



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Síntese de Suportes Cromatográficos Monolíticos para Purificação de Biomoléculas Terapêuticas

Nuno Manuel Alves Esteves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Maria João Coito Jesus Nunes

Covilhã, Junho de 2011



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Síntese de Suportes Cromatográficos Monolíticos
para Purificação de Biomoléculas Terapêuticas**

Nuno Manuel Alves Esteves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Maria João Coito Jesus Nunes

Covilhã, Junho de 2011

A Deus

Aos meus Pais, Fernando e Maria do Rosário

À minha Irmã Sónia, ao meu afilhado Tiago e ao meu Cunhado Afonso

À minha Namorada Luísa

A todos os meus Familiares e Amigos

Por tudo o que fizeram por mim, um especial Obrigado.

Agradecimentos

Um trabalho de investigação nunca é um trabalho solitário, mas sim a confluência do esforço e dedicação de muitos. Desde já, desejo expressar, o meu sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua realização, pois ao longo da sua elaboração, foram imprescindíveis os incentivos de colegas, amigos e familiares bem como de contribuições de outras entidades, a quem nunca é demais manifestar o maior apreço.

De um modo particular:

À minha orientadora, Professora Doutora Maria João Nunes pelo voto de confiança, ao acreditar no meu potencial para prosseguir com “a missão” iniciada no projecto de licenciatura, pela sua colaboração, apoio científico, incentivo e disponibilidade sempre presentes, sem os quais teria sido difícil a realização deste trabalho. Acima de tudo, um muito obrigado pela sua amizade.

Ao Professor Doutor Renato Boto, pela sua disponibilidade, respeito e entreaajuda que em muito foi útil no decorrer desta investigação.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida, pela sua preocupação e acolhimento no laboratório pelo qual é responsável.

À Professora Doutora Ana Maria Carreira Lopes, pelos seus ensinamentos e pela sua disponibilidade prestados durante estes 6 anos nesta academia.

Às minhas colegas de laboratório, Diana e Liliana pela ajuda, incentivo e paciência.

À Professora Doutora Susana Ramos e à Professora Doutora Sílvia Nunes pela ajuda, preocupação e paciência.

A todos os funcionários do Departamento de Química pela ajuda e amizade prestadas ao longo deste trabalho, de um modo particular ao Dr. Luís Matias, pela disponibilidade e pelo apoio dado na realização dos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN.

À Universidade da Beira Interior, pelos meios disponibilizados.

Por fim, gostaria de agradecer numa forma muito especial e sentida à minha Família:

Aos meus Pais, pelo seu amor, educação, confiança e apoio incansáveis que nunca faltaram, pela demonstração de que é com trabalho, esforço e dedicação que atingimos os nossos objectivos.

À minha irmã Sónia, que com alegria e entusiasmo, sempre me ajudou, facultando-me assim a energia que por vezes escasseou. Pela sua sincera amizade, um muito Obrigado.

Ao meu afilhado Tiago, que com gestos e palavras simples alegrou os meus dias.

Ao meu cunhado Afonso, pela sua amizade e apoio sempre presentes.

Ao meu tio Manuel Alves, pela sua amizade e ajuda prestada durante estes anos.

À minha namorada Luísa, pelo seu apoio, amor, respeito e compreensão sempre presentes, de uma forma exemplar, factores essenciais para a minha determinação na concepção desta tese.

Resumo

Os monólitos, também designados como fases estacionárias contínuas, são uma classe relativamente nova de fases estacionárias, constituída por uma estrutura contínua, única, composta por uma rede inter cruzada de canais, o que os torna altamente porosos. Podem ser usados em diferentes tipos de cromatografia, como a cromatografia de afinidade. Sendo esta uma técnica das mais selectivas, em que se consegue a separação de biomoléculas com um elevado grau de pureza, aliada à porosidade dinâmica destes monólitos, permite que as moléculas passem unicamente por convecção, com uma elevada transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel. Deste modo, a combinação destas ferramentas fazem deste conjunto uma mais-valia na bioseparação.

Com este trabalho pretendeu-se otimizar as condições de síntese do monólito resultante da polimerização entre o metacrilato de glicidilo e o dimetacrilato de etileno, de modo a comparar o seu desempenho relativamente a monólitos comerciais para purificação de biomoléculas, usando aminocianinas como ligandos. Esta optimização das condições reaccionais serviria igualmente de base para uma nova abordagem em que a aminocianina se ligaria inicialmente a um dos co-monomeros (metacrilato de glicidilo), sendo apenas posteriormente, efectuada a polimerização com o dimetacrilato de etileno.

Apesar de a utilização de monólitos já estar bastante difundida para a purificação de biomoléculas, o uso de cianinas como ligandos está numa fase inicial. Assim, a síntese de aminocianinas que iriam ser posteriormente usadas como ligandos foi, igualmente, um dos objectivos deste trabalho.

Os corantes sintetizados foram, caracterizados por ponto de fusão, espectrometria de ressonância magnética nuclear de protão e carbono e espectrofotometria de infravermelho e ultravioleta/visível.

De modo a encontrar monólitos que reúnam as condições acima indicadas, realizou-se um estudo onde se fez variar a composição dos solventes porogénicos, tempo e tipo de iniciador.

São discutidos os resultados obtidos, quer na preparação das monometinocianinas funcionalizadas, quer na síntese dos seus precursores. São igualmente discutidos os resultados obtidos na síntese dos monólitos.

Palavras-chave

Aminocianinas, Cromatografia de Afinidade, Dimetacrilato de Etileno, Ligandos, Monólitos, Metacrilato de Glicidilo.

Abstract

The monoliths, also known as continuous stationary phases, are a relatively new class of stationary phases consisting of a continuous structure, one composed of a grid of channels intercrossed, which makes them highly porous. They can be used in different types of chromatography such as affinity chromatography. This technique is one of the most selective in which one achieves the separation of biomolecules with a high degree of purity, combined with the dynamic porosity of monoliths, allows molecules to pass only by convection, with a high mass transfer between stationary phase and mobile phase. In this way, the combination of these tools make this set a gain on bioseparation.

This work aimed to optimize the synthesis conditions of the monolith resulting from the polymerization of glycidyl methacrylate and ethylene dimethacrylate in order to compare their performance against commercial monoliths for purification of biomolecules, using aminocyanines as ligands. This optimization of the reactional would also serve as the basis for a new approach that would bind aminocyanine initially with a co-monomer (glycidyl methacrylate), and only later carried out the polymerization with ethylene dimethacrylate.

Although the use of monoliths is already widespread for the purification of biomolecules, such as the use of cyanine ligands are at an early stage. Thus, the synthesis of aminocyanines that would later be used as ligands was also one of the objectives of this work.

The compounds synthesized were characterized by melting point, nuclear magnetic resonance spectroscopy of proton and carbon and infrared and ultraviolet-visible spectrophotometry.

In order to find monoliths that meet the above conditions, we carried out a study where the composition porogenic solvents, time and type of initiator was varied.

The results observed in the preparation of aminocyanines and their precursors as well as in the synthesis of monoliths are discussed.

Keywords

Aminocyanines dyes, Affinity chromatography, Ethylene dimethacrylate, Glycidyl methacrylate, Ligands, Monoliths.

Índice

Capítulo I Introdução

1.1 - Cianinas	2
1.1.1 - Características das cianinas	3
1.1.2 - Métodos de síntese	3
1.1.3 - Aplicações	6
1.2 - Cromatografia de afinidade	7
1.2.1 - Ligando	8
1.2.2 - O suporte e a matriz	9
1.2.3 - Cadeias espaçadoras	10
1.2.4 - Procedimentos de eluição	11
1.3 - Monólitos	12

Capítulo II Discussão de resultados

2.1 - Preâmbulo	18
2.2 - Síntese de materiais de partida	19
2.2.1 - Precursores de sais quaternários de amônio	19
2.2.1.1 - Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole	19
2.2.2 - Síntese de sais quaternários de amônio	20
2.3 - Síntese de monometinocianinas funcionalizadas	23
2.3.1 - Nitrocianinas	23
2.3.2 - Aminocianinas	26
2.3.2.1 - Redução da nitrocianina	26
2.3.2.2 - Redução de sais quaternários de amônio	30
2.4 - Síntese de monólitos	31
2.4.1 - Síntese de monólitos poli(GMA-co-EDMA)	31
2.4.1.1 - Pré-tratamento de coluna	32
2.4.1.2 - Polimerização do GMA com EDMA com formação de monólito poli(GMA-co-EDMA)	33
2.4.1.3 - Lavagem dos monólitos obtidos	37
2.5 - Conclusões	38
2.6 - Perspectivas futuras	39

Capítulo III

Parte Experimental

3.1 - Reagentes e equipamento	41
3.2 - Síntese de materiais de partida	42
3.2.1 - Precursores de sais quaternários de amónio	42
3.2.2 - Síntese de sais quaternários de amónio	42
3.3 - Síntese de monometinocianinas funcionalizadas	44
3.3.1- Síntese de nitrocianinas	44
3.3.1.1 - Preparação dos sais quaternários	44
3.3.1.2 - Condensação dos sais quaternários	44
3.3.2 - Síntese de aminocianinas	45
3.3.2.1 - Redução de nitrocianinas	45
3.4 - Síntese de monólitos	47
3.4.1 - Pré-tratamento da coluna	47
3.4.2 - Reacção de polimerização do poli(GMA-co-EDMA)	47
3.4.2.1 - Monólito 1	48
3.4.2.2 - Monólito 2	48
3.4.2.3 - Monólito 3	48
3.4.2.4 - Monólito 4	48
3.4.2.5 - Monólito 5	49
3.4.2.6 - Monólito 6	49
3.4.2.7 - Monólito 7	49
3.4.2.8 - Monólito 8	49
3.4.2.9 - Monólito 9	49
3.4.2.10 - Monólito 10	50
3.4.2.11 - Monólito 11	50
3.4.2.12 - Monólito 12	50

Referências Bibliográficas

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura geral das cianinas	2
Figura 1.2 - Esquema de alguns processos cromatográficos mais relevantes	7
Figura 1.3 - Efeitos de uma cadeia espaçadora na interacção macromolécula-ligando	10
Figura 1.4 - Monólito	12
Figura 1.5 - Fase estacionária monolítica	13

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Classificação dos processos cromatográficos, segundo a propriedade molecular mais relevante	7
Tabela 2.1 - Rendimento, dados físicos e espectroscópicos do 2-metil-6-nitrobenzotiazole	19
Tabela 2.2 - Rendimento, dados físicos e espectroscópicos de tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io e do tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io	22
Tabela 2.3 - Rendimento, dados físicos e espectroscópicos da nitrocianina	25
Tabela 2.4 - Diferentes condições usadas na redução das nitrocianinas	27
Tabela 2.5 - Rendimento, dados físicos e espectroscópicos da aminocianina	29
Tabela 2.6 - Condições usadas na síntese de monólitos poli(GMA-co-EDMA)	35
Tabela 3.1 - Soluções reveladoras utilizadas nas pulverizações	41

Índice de Esquemas

Esquema 1.1	Método do tioalquilo para obtenção de monometinocianinas simétricas e assimétricas	4
Esquema 1.2	Método do ortoéster para obtenção de trimetinocianinas simétricas	4
Esquema 1.3	Método da <i>N,N'</i> -difetilformamida para obtenção de trimetinocianinas simétricas e assimétricas	5
Esquema 1.4	Método do 1-anilino-3-anilprop-1-eno para obtenção de pentametinocianinas simétricas e assimétricas	5
Esquema 2.1	Síntese dos sais quaternários de amónio 7 e 8	20
Esquema 2.2	Síntese da aminocianina 6 , pela redução da nitrocianina com ferro/ácido clorídrico em metanol	26
Esquema 2.3	Síntese da aminocianina 6 , pela redução da nitrocianina	27
Esquema 2.4	Síntese da aminocianina 6 , pela redução de sais quaternários de amónio	30
Esquema 2.5	Estrutura do monólito sintetizado poli(GMA-co-EDMA)]	31
Esquema 2.6	Ligação da aminocianina (ligando) ao grupo epóxido do monólito	32
Esquema 2.7	Esquema da reacção de modificação das paredes da coluna	33

