

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial de obtenção do título de bacharel em Química.

**APLICAÇÃO DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO EM
AMOSTRADOR PASSIVO PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS**

Juliana Fernandes de Sousa

Professora orientadora: Dr.^a Ana Cristi Basile Dias

Co-orientadora: Fabiana Casarin

Professora: Dr.^a Andressa R. Vasques Mendonça

Professora: Dr.^a Lilian Rodrigues Braga

Brasília, dezembro de 2019

“You have no idea how high I can fly.” — The Office.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sustento e por escutar minhas orações onde eu pedia tudo que tenho agora.

Aos meus pais pelo afago através de palavras de ânimo e brincadeiras e por todos os pequenos gestos de cuidado no dia a dia.

À minha irmã Amandinha pelo carinho, pelos abraços, conselhos de menina e franqueza nos momentos delicados.

Agradeço às minhas orientadoras, Fabi e Prof. Ana por todos os ensinamentos ao longo de quase dois anos, pela paciência e pelas correções, que são necessárias. Obrigada por terem depositado sua confiança em mim, vocês são meu espelho!

Obrigada aos amigos que fizeram tanta diferença pela sua companhia carinhosa, em alguns dias um simples abraço apertado foi suficiente para provar o quão a presença de vocês é valiosa. Às amigas da bancada acrescento a gratidão pela ajuda através de vidrarias gentilmente lavadas, parceria em experimentos e companheirismo na rotina de pesquisa.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar a cafeína, um indicador antrópico proveniente da contaminação humana em águas naturais, utilizando-se um amostrador passivo DGT. Para a composição da membrana ligante e seletiva nesse dispositivo foi utilizado o Polímero Molecularmente Impresso híbrido (HMIP) para cafeína. Estudou-se a sorção de cafeína na membrana ligante (GL-HMIP) empregando-se duas proporções diferentes de HMIP: 5% e 10% (m/v) em 1,5% de gel de agarose, no qual a GL-HMIP com 10% (m/v) de HMIP sorveu mais cafeína. No processo de sorção também se avaliou de maneira multivariada a influência da força iônica de concentrações 0,01 e 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ e o pH de 3 e 7 aplicando-se planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central, que resultou numa melhor retenção de cafeína em força iônica 0,01 mol L⁻¹ e pH 7. O procedimento de dessorção foi otimizado, obtendo-se as seguintes condições ideais: dessorção sequencial em triplicata, 3,0 mL de solvente (Metanol/Acetonitrila 3:1 (v/v), pH neutro e imersão de 20 minutos. Nessas condições foi possível obter uma maior pré-concentração de cafeína sem que haja necessidade de acidificação ou alcalinização do meio reacional. Além disso este DGT de cafeína apresentou um fator de eluição de 79%, indicando a eficiência de sorção e dessorção do analito. O método de *spike* foi utilizado para validação mergulhando os dispositivos DGT em 70 L de água tratada (onde havia 12 ng L⁻¹ de CAF), o que permitiu concluir que a GL-HMIP no DGT não sofre efeitos significativos da matriz, uma vez que conseguiu reter 81% da massa de cafeína adicionada.

ABSTRACT

The aim of this work was to quantify caffeine, an antropogenic indicator, derived from human contamination in natural waters, using a passive DGT sampler. To compose the binding and selective layer in this device the Molecularly Printed Hybrid Polymer (HMIP) for caffeine was used. The sorption of caffeine on the binding gel (GL-HMIP) was studied using two different proportions of HMIP: 5% and 10% (m/v) in 1,5% agarose gel, in which GL-HMIP with 10% (m/v) HMIP sorbed more caffeine. In the sorption process, the influence of the ionic strength with 0.01 and 0.1 mol L⁻¹ NaNO₃ solutions and the pH of 3 and 7 was also evaluated in a multivariate analysis, applying factorial design 2² performed in triplicate at the central point. The better caffeine retention was in pH 7 at 0.01 mol L⁻¹ of ionic strength. The desorption procedure was optimized, obtaining the following ideal conditions: sequential triplicate desorption, 3.0 mL solvent (3: 1 (v / v) Methanol / Acetonitrile), neutral pH and 20 min immersion. Under these conditions, it was possible to obtain a higher caffeine preconcentration without the need for acidification or alkalization of the reaction medium. In addition, this caffeine DGT presented an elution factor of 79%, indicating the sorption and desorption efficiency of the analyte. The spike method was used for validation by immersing the DGT devices in 70 L of treated water treated water (where there was a 12 ng L⁻¹ concentration of CAF), which led to the conclusion that GL-HMIP in the DGT does not suffer significant matrix effects as it was able to retain 81% of caffeine mass added.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
1. Revisão Bibliográfica	13
1.1 Cafeína.....	13
1.2 A cafeína em águas naturais.....	13
1.3 Determinação de cafeína em matrizes ambientais	14
1.4 Polímeros Molecularmente Impressos	15
1.5 Difusão em filmes finos por gradiente de concentração	18
2. Objetivos.....	22
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1 Materiais	23
3.2 Métodos.....	24
3.2.1 Preparação da membrana difusiva de agarose	24
3.2.2 Preparação de membrana de ligação GL-HMIP	24
3.2.3 Estudo da capacidade de sorção GL-HMIP.....	25
3.2.4 Planejamento fatorial para investigação de fatores que influenciam na sorção da cafeína na membrana de ligação.....	26
3.2.5 Estudos de dessorção das substâncias sorvidas no GL-HMIP	27
3.2.6 Determinação do Fator de Eluição	27
3.2.7 Determinação do Coeficiente de Difusão	27
3.2.8 Aplicação do DGT.....	28
4. Resultados e Discussão.....	28
4.1 Estudo da capacidade de sorção GL-HMIP.....	28
4.2 Planejamento fatorial para investigação de fatores que influenciam na sorção da cafeína na membrana de ligação.....	30
4.3 Estudos de dessorção da cafeína sorvida em GL-HMIP	31
4.4 Determinação do Fator de Eluição.....	35
4.5 Determinação do Coeficiente de Difusão	35
4.6 Aplicação do DGT.....	36
5. Conclusão.....	37
6. Perspectivas Futuras	37

7. Referências Bibliográficas..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ALC	Agente de Ligação Cruzada
CAF	Cafeína
CAESB	Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal
DBL	do inglês <i>Diffusive Boundary Layer</i> (Camada de Difusão Limite)
DF	Distrito Federal
DGT	do inglês <i>Diffusive Gradient in Thin Film</i> (Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração)
HPLC	do inglês <i>High-performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IR	Iniciador Radicalar
MIP	do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymer</i> (Polímero Molecularmente impresso)
MF	Monômero funcional
MM	Molécula molde
NIP	do inglês <i>Non-Imprinted Polymer</i> (Polímero Molecularmente não impresso)
POCIS	do inglês <i>Polar Organic Chemical Integrative Sampler</i> (Amostrador Integrativo de Compostos Orgânicos Polares)
SPE	do inglês <i>Solid-phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fatores e níveis estudados durante o planejamento experimental .	26
Tabela 2 Matriz do planejamento fatorial 2 ² em sua forma codificada	26
Tabela 3 Porcentagem de CAF sorvida pelas GL-HMIP 5% e 10% (m/v) de HMIP	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da cafeína	13
Figura 2: Esquema representativo da síntese dos MIP (adaptado de (HUANG et al., 2014)	16
Figura 3: Ilustração do DGT: a) filtro de proteção; b) membrana difusiva; c) membrana de ligação.	20
Figura 4 GL-HMIP entre as placas de vidro; discos ligantes destacados.	25
Figura 5 Gráfico de sorção de cafeína em membranas de 5% e 10%	29
Figura 6 Gráfico de Pareto dos fatores estudados	31
Figura 7 Massa dessorvida em função do solvente.....	32
Figura 8 Massa dessorvida de cafeína para diferentes pH's	33
Figura 9 Massa de cafeína dessorvida empregando-se diferentes volumes de solvente	33
Figura 10 Massas sorvidas de acordo com o número de eluições	34
Figura 11 Massas de cafeína dessorvidas empregando-se diferentes tempos de eluição	35
Figura 12 Massa de Cafeína em GL-HMIP por Tempo de Contato	36

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Cafeína

A cafeína é a droga psicoativa mais consumida no mundo, esta molécula (Figura 1) é um estimulante que está presente em refrigerantes de cola, bebidas energéticas e, de maneira significativa, em chás e no café (ŠVORC et al., 2012). O consumo moderado de cafeína traz alguns benefícios como melhora na atenção, diminuição da fadiga, além de potencializar a ação de alguns fármacos. (ARNAUD, 2011; MITCHELL et al., 2014)

Cerca de 0,5% a 10% da cafeína consumida por um indivíduo é excretada na urina (FROEHNER et al., 2010). Desta forma, a presença de cafeína em águas superficiais pode indicar contaminação antrópica por aporte ilegal de esgoto, caso predominante no Brasil (IBGE, 2010), bem como seu tratamento ineficaz, visto que esta pode chegar em águas naturais à jusante de efluentes de estações de tratamento.

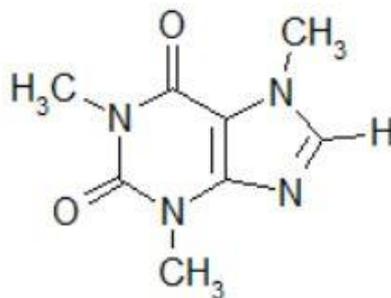


Figura 1: Estrutura molecular da cafeína

1.2 A cafeína em águas naturais

No Brasil, já foram encontradas concentrações da cafeína na faixa de 160 ng L⁻¹ a 47.500 ng L⁻¹ em fontes naturais de água (GONÇALVES, 2008) e de 47 ng L⁻¹ a 5.845 ng L⁻¹ em água para consumo. Além disso, reportou-se cafeína em água tratada no Canadá (DANESHVAR, 2012), em fontes d'água de diversos países da União Europeia (LOOS et al., 2010) e nos EUA onde a concentração máxima de CAF em água tratada chega a 7110 ng L⁻¹ (DEO, 2014), dados que trazem preocupação a respeito da qualidade da água consumida.

Não há amparo da legislação para monitoramento da cafeína em águas naturais e de consumo, e também não há estudos sobre efeitos adversos no ecossistema exposto continuamente a esse composto, o que caracteriza a cafeína como contaminante emergente (CE). Os CE tem sido encontrados em baixas concentrações em águas superficiais, sendo já reportado sua presença em águas subterrâneas, o que justifica mais ainda a necessidade de seu monitoramento (LAPWORTH et al., 2012; TEIJON et al., 2010).

Em estudos já reportados na literatura, comparou-se a concentração de cafeína com indicadores de qualidade da água e comprovou-se a viabilidade desta como indicador de interferência humana nesses ecossistemas, isto é, um indicador de atividade antrópica (YANG et al., 2013).

Indicadores de atividade antrópica devem apontar seguramente a contaminação humana e seu consumo constante, tais como, fármacos, hormônios, metabólitos endógenos de origem humana, surfactantes, entre outros. Um tipo de marcador comumente avaliado é a bactéria proveniente de coliformes fecais (*Escherichia coli*), porém seu uso vem sendo questionado justamente pela limitada especificidade (pode ser proveniente de outros animais ou possuir origem natural) (SANKARARAMAKRISHNAN; GUO, 2005). A cafeína é um bom indicador de atividade antrópica já que possui alta solubilidade em água, baixa volatilidade e um alto padrão de consumo e, portanto, direta correlação da sua concentração com atividade humana da região de estudo. Também já foi comprovada sua eficiência como marcador de atividade estrogênica, o que demonstra a versatilidade desse indicador químico (MONTAGNER et al., 2014). Devido às baixas concentrações da cafeína em amostras ambientais, se faz necessário o uso de técnicas de preparo de amostra passíveis de pré-concentração aliada a seletividades a fim de viabilizar sua análise em laboratório.

1.3 Determinação de cafeína em matrizes ambientais

Para realizar análises em amostras de matriz complexa como é o caso das ambientais, a etapa de preparo de amostra é a que comumente consome maior tempo já que é determinante na validade dos resultados obtidos. Comumente é necessário a dissolução/digestão da amostra, eliminação de interferentes, extração do analito e no caso de baixas concentrações, a pré-

concentração para utilização de métodos de análise de baixo limite de detecção (BRUZZONITI; SARZANINI; MENTASTI, 2000). Todo esse processo pode gerar vários erros, tanto aleatórios quanto sistemáticos, como a contaminação da amostra e perda do analito (DE LIZ; NAGATA; PERALTA-ZAMORA, 2012).

Uma boa técnica para a extração e pré concentração de analitos de interesse ambiental é a extração em fase sólida, que se fundamenta na interação do analito com uma fase sólida estacionária, de maneira análoga aos métodos cromatográficos. Uma extração bem-sucedida promove a separação da maior quantidade de analito possível, sem co-eluição dos interferentes (MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, 2003). Um tipo de fase sólida empregado são os MIP (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*), que são preferíveis a outras fases sólidas comerciais pelas suas vantagens como alta seletividade ao analito com diminuição das interações não específicas com a matriz, menor consumo de solvente orgânico comparado a SPE convencional e possibilidade de reutilização (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2017; ROLDÃO et al., 2017).

1.4 Polímeros Molecularmente Impressos

As interações de sistemas biológicos por exemplo, do tipo antígeno-receptor, enzima-substrato, são estabelecidas através do reconhecimento específico molecular, daí o grande interesse em mimetizar essa interação em laboratório para extrações.

Em 1931, o grupo de Polyakov encontrou evidências de memória em géis de sílica com relação a algumas moléculas orgânicas específicas (WHITCOMBE; KIRSCH; NICHOLLS, 2014). Anos depois, em 1949, foi publicado por Dickey um estudo pioneiro baseado na teoria de Pauling responsável pelo mecanismo de ligação anticorpo-antígeno, em que o antígeno se comporta como uma molécula molde (DICKEY, 1949). Esse foi o início das pesquisas de desenvolvimento de MIP, que se estabeleceram como materiais importantes pela sua versatilidade em aplicações através do reconhecimento específico molecular, o que é comprovado pelo aumento exponencial de trabalhos a partir da década de 1990 (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; WHITCOMBE; KIRSCH; NICHOLLS, 2014).

MIPs são estruturas poliméricas tridimensionais que possuem sítios de ligação específicos para um analito de interesse (molécula molde, MM) que é adicionada durante a síntese e após a polimerização é removida, resultando em um molde ou a impressão da estrutura molecular da MM.

A síntese de MIP inicia-se com a complexação de um monômero funcional (MF) com a MM, e posteriormente a adição de um agente de ligação cruzada (ALC) para promover a polimerização. Após a formação do polímero, a molécula molde é extraída da matriz polimérica, resultando então em cavidades com grupos funcionais para se ligar de novo especificamente à molécula molde (Figura 2). A seletividade do MIP é comprovada através da comparação com um polímero controle, o NIP (do inglês *Non-Imprinted Polymer*), que é sintetizado de forma semelhante ao MIP, sem a adição da molécula molde.

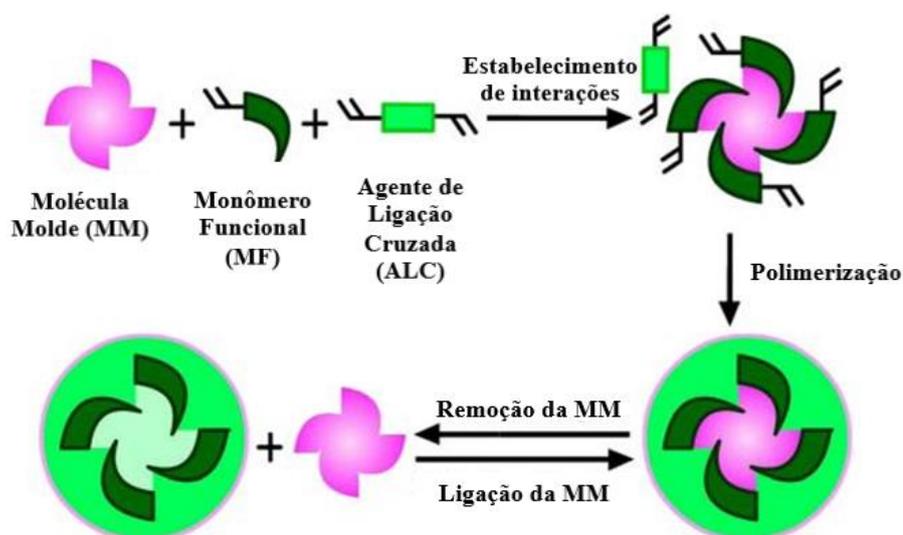


Figura 2: Esquema representativo da síntese dos MIP (adaptado de (HUANG et al., 2014))

A MM, considerada o analito de interesse, deve ser uma molécula capaz de complexar com o monômero funcional (MF) de forma que as interações estabelecidas sejam fracas a fim de permitir a extração da MM na etapa de lavagem. Além disso, o analito não deve possuir em sua estrutura grupos polimerizáveis que possam vir a interferir na formação do MIP e de suas cavidades e, tampouco grupos que interfiram na cinética de polimerização, para que a reação aconteça de maneira mais controlada possível. Esta

molécula deve ser resistente a temperaturas acima de 60°C e permanecer estável durante a síntese (CORMACK; ELORZA, 2004).