Simbologia e Abreviaturas

Arom	aromático
AIBN	azobisisobutyronitrile (azoisobutironitrilo)
BPO	benzoyl peroxide (peróxido de benzoílo)
°C	graus Celsius
CA	cromatografia de afinidade
c.c.f.	cromatografia de camada fina
¹³ C RMN	ressonância magnética nuclear de carbono
d	duplete
dd	duplo duplete
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	desoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
EDMA	ethylene dimethacrylate (dimetacrilato de etileno)
EG	etilenoglicol
Et	etilo
EtOH	etanol
f	fraco
F	forte
FE	fase estacionária
g	grama
GMA	glycidyl methacrylate (metacrilato de glicidilo)
h	horas
HPLC	high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
¹ H RMN	ressonância magnética nuclear de próton
Hz	hertz
I ⁻	contra ião iodeto
IV	infravermelho
LCD	liquid crystal display (monitor de cristal líquido)
Lit	literatura
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
n ^o	número
nm	nanómetros
p.f.	ponto de fusão
Ph	fenilo
ppm	parte por milhão
Poli(GMA-co-EDMA)	poli(metacrilato de glicidilo-co-dimetacrilato de etileno)
q	quarteto
R	grupo alquilo ou alquilsustituído
R.f.	retardation factor (factor de retardação)

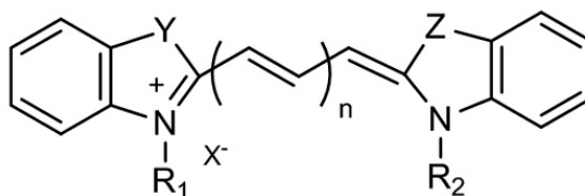
s	singuleto
sl	singuleto largo
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
temp	temperatura
TMS	tetrametilsilano
Tos ⁻	contra ião tosilato
Tos-Et	tosilato de etilo ou (p-toluenossulfonato de etilo)
UV	ultravioleta
UV/Vis	ultravioleta-visível
Vis	visível
% v/v	percentagem volume/volume
X ⁻	contra-ião
δ	desvio químico em relação ao TMS (ppm)
Δ	aquecimento
η	rendimento
J	constante de acoplamento (Hz)
λ _{máx}	comprimento de onda do máximo de absorção
ν _{máx}	frequência do máximo de absorção de uma banda
)))	ultra-sons

Capítulo 1 - Introdução

1.1- Cianinas

O primeiro corante sintético com algum interesse comercial foi obtido por William Perkin em 1856, tendo sido denominado mauveína. No mesmo ano, Greville Williams, ao aquecer quinolina, que continha lepidina como impureza, com iodeto de isoamilo e hidróxido de sódio, sintetizou um corante azul, a que deu o nome de cianina ⁽¹⁾. Este nome tem origem no grego *Kianos*, que significa azul-escuro ⁽²⁾. Mais tarde, em 1873, H.W. Vogel começou a usar cianinas como corantes em fotografia. Desde então, as pesquisas sobre estes corantes tiveram um grande desenvolvimento ⁽³⁾.

As cianinas, corantes polimetínicos, são caracterizadas por terem na sua constituição uma cadeia de ligações duplas conjugadas, com um número ímpar de átomos de carbono, que promove a união de dois núcleos heterocíclicos com pelo menos um átomo de azoto (figura 1.1) ⁽³⁾.



Y= Z ou Y ≠ Z = S, Se, O, C(CH₃)₂, -CH=CH-, etc.

X= I, Br, Cl, Tos, ClO₄, etc.

R₁ = R₂ ou R₁ ≠ R₂ = alquilo ou alquilsustituído

n= 0, 1, 2, 3, ...

Figura 1.1- Estrutura geral das cianinas

Apesar de um azoto ser terciário e o outro quaternário, a carga positiva não se encontra especificamente num dos átomos de azoto, mas sim ao longo da cadeia. Uma cianina é, então, vista como um híbrido de ressonância de duas estruturas canônicas, pelo que, apesar de se usar apenas uma por simplicidade, nenhuma fórmula simples dá uma representação completa ⁽²⁾ ⁽³⁾.

No que diz respeito ao comprimento da cadeia, n pode ser 0, 1, 2, 3 ou mais, verificando-se um aumento da instabilidade com o comprimento da cadeia. Deste modo, cianinas nas quais os núcleos estão ligados por um grupo metino (n=0) têm o nome de monometinocianinas ou, simplesmente cianinas; quando têm uma cadeia trimetínica (n=1) designam-se por trimetinocianinas ou carbocianinas; o termo pentametínocianinas ou dicarbocianinas refere-se às cianinas que possuem uma cadeia pentametínica (n=2); quando os núcleos se encontram ligados por uma cadeia de sete carbonos (n=3), estes corantes são designados de heptametínocianinas ou tricarbocianinas e assim sucessivamente ⁽³⁾.

1.1.1- Características das cianinas

As cianinas absorvem numa gama muito larga do espectro electromagnético, desde os 340 nm até aos 1400 nm, gama correspondente ao intervalo que vai do ultravioleta (UV) ao infravermelho (IV), estando a sua cor relacionada com a interacção de ressonância entre os átomos de azoto nos extremos da cadeia conjugada, envolvendo, deste modo, o movimento da carga positiva. Esta cor pode ser influenciada por factores como a natureza do núcleo, o comprimento da cadeia polimetínica e o efeito de substituintes no núcleo e na cadeia ⁽³⁾ ⁽⁴⁾.

A posição de absorção é afectada pelo comprimento da cadeia, que provoca um desvio na mesma para regiões de maior comprimento de onda, cerca de 100-120 nm por cada incremento vinílico (CH=CH) ⁽⁵⁾. A posição do máximo de absorção da cianina é também influenciada pela variação do núcleo heterocíclico. Um bom exemplo que retrata esta variação é o facto de uma cianina que contenha dois grupos de benzoxazole absorver na região do UV enquanto outra, que contenha dois núcleos de benzotiazole, já absorver na região do visível ⁽³⁾.

É de referir que estes corantes apresentam uma estabilidade relativamente boa, altos coeficientes de absorção molar e intensidade de fluorescência média ⁽³⁾.

Embora a natureza do anião não afecte a acção sensibilizadora da cianina, é bastante relevante na solubilidade. Os iodetos são muitas vezes escolhidos para caracterizar novos corantes, devido à sua solubilidade comparativamente baixa e ao seu bom poder de cristalização ⁽⁴⁾.

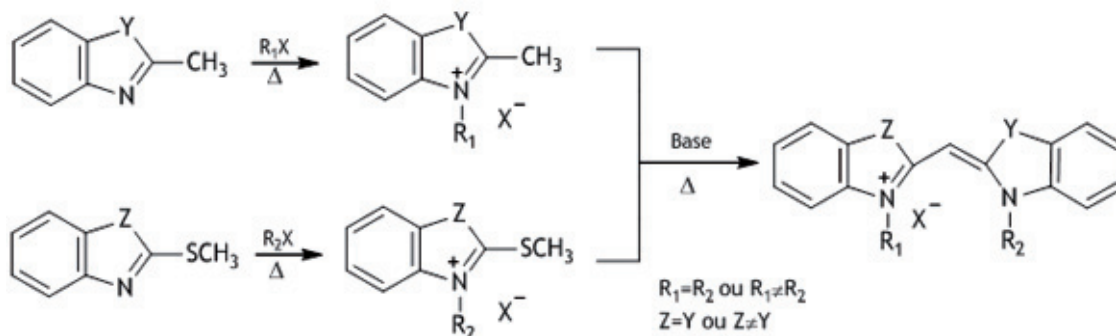
Por outro lado, os sulfatos de alquilo, devido à sua maior solubilidade, são, muitas vezes, adicionados a emulsões fotográficas. Os tosilatos de alquilo são bastante usados porque são menos tóxicos que os sulfatos de alquilo embora, dando como eles, corantes mais solúveis que os iodetos ⁽⁴⁾.

1.1.2- Métodos de síntese

O processo usado para a síntese de cianinas depende do comprimento de cadeia polimetínica pretendida ⁽³⁾.

De um modo geral, pode dizer-se que a síntese destes corantes envolve várias etapas que se resumem a simples sequências de adições de reagentes nucleófilos e electrófilos, precedidas ou seguidas por desprotonações e remoção de grupos de saída. Na presença de bases os precursores chave, sais de alquilamónio de 2-metilbenzoazóis, dão origem a bases metilénicas nucleófilas, também denominadas bases de Fischer ⁽⁵⁾.

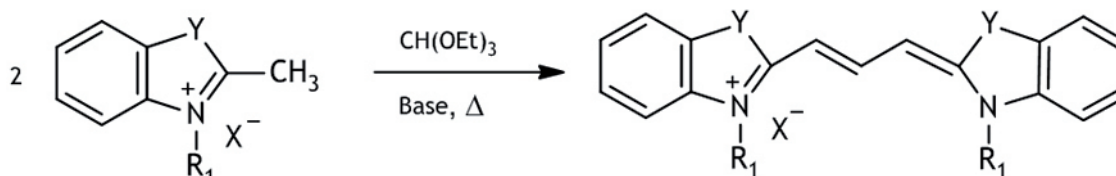
Assim, para a síntese de monometinocianinas, o **método do tioalquilo** (esquema 1.1) é o mais difundido ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾.



Esquema 1.1- Método do tioalquilo para obtenção de monometinocianinas simétricas e assimétricas

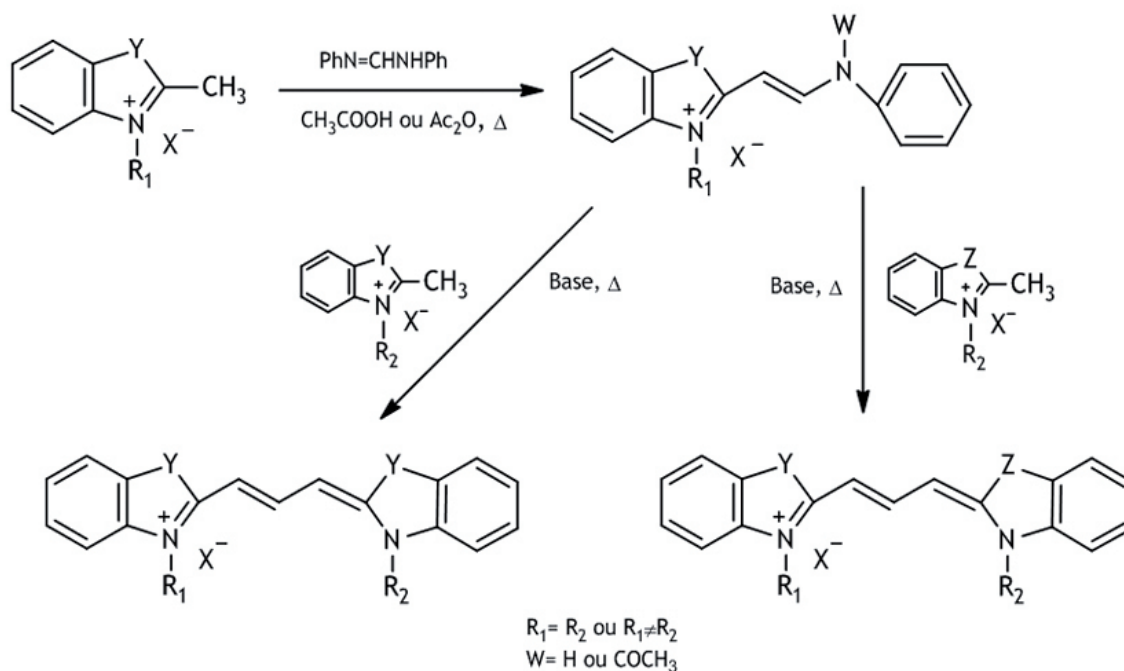
Este método consiste na reacção de condensação entre dois sais quaternários de amónio heterocíclicos, em que um possui um grupo metilo reactivo e o outro, um grupo tioalquilo como grupo de saída, permitindo a obtenção tanto de cianinas simétricas como assimétricas. No entanto, apresenta algumas desvantagens, das quais se pode destacar a produção de metanotiol, um forte poluente, que apresenta um odor bastante desagradável e, nalguns casos, a troca entre os substituintes S-alquilo e N-alquilo dos sais quaternários de amónio, o que pode conduzir a misturas de produtos.

Quando se pretende sintetizar trimetinocianinas simétricas, o método mais frequentemente utilizado é o do **ortoéster** (esquema 1.2) que envolve o aquecimento de um sal quaternário contendo um grupo metilo reactivo, com um ortoéster, normalmente o trietilortoformiato, habitualmente em piridina ^{(6) (7)}.