O MF deve possuir em sua estrutura grupos polimerizáveis e funções que estabeleçam ligações com a MM. É importante que este esteja em maior quantidade em relação a MM, para garantir uma completa complexação.

O ALC irá ligar todos os monômeros funcionais entre si para a formação da matriz polimérica e conseqüentemente, estabelecer a estrutura dos sítios de interação tridimensionais. Esse reagente é determinante na rigidez necessária à estrutura e devido a isso, sua quantidade deve ser maior que o do MF a fim de garantir a formação adequada das cavidades após a extração da MM (CORMACK; ELORZA, 2004). Além de todos esses componentes, há o solvente que tem um importante papel na síntese, pois é responsável não só por dissolver os reagentes, mas também por ajudar a estabelecer as interações que levarão à complexação MM-MF e contribuir com a formação de poros. Por isso, um aspecto importante do solvente a ser estudado é a sua polaridade, que pode aumentar ou diminuir a estabilidade de ligação entre MM e MF (VASAPOLLO et al., 2011).

Há diferentes métodos de síntese de MIPs, baseadas principalmente em processos radiculares (suspensão, precipitação e em bulk) ou de condensação (sol-gel). Para este trabalho, o MIP híbrido de cafeína foi sintetizado por um processo radicalar a partir da polimerização por suspensão. O processo radicalar envolve três etapas: a iniciação, a propagação e a terminação. A iniciação acontece quando é fornecida energia (na forma de radiação UV ou calor) a fim de provocar a quebra homolítica de ligação no iniciador radicalar (IR) para formação de radicais livres. Os radicais formados reagem com as moléculas do ALC e do MF durante a etapa de propagação, formando os radicais livres do ALC e MF que reagem entre si construindo a estrutura polimérica. A terminação se dá quando o polímero está completamente formado, com a combinação de todos os radicais livres formados. É importante salientar que antes de dar início a síntese, o meio reacional deve estar livre de oxigênio, uma vez que, a presença deste contribui para a formação excessiva de radicais livres que podem perturbar o processo desejado; assim deve ser realizada uma purga de nitrogênio ou argônio a fim de expulsar o oxigênio (CORMACK; ELORZA, 2004).

Na polimerização por suspensão, as partículas do MIP se formam dentro de micelas estabilizadas por um tensoativo. Primeiramente, a MM e os reagentes de síntese são dissolvidos em um solvente orgânico e apolar, então é adicionado um solvente imiscível (geralmente água) para a formação da emulsão contendo o agente tensoativo que estabiliza as micelas e evita sua coagulação. Esse método de síntese produz microesferas de tamanho homogêneo, entretanto, a desvantagem está no uso da água como solvente tensoativo porque pode ocorrer a competição da interação MM-MF com a água, principalmente se a formação dos sítios seletivos se dá por ligações de hidrogênio. Ainda, pode haver diminuição da estabilidade da ligação quando algum dos reagentes é altamente solúvel em água (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005), por isso a complexação por interações iônicas ou hidrofóbicas é preferível.

Um polímero do tipo híbrido possui rede polimérica de natureza orgânica e inorgânica, estratégia que combina as vantagens da flexibilidade da polimerização orgânica e a estabilidade química e térmica da inorgânica originando um material com propriedades mecânicas excelentes (LIN et al., 2003; SILVA, 2009).

Os MIPs se apresentam como uma alternativa promissora como fase sólida integrando membrana de ligação em dispositivos de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) (DONG et al., 2014), dispositivos utilizados a fim de simplificar o processo de preparo da amostra, a amostragem.

1.5 Difusão em filmes finos por gradiente de concentração

A amostragem de amostras de águas naturais comumente empregada envolve a coleta de alíquotas em pontos pré-determinados em frascos e seu transporte para o laboratório. Esse procedimento pode gerar uma fonte de erros em potencial, que podem surgir pela perturbação da matriz pelo transporte realizado e/ou extração química, além de contaminação e perda das amostras. A fim de eliminar essas falhas uma alternativa interessante são as medidas realizadas *in situ*, com a utilização de amostradores passivos (POULIER et al., 2015).

Dentre os amostradores *in situ*, a amostragem passiva de substâncias químicas orgânicas polares é realizada geralmente pelo uso de POCIS (do inglês *Polar Organic Chemical Integrative Sampler*). Esta técnica é bem estabelecida, porém exige a calibração do dispositivo, e ainda, fornece resultados altamente dependentes das condições hidrodinâmicas do corpo d'água, que pode provocar variações no transporte de massa do analito (HARMAN; ALLAN; VERMEIRSEN, 2012). Nesse cenário, na busca por alternativas mais simples e robustas, têm-se o DGT.

O DGT (do inglês *Diffusive Gradients in Thin Films*) é um amostrador passivo muito utilizado para determinação de metais e moléculas inorgânicas. Recentemente, vem sendo aplicado em procedimentos de preparo de amostras para extração de contaminantes orgânicos (CHEN; ZHANG; JONES, 2012; ZOU et al., 2018). É um método robusto, simples e barato que diferente de POCIS, não exige calibração e é independente da hidrodinâmica da água. O DGT é fundamentado na Lei de Fick, em que, estabelecendo-se um gradiente de concentração, o fluxo das partículas de analito é direcionado da região de maior concentração para a região de menor concentração, a fim de ser alcançado o equilíbrio no sistema (DAVISON, W.;ZHANG, 1994).

O DGT é um dispositivo composto por um pistão de apoio que contém uma membrana difusiva (agarose, poliacrilamida) e uma membrana ligante, onde o analito de interesse é adsorvido. As duas camadas são cobertas por um filtro de proteção e por um anel de diâmetro de 20 mm com uma abertura no centro (Figura 3). O analito permeia o filtro de proteção e é difundido em direção à membrana ligante, onde estabelecerá ligações com o material e será acumulado.

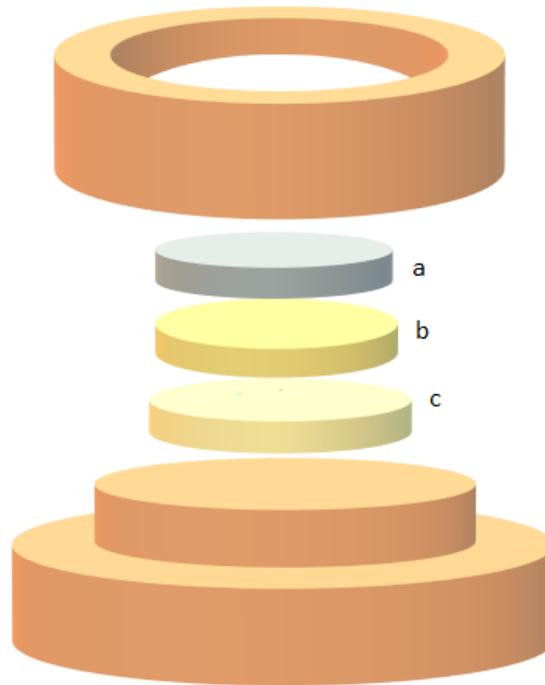


Figura 3: Ilustração do DGT: a) filtro de proteção; b) membrana difusiva; c) membrana de ligação.

A concentração do analito pode ser calculada usando-se a Equação 1 de fluxo das partículas dada por:

$$F = \frac{D(C_b - C')}{(\Delta g + \delta)} \quad \text{Equação 1}$$

Em que D é o coeficiente de difusão do analito na membrana difusa, C_b é a concentração do analito em solução, C' representa a concentração do analito livre nas fronteiras do material ligante, Δg a espessura da membrana de difusão e δ a espessura da camada limite (DBL, do inglês *Diffusive Boundary Layer*) isto é, fronteira entre o dispositivo e a solução. Assumindo que, a ligação entre o analito e o material extrator ocorre rapidamente, que estabelece interações fortes e que o ligante não sofre saturação, o termo C' é muito pequeno e pode ser desprezado. O fluxo (Equação 2) pode ser definido ainda como a quantidade de massa transportada por unidade de tempo em uma área específica, assim,

$$F = \frac{M}{At} \quad \text{Equação 2}$$

Com M= massa do analito, A = área da abertura do DGT e t o tempo de contato. Combinando as Equações 1 e 2, obtém-se o valor da concentração C_b na matriz (ZHANG et al., 1995):

$$C_b = \frac{M(\Delta g + \delta)}{DA t} \quad \text{Equação 3}$$

A espessura δ varia de acordo com as condições hidrodinâmicas da água, portanto para obter resultados independentes desta, a espessura Δg deve ser muito maior que a DBL (DAVISON, W.;ZHANG, 1994). Assim, é preservada a reprodutibilidade do método e como $\Delta g \gg \delta$, a concentração na matriz pode ser definida (Equação 4) como:

$$C_b = \frac{M\Delta g}{DA t} \quad \text{Equação 4}$$

O coeficiente de difusão é calculado através de uma curva de tempo de contato versus massa recuperada, de forma que D está contido no coeficiente angular da reta k (Equação 5) (CHALLIS; HANSON; WONG, 2016):

$$D = \frac{k\Delta g}{C_b A} \quad \text{Equação 5}$$

A massa M do analito difundida através da membrana é então estimada por (Equação 6):

$$M = \frac{C_e(V_e + V_g)}{f_e} \quad \text{Equação 6}$$

Em que C_e é a concentração do analito retida na membrana de ligação após a dessorção, V_e o volume do eluente, V_g o volume da membrana de ligação e f_e o fator de eluição, constante medida através da razão entre massa eluída e massa retida da espécie de interesse (Equação 7):

$$f_e = \frac{V_e \cdot C_e}{(C_i - C_f) V_{imers\tilde{a}o}} \quad \text{Equa\~{c}\~{a}o 7}$$

Em que C_i é a concentração inicial conhecida do analito e C_f é a concentração do sorvido no sobrenadante de sorção.

Conhecidos o fator de eluição e o coeficiente de difusão é definida a concentração de analito na matriz da amostra. Pressupõe-se que aliar as vantagens do DGT com a natureza seletiva dos MIP resulte numa técnica promissora de análise de cafeína no ambiente (CASARIN, 2018), com resultados de alta exatidão e reprodutibilidade.

2. Objetivos

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo geral utilizar o dispositivo DGT para quantificar cafeína em amostras ambientais, tendo como membrana ligante o MIP para a cafeína preparado por método de suspensão imobilizado em agarose e como membrana difusa, a membrana de agarose. Os objetivos específicos pretendidos são:

- Investigar a capacidade de sorver cafeína em membranas ligantes com diferentes massas de HMIP e sob diferentes condições de pH e força iônica;
- Otimizar a dessorção da cafeína retida na membrana ligante GL-HMIP examinando o solvente, tempo de contato e pH;
- Obter o fator de eluição e o coeficiente de difusão para análise de amostras reais;
- Quantificar cafeína em água para consumo.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

- Balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001 g
 - Banho ultrassom Unique, modelo 1400
 - Homogeneizador Hematológico modelo SP 260H SP, Labor
 - Agitador magnético com aquecimento Go-Stirrer MS-H-S
 - Centrífuga, de bancada KC5, Kinddly, velocidade máxima 4.000 rpm
 - Concentrador, TE-019 Tecnal
 - HPLC - Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão, modelo LC-20AD; Detector Flexar PDA, válvula de injeção (alça de amostragem de 20 μ L); Software Chromera, verison 3.4.0.5712, PerkinElmer.
 - Coluna cromatográfica Bownlee Analytical C18 diâmetro médio de 5 μ m, 250 x 4,6 mm, PerkinElmer
 - Sistema de deionização de água Milli-Q
 - Agitador de Frascos com Movimento Orbital EthikTechnology
 - Capela de Fluxo Unidirecional Laminar vertical, Veco.
 - Espectrofotômetro UV-Vis, Agilent, modelo 8454.
 - Holder para filtração
 - Membrana de filtração, 0,22 μ m Sigma-Aldrich.
- Reagentes utilizados:
- MIP híbrido para cafeína (HMIP) previamente sintetizado pelo grupo AQQUA pelo método de suspensão (.)
 - Agarose, GibcoBRL.
 - A água deionizada ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) produzida utilizando um sistema de purificação Milli-Q.
 - Cafeína Sigma-Aldrich grau PA.
 - NaNO_3 , Cromoline.
 - Metanol, grau HPLC.
 - Acetonitrila, grau HPLC.
 - Ácido clorídrico, Biograde.
 - Hidróxido de sódio Sigma-Aldrich grau PA.

3.2 Métodos

Foram realizados estudos preliminares para avaliar a capacidade adsorptiva da membrana ligante composta de HMIP e os fatores influentes (pH e força iônica) na sorção de cafeína na membrana de ligação. Posteriormente, foram realizados ensaios de dessorção, a fim de aperfeiçoar a extração do analito, onde foram investigados o solvente de dessorção, pH de dessorção, volume do solvente de dessorção, tempo de dessorção e número de eluições. Por fim, determinou-se o fator de eluição e o coeficiente de difusão para viabilizar o estudo de amostras reais.

3.2.1 Preparação da membrana difusiva de agarose

A preparação dos discos de membrana de agarose empregados como gel difusivo para o DGT foram preparados de acordo com (CHEN; ZHANG; JONES, 2012) com adaptações. Para obter o gel de composição 1,5% m/v, foi diluído 0,18 g de agarose em 12 mL de água ultrapura; esta mistura foi levada ao micro-ondas até total dissolução da agarose. A solução de gel dissolvida foi vertida imediatamente, com o auxílio de uma pipeta, para duas placas de vidro pré-aquecidas contendo um espaçador de 0,8 mm, e deixada na capela de fluxo laminar até atingir a sua temperatura de gelificação (36 °C). Após a gelificação, os géis foram seccionados em discos de 2,5 cm, imersos numa solução de nitrato de sódio 0,05 mol L⁻¹ e armazenados na geladeira (4 °C).

3.2.2 Preparação de membrana de ligação GL-HMIP

A fase ligante foi preparada inicialmente em duas proporções da fase sorvente (HMIP): 0,6 g (5% m/v) e 1,2 g (10% m/v) em 1,5% (m/v) de agarose. Para a imobilização do HMIP, o procedimento consistiu primeiramente na preparação da solução da membrana de agarose, conforme descrito no item anterior, e posteriormente foi adicionado à solução 5% (m/v) e 10% (m/v) de HMIP. Esta mistura foi vertida entre as placas de vidro pré-aquecidas contendo espaçadores de 0,5 mm, deixada na capela de fluxo laminar e permaneceu no suporte até atingir a temperatura ambiente, para posteriormente ser seccionada em discos com diâmetro de 2,5 cm (Figura 4).

Estes discos foram imersos em solução de nitrato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e armazenados em refrigerador a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 4 GL-HMIP entre as placas de vidro; discos ligantes destacados.

3.2.3 Estudo da capacidade de sorção GL-HMIP

Os discos de GL-HMIP 5% e 10% foram expostos à várias concentrações de cafeína ($100, 500, 1000$ e $2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para avaliação da sorção. Utilizando frascos âmbar de 15 mL, os discos foram imersos em 10,00 mL de soluções de cafeína em meio aquoso com força iônica de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaNO_3). Os frascos foram deixados em agitação por 24 horas e o experimento foi feito em triplicata.

O procedimento de dessorção foi baseado na proposta de (CHEN et al., 2013) com algumas adaptações. Consistiu na transferência de GL-HMIP para tubos de ensaio de 10 mL, seguido da adição de 3,00 mL de metanol e dessorção por 20 minutos no banho ultrassônico. Esta etapa foi realizada em triplicata, as frações do solvente foram combinadas e evaporadas por aquecimento a 88°C utilizando um concentrador. Foi feita a redissolução das substâncias em 2,00 mL de água ultrapura e posterior filtragem empregando um filtro seringa de polivinilideno com tamanho de poro de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$, por fim, foi feita a análise por HPLC.

3.2.4 Planejamento fatorial para investigação de fatores que influenciam na sorção da cafeína na membrana de ligação

Avaliou-se de maneira multivariada a influência da força iônica e o pH em dois níveis (Tabela 1) no processo de sorção do GL-HMIP com o emprego de planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central (PC). Sete experimentos foram realizados em sequência aleatória (Tabela 2), com duração de 96 horas. Os discos de GL-HMIP foram imersos em 10,00 mL de solução $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cafeína contida em Erlenmeyers de 250 mL mantidos em agitação orbital de 100 rpm. As quantificações das frações adsorvidas da cafeína foram realizadas em HPLC-UV. O ajuste de pH foi realizado utilizando soluções diluídas de HCl e NaOH e a força iônica foi ajustada com solução NaNO_3 .