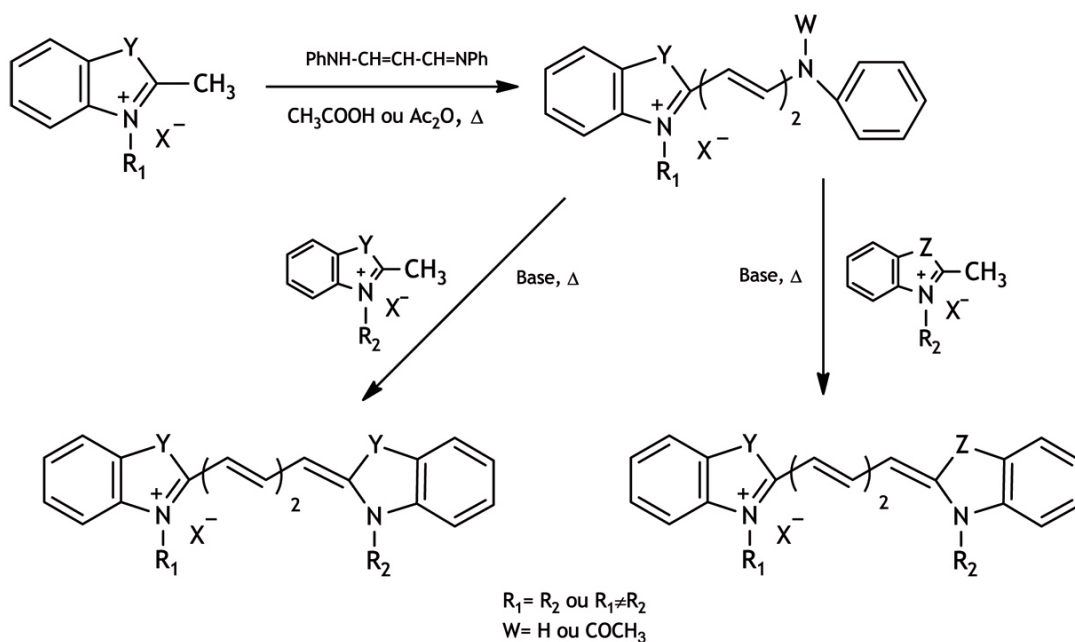
Esquema 1.2- Método do ortoéster para obtenção de trimetinocianinas simétricas.

O **método da *N,N'*-difetilformamida** (esquema 1.3), tem particular destaque na síntese de trimetinocianinas, uma vez que permite sintetizar cianinas tanto simétricas como assimétricas. As diarilformamidinas, Ar-NH-CH=N-Ar, das quais se destaca a difetilformamida (Ar=C₆H₅), são os reagentes mais frequentemente usados, tanto para a obtenção de corantes simétricos, por condensação com duas moles do sal quaternário com o grupo metilo reactivo, como para obter o composto intermediário, por condensação com um equivalente do sal, dando-se, em seguida, a condensação da hemicianina com um sal quaternário diferente do de partida ^{(6) (7)}.



Esquema 1.3- Método da *N,N'*-difetilformamidina para obtenção de trimetinocianinas simétricas e assimétricas

O método do 1-anilino-3-aniloprop-1-eno (esquema 1.4) é um método em tudo idêntico ao da difetilformamidina mas que conduz à formação de pentametincianinas. Consiste na condensação de um sal quaternário com um grupo reactivo com o 1-anilino-3-aniloprop-1-eno na presença de anidrido acético. Os sais produzidos desta maneira podem reagir, na presença de uma base, com o sal quaternário apropriado, produzindo dicarbocianinas simétricas ou assimétricas ^{(6) (7)}.



Esquema 1.4- Método do 1-anilino-3-aniloprop-1-eno para obtenção de pentametincianinas simétricas e assimétricas

As heptametinocianinas podem ser sintetizadas por um procedimento em tudo idêntico ao das pentametinocianinas, mas usando o **1-anilino-5-anilopenta-1,3-dieno** em vez do 1-anilino-3-aniloprop-1-eno. Deste modo, por este método podem sintetizar-se heptametinocianinas tanto simétricas como assimétricas ^{(6) (7)}.

A fotoestabilidade das pentametinocianinas e das heptametinocianinas é relativamente baixa, quando comparada com a dos corantes com menor cadeia metínica ^{(3) (6) (7)}. Para aumentar a estabilidade, é frequente a introdução de carbociclos na cadeia insaturada, por substituição de uma unidade etilénica, de modo a estabilizar as cianinas através da rigidificação.

Exemplos ilustrativos desta estratégia são os derivados dos ácidos esquáricos e crocónicos, no caso das pentametinocianinas e a utilização de bisaldeídos insaturados ou equivalentes, para as heptametinocianinas.

Para além dos métodos de síntese referidos anteriormente, que são os mais gerais e os mais usados, existem muitos outros que permitem sintetizar corantes polimetínicos com iguais ou diferentes comprimentos de cadeia e que não são mais do que pequenas variações destes métodos ⁽⁷⁾.

1.1.3- Aplicações

A principal aplicação deste tipo de corantes não é como agentes de coloração, mas sim como corantes funcionais. Dado que as cianinas possibilitam a introdução de uma grande variedade de alterações estruturais, estas apresentam vastos campo de aplicações, alguns dos quais de alta tecnologia ^{(7) (8)}:

- Sensibilização fotográfica ^{(3) (6) (7) (8)};
- Fotocondutores orgânicos (fotossensibilizadores para electrografia, xerografia e impressão laser) ⁽⁸⁾;
- Tecnologia laser, com usos muito variados, destacando-se na medicina (fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica, no tratamento de tecidos tumorais, oftalmologia, intervenções cirúrgicas) ^{(6) (7) (9)};
- Antitumorais (embora com actividade relativamente baixa) ^{(6) (7) (9)};
- Métodos de análise para determinação de proteínas ultra-sensíveis específicas do HIV-1, por marcadores fluorescentes no infravermelho (IV) ⁽⁷⁾;
- Reagentes sensíveis para a detecção de metais ^{(7) (8)};
- Mostradores de cristais líquidos (LCD) ⁽⁸⁾;
- Corantes têxteis, sobretudo com aplicação em acrílicos, embora limitados pela pouca estabilidade perante a luz ⁽⁸⁾;
- Marcadores para diferentes moléculas biológicas (proteínas, ácidos nucleicos, oligonucleótidos e DNA) ^{(7) (10)};
- Ligandos, para a separação de biomoléculas, por cromatografia de afinidade (CA) ^{(7) (10) (11)}.

1.2- Cromatografia de Afinidade

O desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas, o crescimento da indústria biotecnológica e os resultados em torno do impacto da genómica e proteómica, são alguns exemplos de áreas que exigiram o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas e preparativas. Estas novas abordagens permitem a resolução e caracterização de complexos conjuntos de misturas de moléculas, com um alto rendimento e subsequente purificação das moléculas-alvo. Um outro aspecto, não menos importante, diz respeito a objectivos científicos em termos de escala, preço e quantidade, tentando não aumentar os custos de produção. As pressões financeiras geram uma abordagem mais cautelosa na aprovação de técnicas de alto custo e uma concordância geral entre a comunidade científica, para a redução do número de etapas de purificação. Assim, os processos de purificação tendem a ser repensados, com o objectivo de obter compostos mais puros. A escolha de uma estratégia de purificação é determinada pelos custos, eficácia e robustez ⁽¹²⁾.

Deste modo a cromatografia é uma técnica que reúne estas condições, uma vez que, consoante as características da amostra a separar, permite a utilização de um diferente tipo de cromatografia.

Existem várias técnicas de cromatografia, que podem ser classificadas de acordo com as propriedades mais relevantes do soluto, como se demonstra na tabela 1.1 e na figura 1.2 ⁽¹³⁾.

Tabela 1.1- Classificação dos processos cromatográficos, segundo a propriedade molecular mais relevante ⁽¹³⁾

Tipo de Cromatografia	Propriedade molecular relevante
Cromatografia de troca iónica	Carga eléctrica
Cromatografia de afinidade	Interação bioespecífica
Cromatografia de interacção hidrofóbica	Hidrofobicidade
Cromatografia de filtração em gel	Tamanho e forma
Cromatografia de fase reversa	Hidrofobicidade
Cromatografia covalente	Presença de grupos reactivos

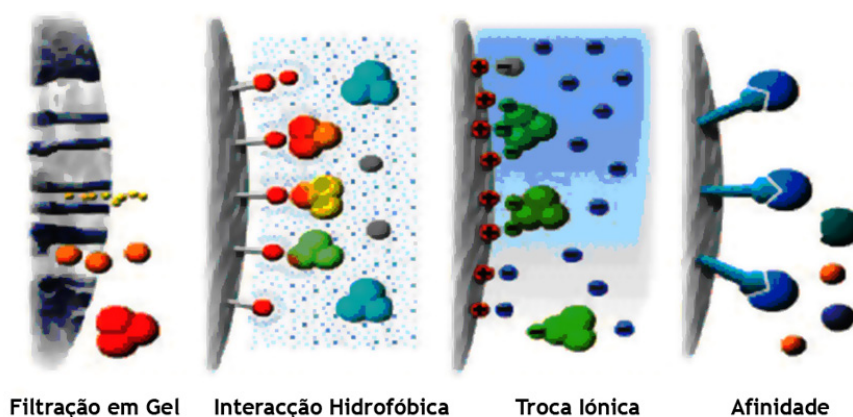


Figura 1.2- Esquema de alguns processos cromatográficos mais relevantes ⁽¹⁴⁾.

A cromatografia tem por base a retardação selectiva dos componentes de uma mistura, quando esta percorre lentamente um leito fixo de partículas absorventes, que se encontram desordeiramente numa camada ou ordenadas numa coluna.

Existem três elementos fundamentais nos sistemas cromatográficos: uma fase estacionária, com grande área superficial; uma fase móvel fluida, que contacta com a primeira e a amostra a separar. Entre a fase estacionária e a fase móvel estão distribuídos reversivelmente os componentes da amostra, sendo este o motivo que torna possível a separação, tendo em conta o coeficiente de distribuição. À medida que são arrastados pela fase móvel, os componentes da amostra são diferentemente retardados pela fase estacionária ⁽¹³⁾.

A CA é uma técnica altamente selectiva e baseia-se na excepcional possibilidade de algumas substâncias biológicas activas se ligarem especifica e reversivelmente a outras substâncias, denominadas de ligandos. Esta técnica simula e explora os processos biológicos naturais como o reconhecimento molecular, para a purificação selectiva da molécula-alvo. O ligando que está imobilizado, tem a capacidade de se ligar especificamente a uma determinada substância ⁽¹²⁾.

A introdução desta técnica, desenvolvida durante os anos 60 e 70, representou a primeira exploração das características biológicas específicas das proteínas, tendo em vista a sua purificação ^{(12) (15)}.

De todas as técnicas de purificação usadas, a CA revela-se como sendo a mais selectiva. É incomparável na tecnologia de purificação pois é a única técnica que permite a purificação de uma biomolécula com base na sua função biológica ou estrutura química individual, preservando a actividade biológica das proteínas isoladas e permitindo o isolamento destas a partir de soluções muito diluídas. Permite a separação tanto de moléculas pequenas, como de macromoléculas e de misturas muito difíceis de separar (separação de estereoisómeros ou mesmo de enantiómeros). O baixo custo, a possibilidade de ser novamente reutilizada, a facilidade de armazenamento seco do gel, uma recuperação do material activo bastante elevada, são outras das vantagens que esta técnica apresenta ⁽¹⁵⁾.

Assim, os métodos de purificação convencionais baseados na precipitação com sais, alterações da temperatura, pH, foram substituídos por estratégias sofisticadas e altamente selectivas, baseadas na CA ⁽¹²⁾.

1.2.1- Ligando

O ligando desempenha um papel muito importante no sucesso de uma purificação por afinidade. Este pode ser classificado como biológico ou não biológico, como é o caso dos aminoácidos e anticorpos, ou dos corantes e metais, respectivamente. Os ligandos biológicos apresentam uma grande especificidade biológica pela molécula, enquanto os ligandos não biológicos são na maior parte das vezes tornados específicos por variação e optimização das condições de ligação e eluição. Por outro lado, os ligandos biológicos são frequentemente

instáveis e limitados a condições suaves, ao passo que os sintéticos são robustos, não sendo susceptíveis à desnaturação e sendo mais estáveis a fortes condições de eluição ⁽¹⁶⁾.

De salientar também que os ligandos naturais são geralmente difíceis de obter pois eles próprios requerem muitas vezes uma pré-purificação, são instáveis química e biologicamente, tendem a ser bastante caros, difíceis de imobilizar, apresentam variações consoante o lote de fabrico e são muito instáveis às condições usadas na limpeza e esterilização, diminuindo o seu tempo de vida útil. Assim, a substituição de ligandos naturais por ligandos sintéticos apresenta várias vantagens ⁽¹⁷⁾.

O uso de corantes como ligandos em CA tem sido considerado como uma das importantes alternativas aos ligandos naturais, tendo a capacidade de interagir com um grande número e tipos diferentes de proteínas, em muitos casos de uma forma bastante específica. Estes corantes são normalmente baratos, encontram-se disponíveis comercialmente e podem ser facilmente imobilizados, especialmente em matrizes que contenham grupos hidroxílicos ⁽¹¹⁾.

Os corantes reactivos, desenvolvidos há cerca de 40 anos e utilizados rotineiramente na indústria têxtil, são os melhores exemplos de ligandos sintéticos. A grande maioria destes corantes têxteis utilizados em CA é normalmente do tipo antraquinonas, ftalocianinas ou corantes azo, ligados a um grupo reactivo, normalmente um anel mono ou diclorotriazínico ⁽¹¹⁾.

De uma maneira geral costumam possuir grupos sulfónicos para tornar a molécula solúvel em meios aquosos ⁽¹¹⁾⁽¹⁸⁾. As biomoléculas e os corantes interagem de uma forma bastante complexa e grande parte destas interacções ainda não estão totalmente esclarecidas. Podem ser classificadas como “específicas” ou “não específicas”, caso a interacção seja feita no sítio da ligação do ligando, ou não. Estas interacções podem ser de todo o tipo de forças descritas entre moléculas, tais como ligações de hidrogénio, Van der Waals, hidrofóbicas, electrostáticas, bem como interacções π - π entre os anéis aromáticos do corante e os resíduos dos aminoácidos das proteínas ⁽¹¹⁾⁽¹⁹⁾.

1.2.2- O Suporte e a matriz

O termo “suporte” ou “meio” é compreendido como sendo a combinação de um ligando, de configuração molecular conhecida e firmemente ligado (imobilizado) a uma matriz, usualmente uma substância sólida insolúvel.

A matriz de afinidade pode ser constituída por qualquer material que apresente o máximo das propriedades desejadas para este fim e ao qual um ligando biospecífico possa ser covalentemente ligado. Idealmente, deve apresentar características como ser inerte, hidrofílica, não biodegradável, estável química e mecanicamente, resistente a solventes, a condições oxidantes e a variações de pH, apresentar boas condições de fluxo, ausência de efeitos de adsorção não específicos e deve ser económica ⁽²⁰⁾.

A determinação da velocidade de transferência de massa do soluto dentro do leito

cromatográfico e a sua capacidade efectiva de ligação com o ligando, é auxiliada pela caracterização física do suporte, diferenciando o tamanho das partículas, volume e área superficial dos poros. Assim, deve decidir-se se o suporte a usar é produzido pelo próprio utilizador (como foi o caso neste trabalho), ou se se deve usar um suporte disponível comercialmente. Idealmente, o suporte de afinidade deve conter o ligando correcto e ligado optimamente à melhor matriz disponível ⁽²⁰⁾.

1.2.3- Cadeias espaçadoras

As substâncias biológicas apresentam, por vezes, sítios activos que se encontram localizados dentro da molécula o que faz com que adsorventes preparados pela ligação directa de ligandos pequenos à matriz possam exibir baixa capacidade. Tal facto deve-se ao impedimento provocado pela matriz que não permite que as substâncias (macromoléculas) interajam com o ligando ⁽²¹⁾.

Para aumentar o acesso do ligando relativamente às macromoléculas com as quais deve interagir, moléculas de baixo peso molecular ou cadeias espaçadoras são introduzidas entre a matriz e o ligando. Este processo apresenta especial utilidade para ligandos de reduzidas dimensões comparativamente às macromoléculas (figura 1.3) ^{(21) (22)}.

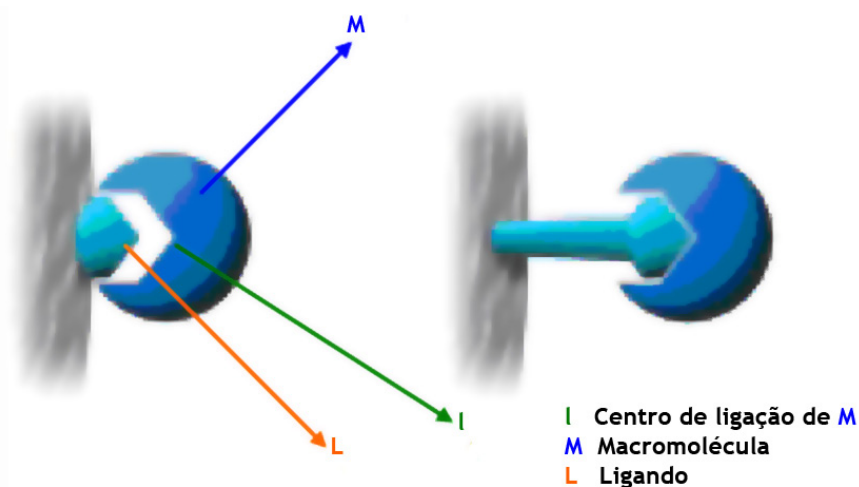


Figura 1.3. Efeitos de uma cadeia espaçadora na interação macromolécula-ligando ⁽¹⁴⁾.

As cadeias espaçadoras são, normalmente, cadeias lineares hidrocarbonadas funcionais nas suas extremidades, o que permite a ligação simultânea ao suporte e ao ligando. As mais frequentemente usadas são a etilenodiamina, a diaminodipropilamina, o 1,6-diaminohexano, o ácido succínico, etc ⁽¹⁶⁾.

O comprimento da cadeia é um aspecto a considerar pois, se a cadeia for muito longa, podem produzir-se efeitos não específicos que reduzem a selectividade da separação, no entanto, se a cadeia for demasiado pequena, não é efectiva e, nesse caso, o ligando falha na ligação à substância da amostra ^{(14) (23)}.

1.2.4- Procedimento de eluição

Para o sucesso da purificação devem escolher-se correctamente as condições de eluição, para quebrar uma interacção de afinidade, sendo este processo tão importante como a escolha das condições de ligação. Um óptimo tampão de eluição deve libertar a substância retida no mínimo volume de eluente, mantendo simultaneamente a integridade do material purificado e a actividade ⁽²²⁾.

As interacções ligando-proteína baseiam-se na combinação de ligações electrostáticas, hidrofóbicas e por pontes de hidrogénio, pelo que se espera que agentes capazes de enfraquecer tais interacções funcionem como eluentes não específicos. O grau de estabilidade da proteína retida juntamente com estes três tipos de interacções vai influenciar a escolha do eluente apropriado. Porém, para haver uma eluição eficaz tem que ser criado um compromisso entre a escolha do eluente (ou combinação de eluentes), de maneira a precaver a desnaturação da proteína purificada ⁽²¹⁾.

Para eluir biomoléculas de colunas de afinidade podem ser utilizados variados métodos, sendo as técnicas mais utilizadas a alteração do pH e da força iónica. Catiões divalentes têm também sido usados como um método de eluição específica para, por exemplo, cinases e desidrogenases. Muitos substratos, cofactores e outros ligandos específicos solúveis são usados para eluir macromoléculas bioespecificamente ⁽²⁴⁾.

1.3 - Monólitos

Actualmente a tecnologia de colunas para cromatografia líquida permite a produção de partículas bem definidas e cada vez menores, acompanhando a diminuição do comprimento e do diâmetro da coluna. No entanto, as colunas constituídas com materiais particulados parecem ter alcançado o seu limite de desempenho nos equipamentos convencionais. Embora tecnicamente seja possível uma maior redução do tamanho das partículas, na prática esta possibilidade torna-se inviável. A diminuição da permeabilidade das colunas compostas por partículas muito pequenas provoca um aumento acentuado da resistência ao fluxo da fase móvel e, conseqüentemente uma considerável queda de pressão ao longo da coluna, resultando em separações de baixa eficiência. Deste modo, novas estratégias têm sido desenvolvidas para a obtenção de colunas mais eficientes ⁽²⁵⁾.

Os monólitos, também denominadas por fases estacionárias monolíticas, representam uma nova geração na separação cromatográfica, com características completamente diferentes dos suportes convencionais ⁽²⁶⁾.

A palavra “monólito” deriva do latim *monolithus* e significa “pedra única”. Esta designação deve-se ao facto das fases estacionárias monolíticas se assemelharem às características porosas destas pedras (figura 1.4) ⁽²⁷⁾.

Apesar de ser um tema de pesquisa bastante actual, a primeira aplicação das fases monolíticas deu-se no início da década de 70, quando Ross e Jefferson utilizaram esponja de poliuretano, como fase estacionária para cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Devido à excessiva dilatação e ao amolecimento com alguns solventes orgânicos, o interesse pelas fases estacionárias monolíticas aumentou bastante ⁽²⁸⁾. Só a partir do ano 2000 é que as fases monolíticas se tornaram mais conhecidas, quando os monólitos de sílica se tornaram disponíveis comercialmente. Desde então, estes materiais têm sido alvo de grande investigação por parte da comunidade científica ⁽²⁹⁾.

Uma fase monolítica é um meio contínuo de separação (fase ou suporte contendo uma “partícula única”), normalmente em formato cilíndrico, possuindo uma estrutura sólida e altamente porosa, de pequenos domínios (esqueletos ou glóbulos) e canais relativamente grandes, que fornecem altas permeabilidades e eficiência da coluna (figura 1.5). A preparação de cilindros monolíticos poliméricos orgânicos é relativamente simples e realizada dentro da própria coluna cromatográfica, através de uma polimerização *in situ* ⁽³⁰⁾.



Figura 1.4- Monólito ⁽²⁷⁾

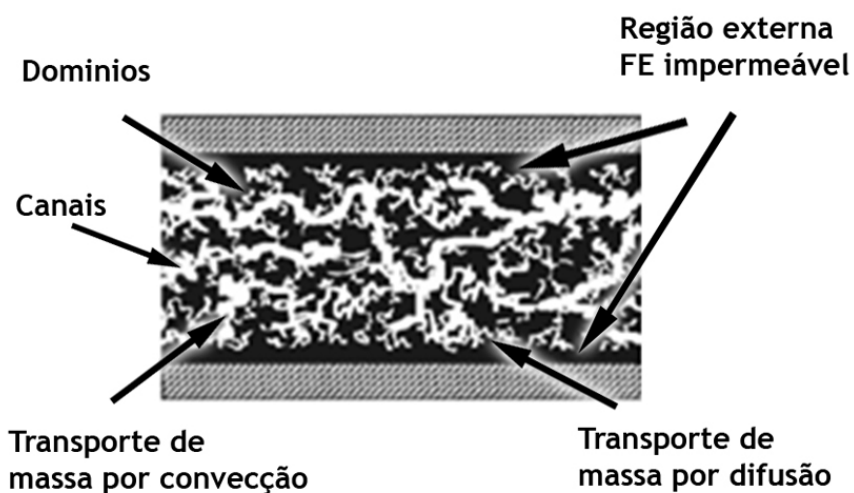


Figura 1.5- Fase estacionária monolítica ⁽³⁰⁾.

A fase móvel passa pela coluna, principalmente através dos canais do monólito, nos quais a estrutura e geometria oferecem uma menor resistência à passagem da fase móvel, em relação aos materiais particulados. Assim, é possível realizar análises sem perdas significativas da eficiência de separação, sendo esta uma das principais vantagens oferecida pelas fases monolíticas, a par de uma redução do tempo de análise, sem comprometer a resolução cromatográfica ⁽³¹⁾.

As fases monolíticas, devido à sua facilidade de incorporarem diferentes grupos durante a sua preparação (moléculas hidrofóbicas, moléculas carregadas, moléculas para interações específicas), têm vindo a demonstrar um grande desenvolvimento no campo da preparação de fases estacionárias. Podem ser classificadas em duas categorias, baseadas em polímeros orgânicos e em sílica, dependendo da natureza do material monolítico ⁽³²⁾.

Os polímeros orgânicos preparados na forma de suportes cromatográficos monolíticos mais conhecidos são o poliestireno-divinilbenzeno, o polimetacrilato e a poliácridamida. Os polimetacrilatos são os mais aplicados, devido à ampla variedade de monómeros funcionais e a fácil derivatização após a polimerização. Uma vantagem associada a estes monólitos é a boa estabilidade química para uma grande faixa de pH (2-12), uma vez que normalmente se realizam separações em condições de pH fora da estabilidade da sílica (2-8) ^{(29) (31)}.