Tabela 1 Fatores e níveis estudados durante o planejamento experimental

Fatores	Níveis de variação dos fatores	
	-1	1
Força iônica	$0,01\text{mol L}^{-1}$	$0,1\text{mol L}^{-1}$
pH	4	7

Tabela 2 Matriz do planejamento fatorial 2^2 em sua forma codificada

Ensaio	Fatores	
	Força iônica	pH
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

3.2.5 Estudos de dessorção das substâncias sorvidas no GL-HMIP

Após a sorção de acordo com o procedimento do item 3.2.3, os seguintes estudos de dessorção foram realizados, em sequência:

3.2.5.1 Escolha do solvente de dessorção

Os discos foram transferidos para tubos de ensaio de 10 mL e a dessorção foi realizada conforme descrito no item 3.2.3, porém empregando-se diferentes solventes, foram eles: metanol, acetonitrila, acetonitrila/metanol (3:1, v/v), metanol/acetonitrila (3:1 v/v) e metanol/acetonitrila (1:1, v/v).

3.2.5.2 Determinação do pH de dessorção e volume do solvente de dessorção

Foram realizados testes envolvendo o pH de dessorção com valores de pH 3, 5, 7 e 9. Definido o pH de dessorção foi avaliado volume de solvente de dessorção empregado em cada replicata, onde foram utilizados volumes de 2, 3, 4 e 5 mL.

3.2.5.3 Tempo de dessorção e número de eluições no banho ultrassônico dos discos GL-HMIP

A fim de estudar o equilíbrio de dessorção da cafeína retida nos discos de GL-HMIP, empregou-se o banho ultrassônico durante 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Por fim, foram testadas uma a quatro eluições sequenciais utilizando as condições otimizadas anteriormente.

3.2.6 Determinação do Fator de Eluição

O fator de eluição (Equação 7) foi obtido através da submersão de três membranas GL-HMIP em 10,00 mL de solução de cafeína $100 \mu\text{g L}^{-1}$, e posterior leitura em HPLC dos sobrenadantes de sorção e dessorção.

3.2.7 Determinação do Coeficiente de Difusão

Dezoito dispositivos DGT foram submersos em 2 L de uma solução de cafeína $20 \mu\text{g L}^{-1}$. A fim de determinar o coeficiente de difusão aparente de acordo com a Equação 5, foi obtida uma curva de tempo de contato dos

dispositivos versus massa recuperada de cafeína com os seguintes pontos em triplicata: 1 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h.

3.2.8 Aplicação do DGT

Foi realizado o estudo de determinação da cafeína em água para consumo utilizando como amostra a água tratada pela Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CAESB) coletada no Instituto de Química da UnB. Dez amostradores DGTs foram mergulhados em um tanque contendo 70 L de água, que foi mantida sob agitação constante por 21 dias. Ao final do período, os DGTs foram retirados e foi realizada a dessorção das membranas ligantes de acordo com os resultados de 3.2.5. Posteriormente, para investigar efeitos de matriz foi realizado um *spike* da amostra, que consistiu em adicionar 1 µg L⁻¹ de CAF, mergulhar dez novos amostradores DGTs e seguir o mesmo procedimento descrito anteriormente.

4. Resultados e Discussão

4.1 Estudo da capacidade de sorção GL-HMIP

A capacidade de sorção da membrana ligante GL-HMIP foi avaliada pela equação 8:

$$m_{CAF} = \frac{(C_i - C_f) \times V}{m} \quad \text{Equação 8}$$

Em que o: m_{CAF} (µg) é a massa de cafeína sorvida pela GL-HMIP, enquanto o C_i (µg L⁻¹) é a concentração inicial da solução de cafeína, o C_f (µg L⁻¹), indica a concentração de cafeína livre no sobrenadante, o V (L) relaciona-se ao volume da solução do analito e o m (g) corresponde a massa do HMIP presente na GL-HMIP.

Os resultados obtidos demonstraram que a sorção de cafeína na membrana ligante aumentou de acordo com a concentração de cafeína em solução (Figura 5), então pressupõe-se que não houve saturação do GL-HMIP. Posto isto, a saturação não seria um fator limitante para a determinação de cafeína em matrizes aquosas ambientais mesmo com

imersão prolongada da membrana ligante na matriz de interesse devido às baixas concentrações de cafeína reportadas da ordem de ng.L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$ (GONÇALVES, 2008)(RAIMUNDO, 2011).

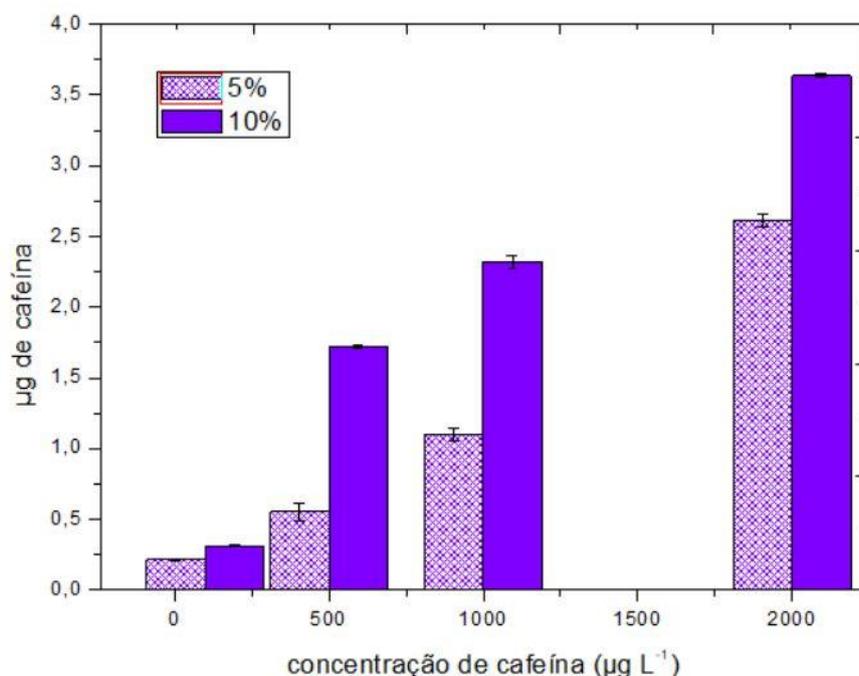


Figura 5 Gráfico de sorção de cafeína em membranas de 5% e 10%

Além disso, o GL-HMIP 10% conseguiu sorver uma quantidade maior de cafeína (Tabela 3), como esperado, uma vez que, possui um maior número de sítios disponíveis para a ligação específica. Portanto, os estudos seguintes foram realizados com a membrana ligante contendo 10% de HMIP.

Tabela 3 Porcentagem de CAF sorvida pelas GL-HMIP 5% e 10% (m/v) de HMIP

Concentração de Cafeína ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Porcentagem de m_{CAF} sorvida em GL-HMIP com 5% (m/v) de HMIP	Porcentagem de m_{CAF} sorvida em GL-HMIP 10% (m/v) de HMIP
100	(32 ± 3)%	(39 ± 5)%
500	52%	60%
1000	(59 ± 3)%	(60 ± 2)%
2000	(21 ± 2)%	(61 ± 2)%

4.2 Planejamento fatorial para investigação de fatores que influenciam na sorção da cafeína na membrana de ligação

A manipulação dos dados obtidos foi feita a partir do software *Statistica*®, o gráfico de Pareto das variáveis estudadas, com um nível de confiança de 95%, está apresentado na figura 6. Nota-se que ambos os fatores são significativos para a sorção da cafeína, sendo o efeito da força iônica (1) mais expressivo. Esta variável independente possui contribuição negativa, ou seja, quanto menor a força iônica maior a sorção de cafeína, portanto foi escolhida a força iônica no nível -1, de 0,01 mol L⁻¹. Provavelmente esse resultado se dá por possíveis interações entre os íons da solução e o analito, o que diminui a concentração de moléculas disponíveis de cafeína para sorver na membrana ligante e/ou interações eletrostáticas entre os sítios mais polares do polímero e os íons Na⁺ e NO₃⁻ (BERELI et al., 2008).

A variação positiva do pH (2) é significativa para a variável resposta, portanto o pH mais favorável é o 7, resultado satisfatório já que dispensa a manipulação de amostra para o ajuste desse parâmetro. Uma provável razão para a maior sorção nesse pH seria que em meio ácido poderia haver a competição dos íons H⁺ pelos sítios de ligação no polímero, diminuindo assim a interação HMIP-cafeína (GRASSI, 2008). Além disso, não há efeito expressivo da relação entre os dois parâmetros pH e força iônica devido ao pH neutro do NaNO₃.