Os suportes cromatográficos convencionais são preparados via polimerização em suspensão. As partículas formadas apresentam uma certa distribuição de tamanhos, pelo que, se torna necessário um processo de peneiração para obter partículas de tamanho uniforme, o que aumenta os custos de produção ⁽²⁹⁾.

Por outro lado, os monólitos são preparados por polimerização em massa, normalmente dentro de uma coluna, que lhes serve de molde. Uma vez removidos os agentes de formação dos poros, o monólito encontra-se formado e pronto para ser usado, não sendo necessárias mais etapas adicionais. Assim, o processo de produção é mais rápido e barato. Após a polimerização ter sido concluída faz-se passar um solvente apropriado através da coluna para remoção dos resíduos e agentes porogénicos. Posteriormente a coluna é seca com a passagem de azoto sendo

derivatizada para o modo cromatográfico de interesse ⁽²⁹⁾.

A funcionalização ou derivatização da fase estacionária monolítica é obtida pela modificação de grupos reactivos da superfície do monólito com reagentes específicos ou pela inserção de monómeros funcionais na superfície dos poros. No primeiro caso, os reagentes são introduzidos na coluna logo após a etapa de preparação do monólito deixando em repouso num local previamente aquecido. Os resíduos são removidos, pela passagem de um solvente apropriado. No segundo caso, a funcionalização é realizada simultaneamente à preparação da matriz monolítica com a adição de um monómero funcional adequado à mistura de polimerização ⁽³²⁾.

O uso de materiais monolíticos porosos para aplicações tais como filtração, HPLC e cromatografia, em que um líquido ou um gás têm que atravessar o meio, requer que o fluxo seja conseguido com uma pressão razoavelmente baixa. Esta depende das propriedades porosas do material.

Estas características de porosidade e fluxo dos monólitos podem ser controladas durante a sua preparação. Variáveis como a temperatura, a composição da mistura de solventes porogénicos e a proporção de monómero “cross-linking” (ligações cruzadas) na mistura de monómeros, permitem controlar o tamanho de poro, de modo a obter um polímero adequado para o fim pretendido. O tipo de iniciador radicalar usado, bem como o tempo de reacção, podem também influenciar o resultado final ^{(33) (34)}.

Temperatura

De um modo geral, quanto maior a temperatura de polimerização, menor será o tamanho dos poros. Este efeito da temperatura pode ser explicado facilmente em termos de taxa de nucleação. O iniciador radicalar decompõe-se a uma determinada temperatura (a partir dos 50 °C) e os radicais resultantes iniciam a polimerização em solução. Os polímeros que se formaram inicialmente rapidamente se tornam insolúveis e precipitam no meio reaccional. A precipitação conduz à formação de núcleos, que vão crescendo à medida que a polimerização decorre, formando glóbulos. Estes glóbulos e os seus “clusters” constituem as unidades morfológicas do polímero macroporoso. Deste modo, temperaturas de reacção maiores levam à formação de um grande número de radicais livres, por decomposição do iniciador, sendo formado um grande número de núcleos em crescimento e, conseqüentemente, de glóbulos. Como o volume de monómero usado é o mesmo para cada polimerização, a formação de um grande número de glóbulos é compensada pelo seu pequeno tamanho. Como o material macroporoso é constituído por matrizes de glóbulos interligados, obtêm-se também pequenos espaços vazios ou poros, se os glóbulos são mais pequenos e numerosos.

A temperatura afecta também a qualidade do solvente ou solvência, que controla a separação de fases de polímeros da solução. Com a excepção de polímeros com baixa temperatura crítica de solução, a mistura de um polímero com o solvente é um processo endotérmico, pelo que, um aumento da temperatura origina dissolução do polímero. Assim, a separação de fases

necessária para a formação da estrutura macroporosa ocorrerá, provavelmente, quando os núcleos atinjam maior peso molecular se a polimerização se processa a temperaturas mais elevadas, pelo que, tanto os núcleos como os espaços entre eles deverão ser maiores. Pode, deste modo, verificar-se um efeito oposto na temperatura, dependendo do solvente usado.

Se for usado um solvente muito pobre, como o dodecanol, o efeito da temperatura é minimizado pelo efeito dominante do solvente porogénico em que ocorre a separação de fases durante a polimerização. Como resultado, em polimerizações em que o dodecanol é o único solvente, o tamanho dos poros aumenta à medida que a temperatura é elevada de 60 para 80 °C. Este facto não se aplica a polimerizações feitas em misturas de dodecanol/ciclohexanol ou dodecanol/tolueno, um solvente muito bom em que o tamanho de poro é novamente controlado pela taxa de nucleação e, portanto, diminui com o aumento da temperatura ⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾.

Solvente porogénico

A separação de fases do núcleo com ligações cruzadas é um pré-requisito para a formação da morfologia macroporosa. A fase do polímero separa-se da solução durante a polimerização devido ao seu limite de solubilidade na mistura, resultante de um peso molecular que excedeu o limite de solubilidade do polímero num dado sistema de solventes ou de insolubilidade resultante das ligações cruzadas.

Assim, polímeros preparados a partir de uma mistura ciclohexanol/dodecanol com uma proporção maior deste último, apresentam poros maiores. Isto resulta da separação de fases (nucleação) ocorrer mais cedo num sistema que contém mais dodecanol, visto ser um solvente mais pobre e, conseqüentemente, um agente precipitante mais potente que o ciclohexanol.

Este efeito é muito pequeno para temperaturas baixas (inferiores a 50 °C), pois a taxa de polimerização a esta temperatura é tão baixa que o tamanho de poro é sempre grande. Em oposição, este efeito do dodecanol é claramente dominante para temperaturas entre 70 e 80 °C, como anteriormente referido.

O efeito de adicionar um solvente melhor, de modo a obter tamanhos de poro menores pode ser facilmente explicado considerando que a separação de fases ocorre na última etapa da polimerização, onde as ligações cruzadas dominam o processo de separação de fases.

A adição de um solvente mais pobre origina que a separação de fases ocorra mais cedo. As partículas precipitam e aglomeram-se numa rede porosa homogénea. Esta nova fase incha com os monómeros porque estes são termodinamicamente muito melhores solventes para o polímero que o solvente porogénico. A concentração local de monómeros nesta rede porosa é maior do que na solução à volta, pelo que a reacção de polimerização ocorre preferencialmente nestes núcleos. Assim, os glóbulos formados são maiores e, conseqüentemente, os espaços entre eles, os poros, também serão maiores.

Quando se usam melhores solventes, estes competem com os monómeros na solvatação dos núcleos, sendo a concentração local de monómeros mais baixa e o tamanho dos glóbulos

menor. Como resultado, polímeros porosos formados em melhores solventes apresentam poros menores ⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾.

Monómero “cross-linking” (ligações cruzadas)

Em contraste com o efeito da temperatura e dos solventes porogénicos que afectam as propriedades porosas do material resultante, mas não a sua composição, as variações da razão monómero/monómero “cross-linking” não apenas induz a formação de diferentes estruturas porosas mas também origina produtos com diferentes composições. Uma proporção elevada do monómero “cross-linking”, o que promove as ligações cruzadas, traduz-se directamente na formação de um polímero mais reticulado nas primeiras etapas do processo de polimerização e, portanto, conduz a uma separação de fases também mais cedo. Embora isto seja similar ao uso de solventes pobres, os núcleos estão mais inter cruzados, o que afecta o seu inchamento com os monómeros, ficando relativamente pequenos em tamanho ⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾.

Deste modo, a estrutura de uma coluna monolítica apresenta características únicas que as distingue dos suportes convencionais.

Durante os últimos anos, as fases estacionárias monolíticas têm sido utilizadas num número cada vez maior de aplicações, o que se deve, essencialmente a ⁽³⁵⁾:

- Enorme quantidade de monómeros disponíveis, possibilitando a produção de uma enorme variedade de monólitos;
- Facilidade com que os monólitos podem ser produzidos *in situ*;
- Estrutura macroporosa dos monólitos, que permite aumentar consideravelmente a transferência de massa;
- Facilidade que os monólitos oferecem de operar a velocidades elevadas de fluxo sem perda de resolução.

Normalmente, os suportes monolíticos para a CA são polimerizados *in situ* e o ligando é depois imobilizado. No entanto, Jungbaeur ⁽³⁶⁾ ⁽³⁷⁾ desenvolveu um método no qual o ligando é ligado a um dos co-monómeros. Assim, o suporte de afinidade é formado *in situ*, sem necessidade de posterior imobilização.

De acordo com este autor, o ligando usado, um péptido, é ligado inicialmente ao co-monómero metacrilto de glicidilo (GMA). A ligação ocorre através dos grupos amino e epóxido de cada um deles, respectivamente. O sucesso desta ligação é influenciado pelas condições usadas na reacção, ou seja, pelo pH, tempo de reacção e uso de diferentes tamanhos de péptidos. Após uma ligação bem sucedida, ocorre, então, a copolimerização com o dimetacrilato de etileno (EDMA).

A utilização deste método permite, adicionalmente, efectuar uma nova imobilização. A combinação dos dois métodos também é importante, uma vez que permite ter um suporte com maior quantidade de ligando para o mesmo volume, traduzindo-se numa separação melhor.

Capítulo 2 - Discussão dos Resultados

2.1- Preâmbulo

Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho, que se encontram divididos em duas partes principais, uma relativa à síntese de aminocianinas e outra à de monólitos.

Assim, na primeira parte, pretendem sintetizar-se monometinocianinas, mais concretamente aminocianinas, que posteriormente vão ser usadas como ligandos em CA. Estas cianinas possuem grupos amino, que permitem a ligação aos grupos epóxidos do GMA. Esta ligação pode ser feita antes da polimerização e, assim, este conjunto GMA-aminocianina funciona como um dos co-monomeros que irá polimerizar posteriormente com o EDMA, ou pode ser feita apenas após a polimerização, no passo de imobilização.

A síntese destas aminocianinas foi tentada por duas abordagens diferentes, ou seja, por redução da nitrocianina e por redução do sal de aminobenzotiazole e posterior condensação para obtenção da aminocianina.

Deste modo, na primeira parte deste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese e caracterização destas aminocianinas bem como dos seus precursores.

A segunda parte reporta-se à síntese do monólito poli(metacrilato de glicidilo-co dimetacrilato de etileno) [poli(GMA-co-EDMA)] através de uma reacção de polimerização entre o GMA e o EDMA, referindo-se as condições usadas e as possíveis consequências no resultado final.

A caracterização espectroscópica dos compostos que foram sintetizados para este trabalho inclui as técnicas de IV, Ultravioleta/Vísivel (UV/VIS) e Ressonância Magnética Nuclear de protão e carbono (^1H RMN e ^{13}C RMN). São ainda, apresentados rendimentos (η %), forma cristalina e ponto de fusão (p.f.). É importante referir que nem todos os compostos foram caracterizados por todas as técnicas anteriormente indicadas.

Por fim, serão apresentadas as principais conclusões, bem como sugestões para a continuação deste trabalho.

2.2- Síntese de Materiais de Partida

2.2.1- Precursores de sais quaternários de amônio

2.2.1.1- Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (2)

Alguns dos precursores das cianinas foram sintetizados a partir do 2-metilbenzotiazole 1. Este reagente foi adquirido comercialmente, não tendo sido feita qualquer purificação prévia.

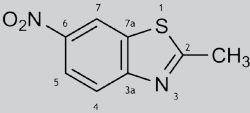
O 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2** foi sintetizado segundo o método descrito por Mizuno e Adachi ⁽³⁸⁾, tendo-se substituído o ácido nítrico fumegante por ácido nítrico a 65%. Como é referido na literatura, a nitração ocorre principalmente no carbono 6.

No espectro de IV, observam-se duas bandas fortes a 1514 e 1334 cm^{-1} , características do grupo nitro.

Tanto o espectro de ^1H RMN, como o espectro de ^{13}C RMN apresentam todos os sinais esperados. No espectro de protão há que salientar o acoplamento a quatro ligações, entre os protões 5 e 7, verificando-se um duplete para o protão 7 com uma constante de acoplamento de 2,3 Hz, devido ao acoplamento a larga distância com o protão 5 e um duplo duplete para o protão 5, com constantes de 2,3 e 6,8 Hz. A presença do grupo nitro desblinda estes protões, afastando o desvio químico para valores superiores.

O rendimento, dados físicos e espectroscópicos do 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2** encontram-se resumidos na tabela 2.1.