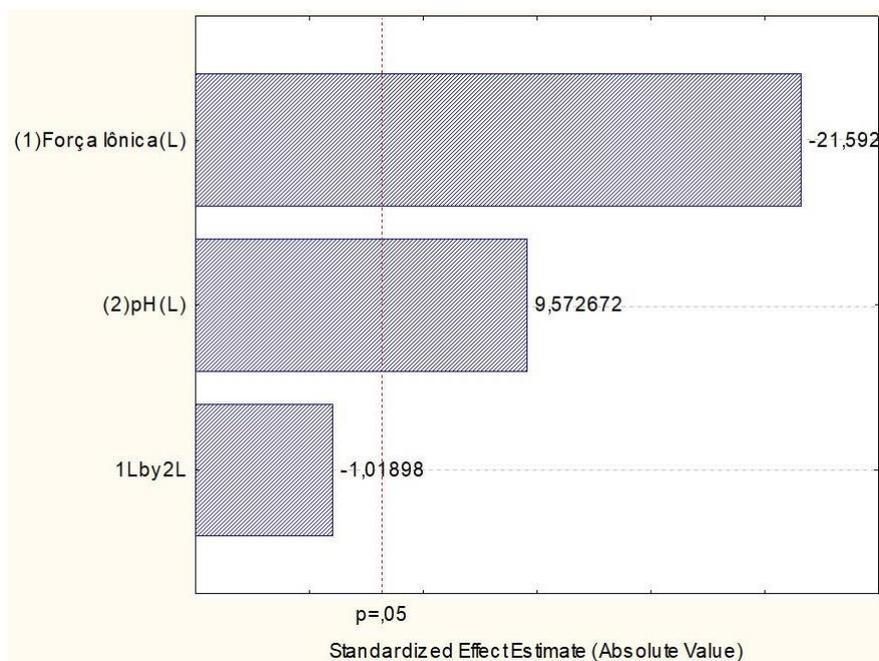


Figura 6 Gráfico de Pareto dos fatores estudados

4.3 Estudos de desorção da cafeína sorvida em GL-HMIP

A composição de solvente que apresentou maior recuperação de CAF com um menor desvio padrão foi MeOH/ACN (3:1) (Figura 7). Essa mistura apresentou força suficiente para instabilizar e romper a ligação entre o analito e a fase sólida, que provavelmente, é formada por ligações de hidrogênio. Além disso, outros fatores já apontados por Silva (DA COSTA SILVA; AUGUSTO, 2006) como o parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ) e a série eluotrópica segundo Snyder (ϵ^0) podem explicar os motivos dessa mistura ser um bom eluente. Ambos solventes possuem valores semelhantes de δ (12,9 para o metanol e 11,7 para acetonitrila) e de ϵ^0 (0,95 para o metanol e 0,65 para acetonitrila). Estes dois parâmetros são diretamente proporcionais à polaridade do solvente e seu poder de eluição. A semelhança entre os parâmetros de Hildebrand dos solventes e da CAF ($\delta = 13,8$) (ADJEI; NEWBURGER; MARTIN, 1980) prevê que esses compostos formem misturas entre si (MT; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2011), além disso, os valores de ϵ^0 de ambos os solventes são alguns dos mais altos da série eluotrópica, portanto acetonitrila e metanol possuem alto poder de eluição para um composto polar como a CAF. Também foi observado que o MeOH 100% (v/v) conseguiu

dessorver mais CAF que o solvente ACN 100% (v/v), resultado que indica que o metanol pode formar ligações mais favoráveis com o analito que a acetonitrila. A estrutura do metanol permite que essa molécula forme ligações de hidrogênio que competem com as ligações entre CAF e MIP, o que não acontece com a acetonitrila que somente pode estabelecer interações do tipo dipolo, mais fracas (SOUSA, 2018).

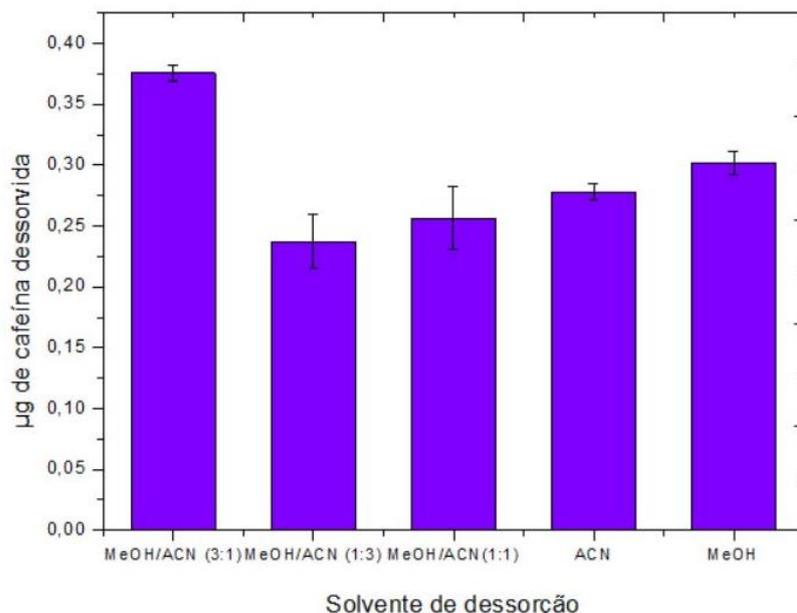


Figura 7 Massa desorvida em função do solvente

O pH de maior desorção foi o 7 (Figura 8), indicativo de que as interações entre cafeína e eluente são favorecidas pela estrutura do analito em sua forma neutra (Figura 1). Neste pH a cafeína é constituída por grupos amina e amida que permitem estabelecer ligações de hidrogênio com solventes próticos como etanol além de conferir polaridade necessária para interações do tipo dipolo com acetonitrila e metanol.

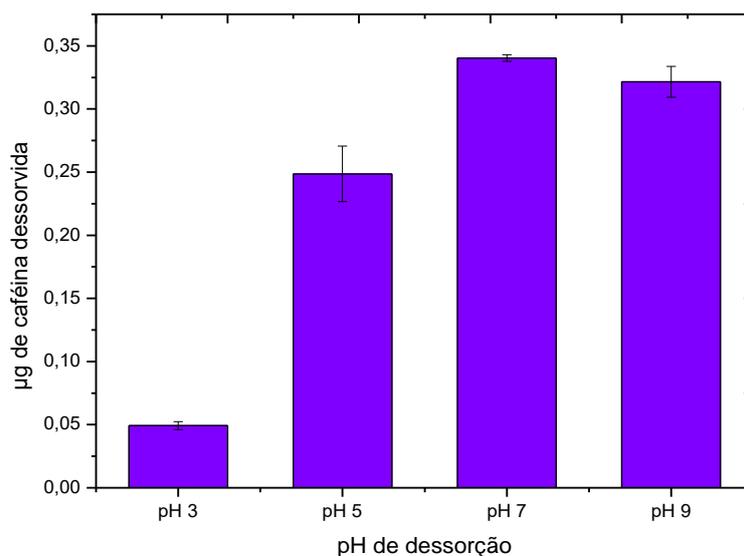


Figura 8 Massa dessorvida de cafeína para diferentes pH's

De acordo com a Figura 9, a quantidade de massa dessorvida em 3, 4 e 5 mL foi semelhante, portanto, a fim de se obter uma melhor pré concentração da cafeína foi escolhido o volume de 3 mL. Foi avaliado da mesma forma o número de eluições (Figura 10), onde foi escolhido o método em triplicata, a fim de diminuir o tempo de bancada e o consumo de solvente.