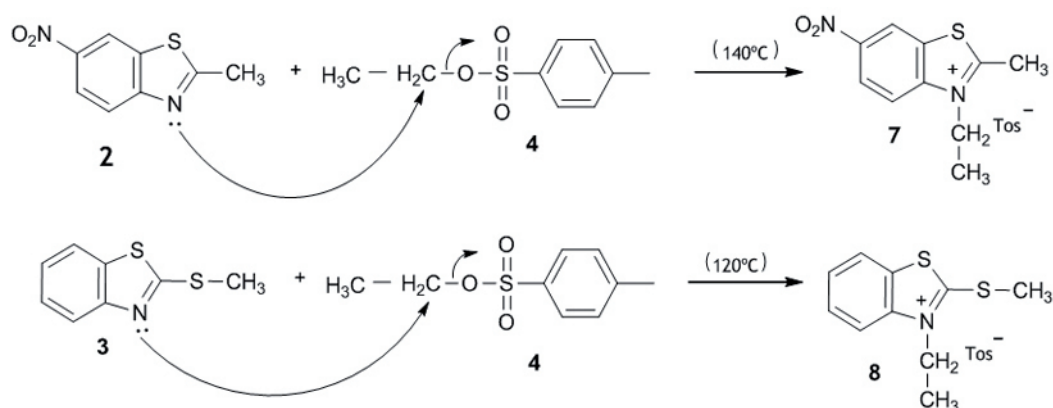
Tabela 2.1- Rendimento, dados físicos e espectroscópicos do 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2**

Composto	
Nº	2
η (%)	71
p.f. (°C); (lit.) ^{ref} forma cristalina	164-165; (164,5-165, ⁽⁷⁾ ⁽³⁹⁾) Cristais agulha amarelo pálido
$\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	1573 (m, C-C _{arom}) 1514, 1334 (F, NO ₂)
^1H RMN (250 MHz; δ em ppm; J em Hz) (DMSO-d ₆)	2,87 (3H, s, CH ₃) 8,06 (1H, d, J=9,0 Hz, 4-CH) 8,29 (1H, dd, J=6,8; 2,3Hz, 5-CH) 9,09 (1H, d, J=2,3 Hz, 7-CH)
^{13}C RMN δ (em ppm) (DMSO-d ₆)	19,9 (CH ₃) 118,8 (CH _{Arom}) 121,0 (CH _{Arom}) 121,9 (CH _{Arom}) 136,0 (C _{Arom}) 143,1 (C _{Arom}) 155,8 (C _{Arom}) 173,7 (C _{Arom})

2.2.2- Síntese de sais quaternários de amónio

A síntese dos sais quaternários de amónio tem especial relevância neste trabalho, uma vez que são os precursores das cianinas.

Deste modo, os sais quaternários de amónio **7** e **8** são obtidos pela reacção do 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2** e do 2-(metiltio)benzotiazole **3** com um reagente alquilante adequado, neste caso o *p*-toluenossulfonato de etilo **4**, (esquema 2.1).



Esquema 2.1- Síntese dos sais quaternários de amónio **7** e **8**

Estes sais quaternários podem reagir com outros compostos ou mesmo com compostos equivalentes possibilitando, à partida, sintetizar um sem número de cianinas, simétricas ou assimétricas, com diferentes cadeias poliméticas, quer no seu tamanho quer na presença de substituintes ou não.

Geralmente a síntese dos sais quaternários de amónio **7** e **8** é possível por dois métodos distintos. No primeiro, o mais frequentemente usado, recorre-se à fusão *in situ* dos compostos heterocíclicos **2** e **3** com o agente alquilante **4**, usando-se o produto resultante imediatamente no passo seguinte sem prévio isolamento. Na segunda via, procede-se ao refluxo dos compostos **2** e **3**, isoladamente, com um reagente alquilante, um iodoetano, na presença de um solvente, normalmente, acetonitrilo. O produto precipita geralmente no meio reaccional. Este último método conduz a produtos com maior grau de pureza, apresenta contudo a desvantagem de ser muito mais demorado, podendo a reacção demorar vários dias.

No que se refere a rendimentos, o método que usa refluxo num solvente é mais eficiente, obtendo-se um produto mais puro, uma vez que precipita mais facilmente no meio reaccional ⁽⁴⁰⁾.

Na tabela 2.2 encontram-se descritos os dados físicos e espectroscópicos bem como os rendimentos obtidos para estes sais quaternários de amónio.

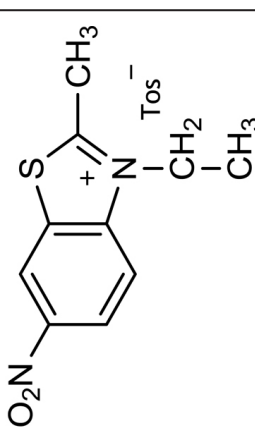
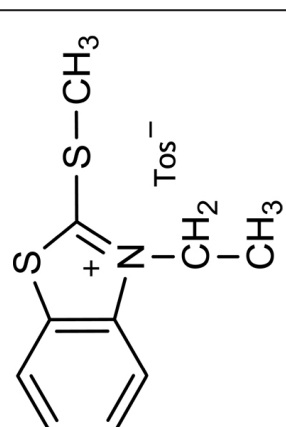
No espectro de IV do tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io **7**, observa-se duas bandas, uma a 1344 e a 1510 cm^{-1} , características do grupo nitro, enquanto que o espectro de IV do tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io **8**, apresenta bandas com maior intensidade a 1168, 1117, 2917 e 2986 cm^{-1} .

Os espectros de ^1H RMN realizados para os estes compostos apresentam todos os picos esperados. No espectro de protão do composto **7**, tal como no espectro do seu precursor

(2-metil-6-nitrobenzotiazole) **2**, verifica-se um acoplamento a quatro ligações para os prótons 5 e 7, verificando-se um duplete para o próton 7 com uma constante de 2,5 Hz, devido ao acoplamento a larga distância com o próton 5 e um duplo duplete para o próton 5, com constantes de 2,5 e 7,0.

O ponto de fusão determinado para o tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io é de 223,8-225,3 °C e para o tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io 142,1-146,3 °C. Verifica-se um grande intervalo de fusão para o tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io (4,2 °C), o que indica que o composto poderá apresentar algum contaminante.

Tabela 2.2- Rendimento, dados físicos e espectroscópicos do tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io 7 e do Tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io 8

Nº	Composto	η (%)	p.f. (°C) (forma cristalina)	$\nu_{\text{máx}}$ (cm ⁻¹)	¹ H RMN (δ em ppm; <i>J</i> em Hz) (DMSO-d ₆)	¹³ C RMN (δ em ppm) (DMSO-d ₆)
7		71	223,8-225,3 (Cristais violeta)	1344 (m, NO ₂) 1510 (f, NO ₂) 1170 (F) 2922 (f)	1,45 (3H, t, <i>J</i> =7,3 Hz, NCH ₂ CH ₃) 2,27 (3H, s, CH ₃ _{3Tos}) 3,27 (3H, s, CH ₃) 4,80 (2H, q, <i>J</i> =7,3 Hz, NCH ₂ CH ₃) 7,10 (2H, d, <i>J</i> =8,0 Hz, CH _{arom}) 7,46 (2H, d, <i>J</i> =8,0 Hz, CH _{arom}) 8,63 (1H, d, <i>J</i> =9,0 Hz, 4-CH) 8,67 (2H, dd, <i>J</i> =7,0;2,5 Hz, 5-CH) 9,42 (1H, d, <i>J</i> =2,5 Hz, 7-CH)	13,0 (NCH ₂ CH ₃) 17,3 (CH _{3Tos}) 20,7 (CH ₃) 45,4 (NCH ₂ CH ₃) 117,9 (CH _{arom}) 121,3 (CH _{arom}) 124,2 (CH _{arom}) 125,4 (CH _{arom}) 128,1 (CH _{arom}) 130,2 (C _{arom}) 135,9 (C _{arom}) 137,9 (C _{Tos}) 145,2 (C _{Tos}) 156,8 (C _{arom}) 174,6 (C _{arom})
8		78	142,1-146,3 (Cristais brancos)	1168 (F) 1117 (m) 1009 (m) 2917 (f) 2986 (f)	1,42 (3H, t, <i>J</i> =7,0 Hz, NCH ₂ CH ₃) 2,28 (3H, s, CH ₃ _{3Tos}) 3,12 (3H, s, CH ₃) 4,65 (2H, q, <i>J</i> =7,0 Hz, NCH ₂ CH ₃) 7,10 (2H, d, <i>J</i> =8,0 Hz, CH _{arom}) 7,47 (2H, d, <i>J</i> =8,0 Hz, CH _{arom}) 7,72 (1H, t, <i>J</i> =7,3 Hz, 6-CH) 7,84 (1H, t, <i>J</i> =7,5 Hz, 5-CH) 8,24 (1H, d, <i>J</i> =8,5 Hz, 7-CH) 8,40 (1H, d, <i>J</i> =8,3 Hz, 4-CH)	11,8 (NCH ₂ CH ₃) 17,7 (CH _{3Tos}) 20,4 (CH ₃) 45,0 (NCH ₂ CH ₃) 113,9 (C _{arom}) 115,9 (CH _{arom}) 123,6 (CH _{arom}) 124,1 (CH _{2arom}) 125,2 (CH _{arom}) 126,8 (CH _{2arom}) 127,1 (CH _{arom}) 128,7 (C _{Tos}) 130,6 (C _{arom}) 135,5 (C _{arom})

2.3- Síntese de monometinocianinas funcionalizadas

2.3.1- Nitrocianinas

O método utilizado para a síntese de cianinas funcionalizadas com o grupo nitro foi o do tioalquilo ⁽⁴¹⁾ ⁽⁴⁾, amplamente descrito na literatura e usado em trabalhos anteriores para sintetizar compostos análogos. A condensação é feita entre dois sais de amónio quaternários, em que um possui um bom grupo de saída (o grupo tioalquilo) e o outro, um grupo metilo reactivo. Este método apresenta a grande vantagem de permitir a síntese tanto de cianinas simétricas como assimétricas, com rendimentos aceitáveis.

Para a síntese dos sais quaternários utilizou-se o processo de fusão, no qual os compostos heterocíclicos com o grupo tioalquilo e metilo, respectivamente, e o agente alquilante, o *p*-toluenossulfonato de etilo, são aquecidos a uma temperatura superior a 140 °C. Como durante a fusão, por vezes, começa a formar-se cianina e visto que os sais são sintetizados em conjunto, estes não são isolados, sendo usados imediatamente, sem qualquer purificação no passo seguinte. Assim, não foi possível caracterizar estes sais quando foram obtidos por este método.

De um modo geral, seguiu-se o procedimento descrito na literatura ⁽⁴¹⁾, tendo-se feito algumas alterações, baseadas na informação obtida por cromatografia em camada fina (c.c.f.) das alíquotas retiradas das misturas reaccionais, nomeadamente no que se refere ao tempo de reacção, quer da formação dos sais quaternários, quer na condensação das cianinas.

A utilização de anéis possuidores de um grupo nitro em alternativa ao grupo amino, apresenta a vantagem de diminuir o número de passos e, conseqüentemente, potenciar o rendimento final da síntese da aminocianina.

A utilização do grupo amino implica a sua protecção, antes da síntese da cianina, e a sua posterior desprotecção, devido ao facto de poder ser alquilado pelos agentes alquilantes utilizados para a síntese dos sais de amónio quaternários. O grupo nitro, por sua vez, ao não sofrer qualquer tipo de alquilação, apenas necessita de ser reduzido ao grupo amino, no final da síntese. Adicionalmente, o grupo amino tem quase sempre origem na redução do grupo nitro correspondente.

Assim, a síntese de nitrocianinas por esta abordagem consistiu fundamentalmente numa reacção “one pot synthesis”. Em primeiro lugar efectuou-se a síntese dos sais de amónio por fusão dos anéis que contêm o grupo tioalquilo e o grupo metilo com o agente alquilante adequado. Por análise cromatográfica, c.c.f., verificou-se a conversão dos compostos de partida com formação dos dois sais com um factor de retardação (*R_f*- Retardation factor) muito baixo. Deste modo, obtiveram-se, em mistura, o tosionato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io **7** e o tosionato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io **8**, obtidos por fusão do 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2** e 2-(metiltio)benzotiazole **3** com *p*-toluenossulfonato de etilo **4**. Estes sais de amónio quaternários, como já foi referido, não foram isolados, sendo imediatamente refluxados em piridina, tendo-se obtido a nitrocianina **5**.

Na tabela 2.3 encontram-se descritos o rendimento, os dados físicos e espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto.

No espectro de IV da nitrocianina **5**, observa-se uma banda forte a 1465 e 1526 cm^{-1} , respectivamente e uma banda média a 1328 cm^{-1} , características do grupo nitro.

O espectro de ^1H RMN apresenta, tal como os espectros dos precursores **2** e **7**, um acoplamento a quatro ligações para os prótons 5 e 7. Deste modo, observa-se um duplete para o próton 7 a 9,21 ppm, com uma constante de acoplamento de 2,5 Hz e um duplo duplete a 8,49 ppm, para o próton 5, com constantes de acoplamento de 2,0 e 6,5 Hz. A presença do grupo desblinda estes prótons, desviando o desvio químico para valores superiores.

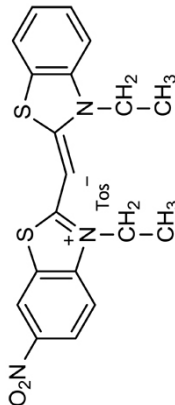
O espectro de ^{13}C RMN apresenta todos os picos esperados, para carbonos quaternários, terciários e secundários.

No que diz respeito ao espectro de UV/Vis, verifica-se que a nitrocianina **5** apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ a 439 nm.

Em relação ao rendimento obtido na síntese da nitrocianina **5**, este foi de 51%. Uma explicação para este valor não ser mais elevado está relacionada com o próprio processo de fusão. Neste, como já se referiu os dois sais são sintetizados ao mesmo tempo, contudo o tempo de reacção é significativamente diferente para ambos, o que se verificou quando foram sintetizados em separado. Assim, teve de se encontrar um compromisso entre ficar ainda algum material de partida por reagir, ou o sal formado mais rapidamente começar a decompor-se ou a formar produtos secundários dado o excesso de tempo de reacção. Este facto foi observado por análise cromatográfica (c.c.f), quando se faz o acompanhamento desta reacção.

Uma forma de potenciar o rendimento seria efectuar a troca do contra-íon tosilato por iodeto no final da reacção de condensação, facilitando a precipitação das cianinas, contudo, dado que a cianina se tornaria bastante mais insolúvel, dificultaria o passo seguinte, a redução, que exige a dissolução do composto no solvente utilizado. Assim, optou-se por isolar a nitrocianina com o contra-íon tosilato, preterindo o rendimento.

Tabela 2.3 - Rendimento dados físicos e espectroscópicos da nitrocianina 5

N°	Composto	η (%)	P.f. (°C) (forma cristalina)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (solvente)	$\nu_{\text{máx}}$ (cm ⁻¹)	¹ H RMN (δ em ppm; J em Hz) (DMSO-d ₆)	¹³ C RMN (δ em ppm) (DMSO-d ₆)
5		51	309,3-309,9 (312-314 (7) (39)) (Cristais cor de laranja)	439 (etanol)	1526 (F, C-C _{Arom}) 1465 (F, NO ₂) 1328 (m, NO ₂)	1,39 (6H, t, J=3,4 Hz, NCH ₂ CH ₃) 2,27 (3H, s, CH _{3Tos}) 4,74 (4H, q, J=8,0 Hz, NCH ₂ CH ₃) 6,86 (1H, s, α -CH) 7,10 (2H, d, J=7,8 Hz, CH _{Tos}) 7,47 (2H, d, J=8,3 Hz, CH _{Tos}) 7,58 (1H, t, J=7,8 Hz, 6,-CH) 7,75 (1H, t, J=7,3 Hz, 5,-CH) 8,01 (1H, d, J=6,0 Hz, 4,-CH) 8,03 (1H, d, J=2,3 Hz, 7,-CH) 8,33 (1H, d, J=8,0 Hz, 4-CH) 8,49 (1H, dd, J=6,5; 2,5 Hz, 5-CH) 9,21 (1H, d, J=2,5 Hz, 7-CH)	12,1 (NCH ₂ CH ₃) 12,5 (NCH ₂ CH ₃) 20,7 (CH _{3Tos}) 42,1 (NCH ₂ CH ₃) 42,2 (NCH ₂ CH ₃) 83,8 (α -CH) 113,6 (CH _{Arom}) 114,3 (CH _{Arom}) 120,1 (CH _{Arom}) 124,0 (CH _{Arom}) 124,5 (CH _{Arom}) 125,6 (CH _{Tos}) 125,7 (CH _{Arom}) 126,2 (C _{Arom}) 128,1 (CH _{Tos}) 129,1 (CH _{Arom}) 137,7 (C _{Arom}) 139,8 (C _{Arom}) 143,5 (C _{Arom}) 144,7 (C _{Arom}) 145,7 (C _{Arom}) 162,6 (C _{Arom}) 162,8 (C _{Arom})

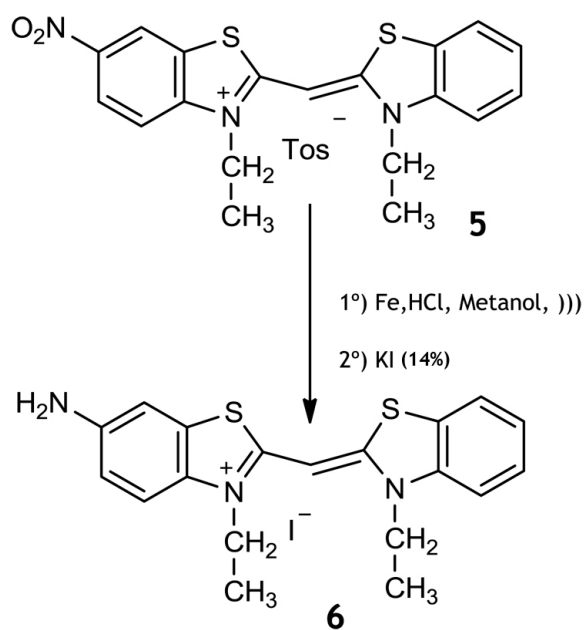
2.3.2- Aminocianinas

As aminocianinas foram obtidas por dois métodos diferentes, através da redução da nitrocianina formada e por redução do sal tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io **7**, sendo posteriormente efectuada a condensação com o tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io **8**, usando a piridina, sendo os sais de amónio quaternários sintetizados individualmente.

2.3.2.1- Redução da nitrocianina

Após obtenção e purificação da nitrocianina, procedeu-se, então, à sua redução, usando agentes redutores diferentes:

No primeiro, a redução foi efectuada com ferro/ácido clorídrico, em metanol e recorrendo a ultra-sons ⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾ (esquema 2.2), no segundo caso, utilizou-se hidrato de hidrazina como agente redutor e níquel Raney como catalisador, sendo a reacção efectuada sob refluxo em etanol ou etilenoglicol, ⁽⁴⁴⁾ (esquema 2.3).



Esquema 2.2- Síntese da aminocianina **6**, pela redução da nitrocianina com ferro/ácido clorídrico em metanol

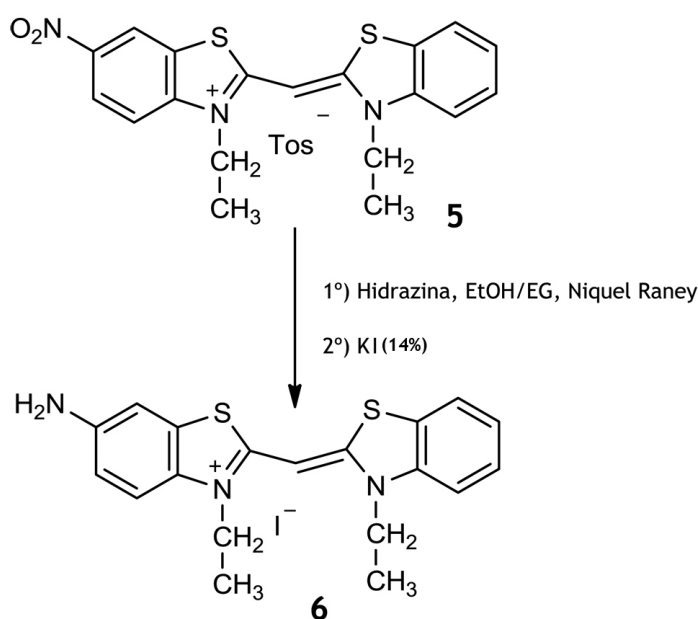
Constatou-se que, usando o primeiro método ⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾ é possível reduzir a nitrocianina a aminocianina, no entanto, obtém-se rendimentos muito baixos (1-3%). Este método foi adaptado de um utilizado para reduzir o 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2**. Para este composto esta reacção demora 40 min com um rendimento de 92%. Contudo, quando se tenta adaptar para a redução de nitrocianinas o tempo aumenta e o rendimento decresce consideravelmente. Foram efectuadas várias reacções onde se fez variar a quantidade de ferro, de ácido e o uso ou não dos ultra-sons, de maneira a tentar otimizar o processo (tabela 2.4).

Tabela 2.4- Diferentes condições usadas na redução das nitrocianinas

	Reacção 1	Reacção 2	Reacção3	Reacção 4	Reacção 5
Nitrocianina (mmol)	1	1	1	1	1
HCl (mL)	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4
Ferro (g)	0,34	0,63	1,35	1,03	0,7
Ultra-sons t (h)	5	5,5	5	13	-
Sob agitação t (h)	-	-	-	-	86
Observações (redução)	✓	✓	✓	✓	✗
Rendimento (%)	≈1	≈1	≈3	≈3	-

Concluiu-se que, para as diferentes condições usadas, o rendimento permanece inalterado e nalguns casos, nem se dá a redução.

A redução das nitrocianinas pelo segundo método ⁽⁴⁴⁾ foi realizada usando hidrato de hidrazina/níquel Raney e, como solventes, **etanol** ou **etilenoglicol**, como já foi referido (esquema 2.3).



Esquema 2.3- Síntese da aminocianina 6, pela redução da nitrocianina

As reacções onde foi usado **etanol** como solvente, deram origem a um produto impuro que foi separado por cromatografia em coluna (diclorometano/metanol), tendo-se verificado por análise espectroscópica (¹H RMN) que os compostos separados não eram o produto desejado. A utilização deste solvente, de menor ponto de ebulição, facilitaria a precipitação do produto formado, já que a aminocianina é muito mais solúvel que a análoga com o grupo nitro.

Nas reacções onde foi usado o **etilenoglicol**, obteve-se um sólido que, numa primeira análise, por ¹H RMN, se veio a verificar ser a aminocianina 6 desejada. Este resultado foi posteriormente confirmado por outras técnicas tais como IV e ¹³C RMN.

Assim, para a síntese da aminocianina **6** por este segundo processo, com rendimentos aceitáveis, constatou-se serem essenciais os seguintes factores:

- Uso, como precursor, da nitrocianina **5**, com o contra-íão tosilato, e não da correspondente na forma de iodeto, visto se ter verificado não se conseguir dissolver esta última em quantidades razoáveis em qualquer um dos vários solventes experimentados;
- Uso do etilenoglicol adequado para solubilizar quase totalmente a nitrocianina **5**, numa proporção mínima de 20 mL de solvente para 1 mmol de composto;
- Necessidade de proceder à troca do contra-íão tosilato por iodeto de modo a conseguir-se isolar a aminocianina.

Tendo em consideração todos estes pontos, obteve-se a aminocianina **6** com um rendimento de 23%, na forma de cristais castanhos. Na tabela 2.5 encontram-se descritos o rendimento, os dados físicos e espectroscópicos obtidos na caracterização deste corante.

O espectro de ^1H RMN da aminocianina **6** apresenta, tal como os seus precursores, um acoplamento a quatro ligações para os protões 5 e 7. Assim, observa-se um duplete para o protão 7 a 7,22 ppm, com uma constante de acoplamento de 2,0 Hz e um duplo duplete a 7,08 ppm, para o protão 5, com constantes de acoplamento de 9,0 e 2,0 Hz. A presença do grupo amino, de modo semelhante ao que se passa com o grupo nitro, desblinda estes protões, desviando o desvio químico para valores mais altos.

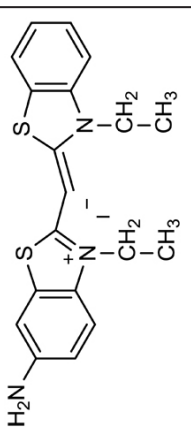
Pode ainda referir-se que a troca do contra-íão foi totalmente efectuada, pois não se observa nem duplicação de sinais nem picos atribuídos ao tosilato.