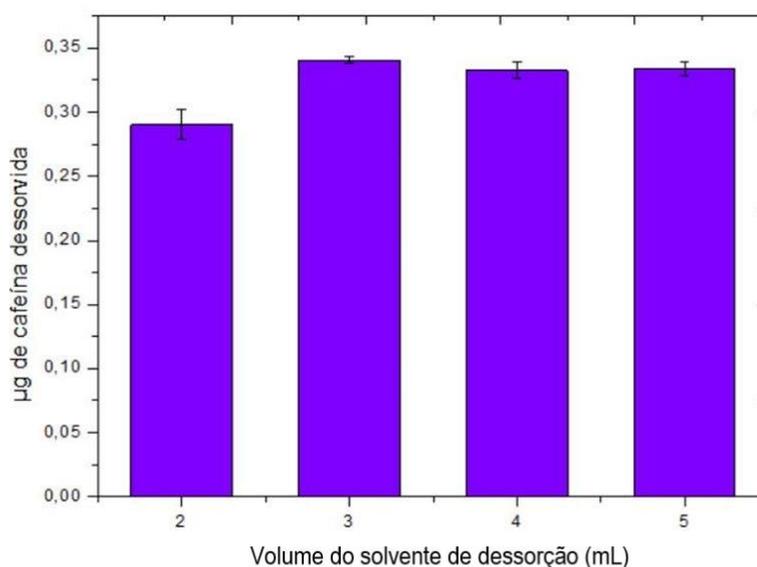


Figura 9 Massa de cafeína dessorvida empregando-se diferentes volumes de solvente

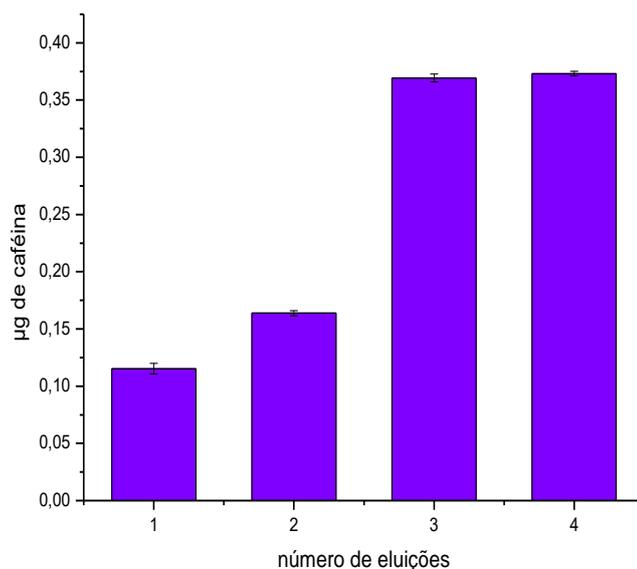


Figura 10 Massas sorvidas de acordo com o número de eluições

Na Figura 11 observa-se que a dessorção de cafeína aumenta juntamente com o tempo de contato entre membrana ligante e solvente de dessorção, resultado coerente dado que a dessorção depende de múltiplos processos que envolvem quebra e formação de ligações além de deslocamento do analito sorvido da fase sólida para a fase líquida. Porém, após 20 minutos é observado que a massa dessorvida do analito aumenta pouco em relação ao tempo. Provavelmente devido a saturação de CAF na fase líquida, a difusão de mais moléculas do analito na GL-HMIP em direção à solução é dificultada, causando o efeito observado. Foi definido para os estudos subsequentes o tempo de dessorção de 20 minutos, a fim de não prolongar o tempo de bancada. Através do teste t de Student foi comprovado que não há diferença significativa entre o emprego do banho ultrassônico na faixa de 20 a 30 minutos.

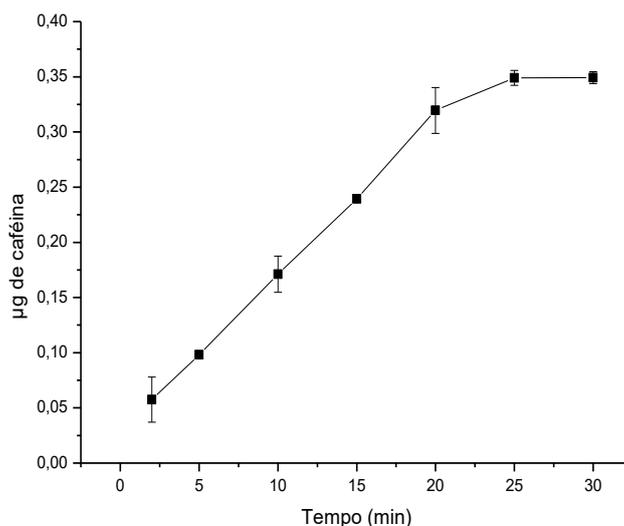


Figura 11 Massas de cafeína desorvidas empregando-se diferentes tempos de eluição

4.4 Determinação do Fator de Eluição

O fator de eluição pode ser interpretado como um estimador da eficiência do dispositivo DGT, além de ser um fator de correção na medida de concentração do analito. É desejável que a membrana GL-HMIP seja capaz de reter o máximo de cafeína disponível em meio aquoso; e também que na etapa de desorção todo o analito na membrana ligante seja carregado pelo solvente. Assim, a razão entre a massa eluída e a massa retida da Equação 7 deve se aproximar de 1. O fator de eluição obtido de 0,79 demonstra que aproximadamente 79% da cafeína sorvida em GL-HMIP foi retirada da membrana pelo solvente de desorção, resultado satisfatório e semelhante aos encontrados em estudos de analitos orgânicos como herbicidas (f_e de 0,74 para Bentazon) (GUIBAL et al., 2017), compostos organometálicos (f_e de 0,74 para dibutilestanho) (COLE et al., 2018) além de drogas ilícitas como metanfetamina (f_e de 0,86) (GUO et al., 2017).

4.5 Determinação do Coeficiente de Difusão

O coeficiente de difusão desse dispositivo para a cafeína é $8,86 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e a curva obtida no ensaio (Figura 12) demonstra que a correlação entre massa retida no GL-HMIP e tempo de contato com a solução de cafeína é linear, com R^2 de 0,996. Além disso, o aumento de massa em função do

tempo de contato demonstra que não houve a completa saturação da GL-HMIP.

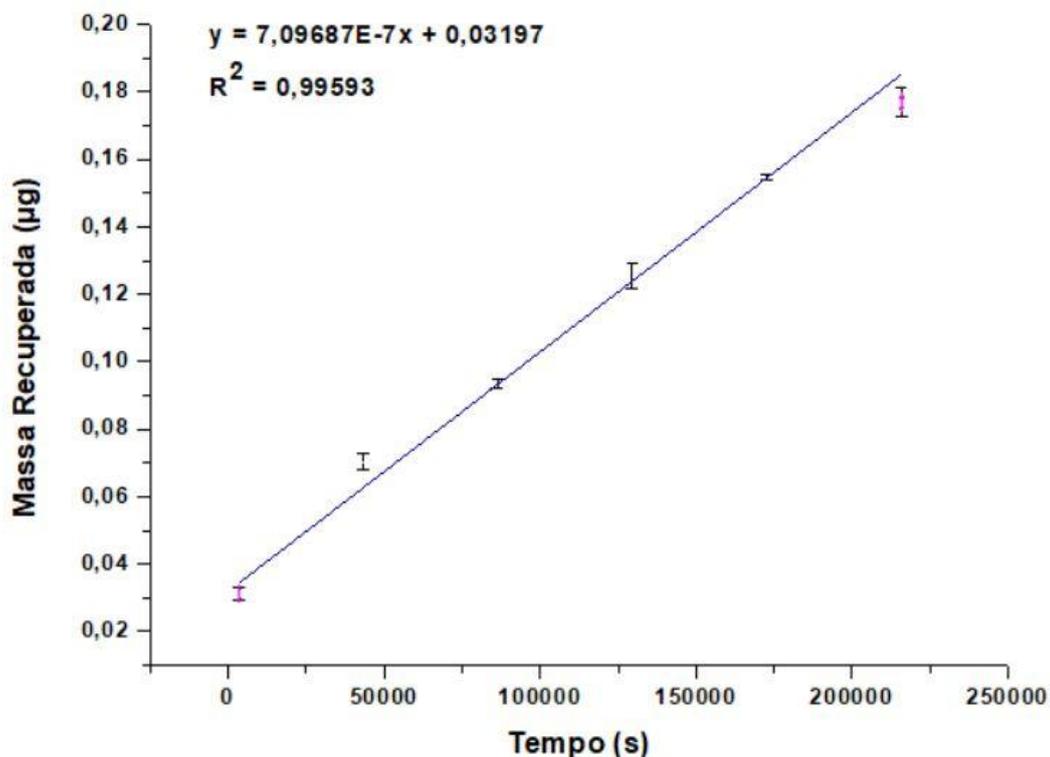


Figura 12 Massa de Cafeína em GL-HMIP por Tempo de Contato

4.6 Aplicação do DGT

Os resultados da aplicação de DGT em água tratada apresentaram uma concentração de 12 ng L^{-1} de CAF, um pouco abaixo das concentrações encontradas em amostras semelhantes (GONÇALVES, 2008). Já para a análise da água fortificada com CAF, obteve-se $0,81 \text{ µg L}^{-1}$ de CAF sorvida nos DGTs, calculada por meio da Equação 4 com M equivalente à média das massas sorvidas em cada DGT. A razão entre esta concentração e a concentração de *spike* é de 0,81, logo não há diferença significativa entre estas, indicativo de que a matriz complexa da amostra não influencia na aplicação do DGT e de que este tem êxito na quantificação de cafeína em amostras naturais. Além disso, este resultado corrobora com o f_e de 79%, indicativo da eficiência conjunta de sorção e dessorção.

5. Conclusão

Os testes preliminares demonstraram que a melhor sorção de cafeína se deu com: o GL-HMIP com 10% (m/v) de HMIP sem que houvesse a saturação mesmo em uma faixa de concentrações superiores às encontradas em amostras de água ambientais; e em pH 7 e força iônica de 0,01 mol.L⁻¹. Com esses dados foi realizada a otimização dos parâmetros de dessorção que originou um método que permite a pré-concentração de amostra com pouco volume de solvente e sem necessidade de correção de pH. O dispositivo DGT apresentou f_e de 0,79 ou seja, a recuperação da massa de CAF retida em GL-HMIP durante a dessorção foi de 79%, valor semelhante aos encontrados na literatura para contaminantes orgânicos. Através da imersão dos DGTs por até 60 horas em solução com 20 µg de cafeína concluiu-se que não houve saturação da membrana ligante, portanto é viável a exposição do amostrador a um corpo d'água por períodos mais longos como alguns dias. A análise em água tratada resultou em 12 ng L⁻¹ de CAF e o *spike* demonstrou que o DGT foi bem-sucedido em sorver 81% de uma massa conhecida do analito, o que indica que este método é bastante promissor para pré-concentração seletiva de cafeína *in situ* em matrizes complexas. Desta forma, o uso de HMIP como fase ligante de DGT para moléculas orgânicas é inovador e promissor para novas aplicações, uma vez que é sintetizado especificamente para as moléculas a serem extraídas.

6. Perspectivas Futuras

Após estabelecidas as condições ótimas de sorção e dessorção estudadas além da análise em água para consumo, as demais etapas serão executadas:

- Realizar determinação da CAF em amostra do Lago Paranoá;
- Elaboração e submissão de artigo científico com os resultados obtidos neste presente trabalho.

7. Referências Bibliográficas

ADJEI, A.; NEWBURGER, J.; MARTIN, A. Extended hildebrand approach: Solubility of caffeine in dioxane–water mixtures. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 659–661, 1980.

ARNAUD, M. J. The pharmacology of caffeine. **Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques**, [s. l.], p. 273–313, 2011.

BERELI, N. et al. Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1190, n. 1–2, p. 18–26, 2008.

BRUZZONITI, M. C.; SARZANINI, C.; MENTASTI, E. Preconcentration of contaminants in water analysis. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 902, n. 1, p. 289–309, 2000.

CASARIN, F. **Síntese e caracterização de Polímeros Molecularmente Impressos para determinação de cafeína em águas superficiais**. Qualificação (Doutorado em Química) 2018. Universidade de Brasília, [s. l.], 2018.

CHALLIS, J. K.; HANSON, M. L.; WONG, C. S. Development and Calibration of an Organic-Diffusive Gradients in Thin Films Aquatic Passive Sampler for a Diverse Suite of Polar Organic Contaminants. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 88, n. 21, p. 10583–10591, 2016.

CHEN, C. E. et al. Evidence and recommendations to support the use of a novel passive water sampler to quantify antibiotics in wastewaters. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 23, p. 13587–13593, 2013.

CHEN, C. E.; ZHANG, H.; JONES, K. C. A novel passive water sampler for in situ sampling of antibiotics. **Journal of Environmental Monitoring**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1523–1530, 2012.

COLE, R. F. et al. Development and evaluation of a new diffusive gradients in thin-films technique for measuring organotin compounds in coastal sediment pore water. **Talanta**, [s. l.], v. 178, n. May 2017, p. 670–678, 2018.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B: Analytical**

Technologies in the Biomedical and Life Sciences, [s. l.], v. 804, n. 1, p. 173–182, 2004.

DA COSTA SILVA, R. G.; AUGUSTO, F. Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1114, n. 2, p. 216–223, 2006.

DANESHVAR, A. **Source, Occurrence, and Fate of Pharmaceuticals in Natural Waters**. [s.l: s.n.].

DAVISON, W.;ZHANG, H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**, [s. l.], v. 367, n. 6463, p. 546–548, 1994.

DE LIZ, M. V.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Considerações sobre o preparo de amostras contendo micropoluentes estrogênicos. **Química Nova**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1213–1215, 2012.

DEO, R. P. Pharmaceuticals in the Surface Water of the USA: A Review. **Current Environmental Health Reports**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 113–122, 2014.

DICKEY, F. H. The Preparation of Specific Adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 227–9, 1949.

DONG, J. et al. Sampling 4-chlorophenol in water by DGT technique with molecularly imprinted polymer as binding agent and nylon membrane as diffusive layer. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 822, p. 69–77, 2014.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 44, n. 3, 2008.

FROEHNER, S. et al. Tracking anthropogenic inputs in Barigui River, Brazil using biomarkers. **Water, Air, and Soil Pollution**, [s. l.], v. 210, n. 1–4, p. 33–41, 2010.

GONÇALVES, E. S. **Uso da Cafeína como indicador de contaminação por esgoto doméstico em águas superficiais**. 2008. [s. l.], 2008.

GRASSI, V. **Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo**. 2008. [s. l.], 2008.

GUIBAL, R. et al. Passive sampling of anionic pesticides using the Diffusive Gradients in Thin films technique (DGT). **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 966, p. 1–10, 2017.

GUO, C. et al. Investigation and Application of a New Passive Sampling Technique for in Situ Monitoring of Illicit Drugs in Waste Waters and Rivers. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 16, p. 9101–9108, 2017.

HARMAN, C.; ALLAN, I. J.; VERMEIRSEN, E. L. M. Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler-a critical review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 2724–2738, 2012.

HUANG, D. L. et al. Application of molecularly imprinted polymers in wastewater treatment: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 963–977, 2014.

IBGE. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2008**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.

LAPWORTH, D. J. et al. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 163, p. 287–303, 2012.

LIN, C. I. et al. Synthesis of molecular imprinted organic-inorganic hybrid polymer binding caffeine. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 481, n. 2, p. 175–180, 2003.

LOOS, R. et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water Research**, [s. l.], v. 44, n. 14, p. 4115–4126, 2010.

MITCHELL, D. C. et al. Beverage caffeine intakes in the U.S. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 63, p. 136–142, 2014.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Sample Preparation in Chromatography**. [s.l: s.n.].

MONTAGNER, C. C. et al. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 1866–1869, 2014.

MORENO-GONZÁLEZ, D. et al. Evaluation of hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry and extraction with

molecularly imprinted polymers for determination of aminoglycosides in milk and milk-based functional foods. **Talanta**, [s. l.], v. 171, n. April, p. 74–80, 2017.

MT, C.; OLIVEIRA, A. P. De; NOGUEIRA, R. F. P. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SOLUBILIDADE DE HILDEBRAND/HANSEN NA SELEÇÃO DE SOLVENTES PARA A EXTRAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS DO SOLO. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1501–1506, 2011.

POULIER, G. et al. Estimates of pesticide concentrations and fluxes in two rivers of an extensive French multi-agricultural watershed: application of the passive sampling strategy. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 8044–8057, 2015.

RAIMUNDO, C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 2011. [s. l.], 2011.

ROLDÃO, M. V. et al. Development of molecularly imprinted polymers for solid phase extraction of parabens in plasma samples and analysis by UHPLC-MS/MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 257–265, 2017.

SANKARARAMAKRISHNAN, N.; GUO, Q. Chemical tracers as indicator of human fecal coliforms at storm water outfalls. **Environment International**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1133–1140, 2005.

SILVA, R. G. da C. **Materiais Sorventes Impressos Molecularmente Preparados por Processos sol-gel**. 2009. [s. l.], 2009.

SOUSA, L. S. **Extração em fase sólida utilizando polímero de impressão molecular para a determinação de cafeína**. 2018. Universidade de Brasília, [s. l.], 2018.

ŠVORC, L. et al. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 1198–1204, 2012.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP em técnicas de extração e separação. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.

TEIJON, G. et al. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 408, n. 17, p. 3584–3595, 2010.

VASAPOLLO, G. et al. Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 5908–5945, 2011.

WHITCOMBE, M. J.; KIRSCH, N.; NICHOLLS, I. A. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years 2004-2011. **Journal of Molecular Recognition**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 297–401, 2014.

YANG, X. et al. Occurrence and fate of PPCPs and correlations with water quality parameters in urban riverine waters of the Pearl River Delta, South China. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 5864–5875, 2013.

ZHANG, H. et al. In situ high resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe, and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [s. l.], v. 59, n. 20, p. 4181–4192, 1995.

ZOU, Y. T. et al. Novel Method for in Situ Monitoring of Organophosphorus Flame Retardants in Waters. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 90, n. 16, p. 10016–10023, 2018.