O espectro de IV apresenta as bandas típicas de uma amina a 3441, 3218 e 1603 cm^{-1} .

No espectro de UV/Vis observa-se, para esta cianina, $\lambda_{\text{máx}}=431$ nm.

Em relação ao ponto de fusão, o seu valor foi determinado e é de 261,2-263,8 °C, este valor difere significativamente do valor das referências, 203-204 °C ⁽⁷⁾ ⁽³⁹⁾. Dada esta discrepância de valores e visto ainda haver alguma desta cianina, sintetizada por outros elementos deste grupo de investigação, foi também determinado para ela o seu ponto de fusão, sendo 258,5-259 °C.

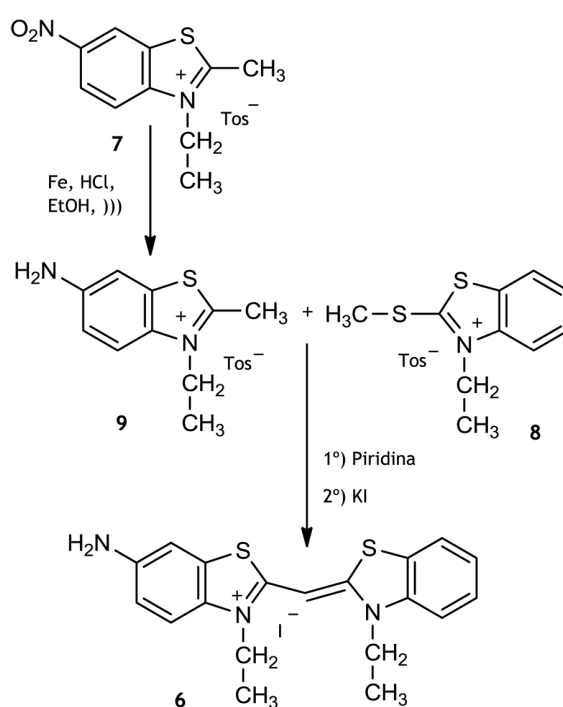
Tabela 2.5- - Rendimento, dados físicos e espectroscópicos da aminocianina 6

N°	Composto	η (%)	P.f. (°C) (forma cristalina)	λ_{max} (nm) (solvente)	ν_{max} (cm ⁻¹)	¹ H RMN (δ em ppm; J em Hz) (DMSO-d ₆)	¹³ C RMN (δ em ppm) (DMSO-d ₆)
6		23	261,2-263,8 (202-204 (7), (39)) (Cristais castanhos)	431 (etilenoglicol/ etanol 1/100)	3441, 3218 (m, NH ₂) 1603 (f, NH ₂)	1,34 (6H, t, J=5,8 Hz, NCH ₂ CH ₃) 3,95 (2H, sl, NH ₂) 4,60 (4H, q, J=4,8 Hz, NCH ₂ CH ₃) 6,59 (1H, s, α -CH) 7,08 (1H, dd, J=9,0; 2,0 Hz, 5, -CH) 7,22 (1H, d, J=2,0 Hz, 7, -CH) 7,64 (1H, t, J=8,2 Hz, 6, -CH _{arom}) 7,69 (1H, d, J=9,3 Hz, 4, -CH) 7,76 (1H, t, J=8,0 Hz, 5-CH _{arom}) 7,81 (1H, d, J=8,5 Hz, 4-CH _{arom}) 8,14 (1H, d, J=7,8 Hz, 7-CH _{arom})	12,1 (NCH ₂ CH ₃) 12,6 (NCH ₂ CH ₃) 41,2 (NCH ₂ CH ₃) 41,7 (NCH ₂ CH ₃) 81,1 (α -CH) 105,6 (CH _{arom}) 113,0 (CH _{arom}) 114,5 (CH _{arom}) 115,7 (CH _{arom}) 123,3 (CH _{arom}) 124,4 (CH _{arom}) 124,6 (C _{arom}) 126,7 (C _{arom}) 128,4 (CH) 130,2 (C _{arom}) 139,9 (C _{arom}) 147,4 (C _{arom}) 158,6 (C _{arom}) 159,2 (C _{arom})

2.3.2.2- Redução de sais quaternários de amónio

A síntese de aminocianinas pela redução do grupo nitro da nitrocianina já formada, tem como principal vantagem a diminuição do número de passos, uma vez que, o grupo nitro ao não sofrer qualquer tipo de alquilação, apenas necessita de ser reduzido ao grupo amino, no final da síntese.

Pela via dos sais quaternários de amónio isolados pretendeu-se obter uma aminocianina por um método diferente. Este método consiste na redução do tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazole **7**, para o efeito, são usados etanol, HCl, ferro, recorrendo-se a ultra-sons ⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾ (esquema 2.4).



Esquema 2.4- Síntese da aminocianina **6**, por redução de sais quaternários de amónio

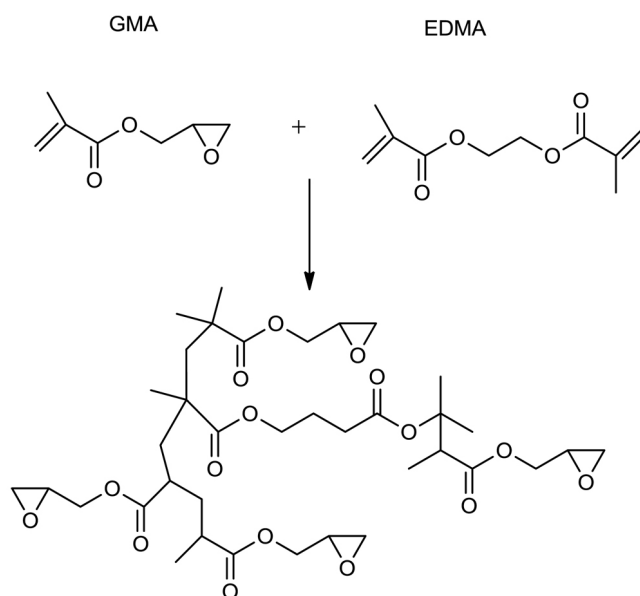
Com este método não se conseguiu isolar a aminocianina, apesar de se observar a sua formação por c.c.f., juntamente com uma panóplia de produtos secundários. Este método, já ensaiado anteriormente, como referido no ponto anterior, para a redução da aminocianina, revela-se apenas eficaz para compostos análogos aos descritos na literatura, ou seja, para compostos heterocíclicos como o grupo nitro. A redução do 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2** já deveria conduzir a bons resultados, contudo o composto obtido não serve para o objectivo deste trabalho, já que, ao possuir um grupo amina, este seria também sujeito a alquilação aquando da formação do sal de amónio quaternário.

2.4- Síntese de Monólitos

2.4.1- Síntese dos monólitos poli(GMA-co-EDMA)

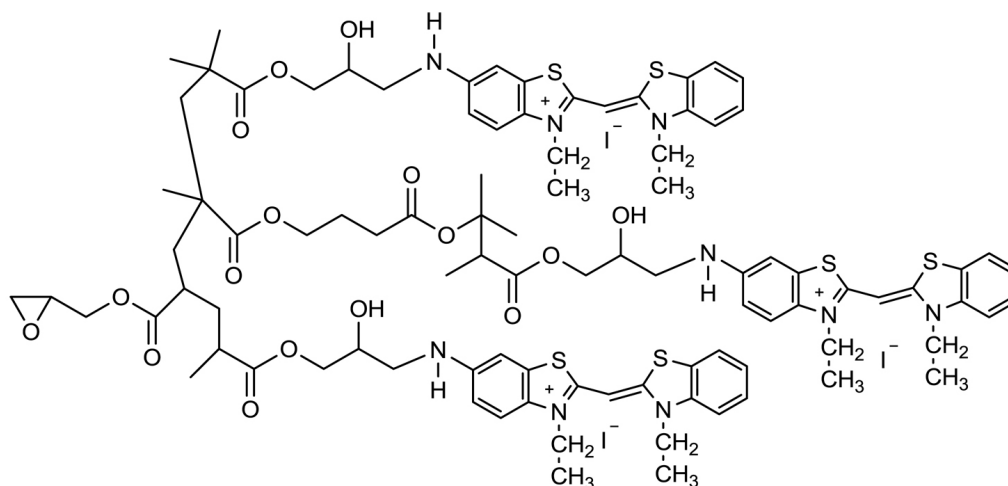
As características de porosidade e fluxo dos monólitos, ou seja, o tamanho dos seus poros, podem ser controladas durante a sua preparação e dependem de variáveis como a temperatura, a composição da mistura de solventes porogénicos, proporção de monómero “cross-linking” (ligações cruzadas) na mistura de monómeros e o tipo de iniciador usado, como já foi referido anteriormente (Introdução) ^{(31) (33) (34) (45)}.

Assim, de seguida, ir-se-á proceder à análise e discussão dos resultados obtidos nas várias tentativas de síntese do monólito poli(GMA-co-EDMA), obtidos por polimerização do GMA e EDMA. A reacção, bem como a estrutura do monólito sintetizado, apresentam-se no esquema 2.5.



Esquema 2.5- Estrutura do monólito sintetizado poli(GMA-co-EDMA) ⁽³²⁾

A opção por este tipo de polímero está relacionada com a posterior aplicação destes como fase estacionária para cromatografia de afinidade para purificação de biomoléculas terapêuticas, usando aminocianinas como ligandos. O grupo epóxido do GMA possibilita a ligação ao ligando, neste caso uma aminocianina, através do grupo amino deste (esquema 2.6).



Esquema 2.6 - Ligação da aminocianina (ligando) ao grupo epóxido do monólito adaptado (37)

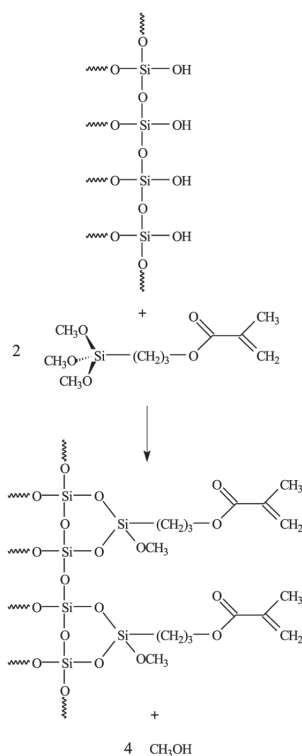
2.4.1.1- Pré-tratamento da coluna

Este trabalho surge no seguimento do trabalho iniciado no âmbito do Projecto de Licenciatura em Química Industrial ⁽⁴⁶⁾, onde foram iniciados estudos de síntese de monólitos em diferentes condições e proporções de reagentes. Estes monólitos foram sintetizados em colunas descartáveis de plástico. Um dos problemas que se verificou na altura foi a não aderência do monólito às paredes da coluna. Assim, ao utilizar estas fases estacionárias para ensaios de cromatografia, tanto na imobilização do ligando como na passagem da mistura a separar e do eluente criar-se-iam caminhos preferenciais para a passagem destes, que falseariam os resultados obtidos.

De modo a colmatar este problema, neste trabalho foram utilizadas colunas de vidro que foram sujeitas a um pré-tratamento com um agente silanizante, o hexametildissilano e, posteriormente, o 3-(trimetoxissilil)propilmetacrilato, com o objectivo de aumentar a aderência do monólito formado às paredes da coluna na qual foi sintetizado.

Este pré-tratamento inicia-se com a lavagem da coluna com uma base forte (NaOH), em refluxo, durante 30 min, seguida de uma lavagem com ácido (HCl), igualmente em refluxo, durante o mesmo tempo. Estas lavagens permitem que os grupos siloxanos da superfície interna da coluna sejam hidrolisados, aumentando a densidade de grupos silanóis, que, por sua vez, servirão como “âncoras” para reacções subsequentes. Posteriormente faz-se passar o agente silanizante bifuncional, o hexametildissilano ou o 3-(trimetoxissilil)propil metacrilato, em acetona (50% v/v), em refluxo, durante 12h. Os resíduos são removidos por lavagem da coluna com metanol, em refluxo (30 min). Devido a este tratamento, ligações do tipo $\equiv\text{Si-O-Si-C}\equiv$ são formadas entre as paredes da coluna, ficando os grupos metacrilato reactivos disponíveis para posterior fixação da matriz monolítica à parede da coluna, durante a reacção de polimerização (esquema 2.7) ^{(47) (48)}.

Após a realização deste pré-tratamento da coluna, dá-se, então, início à síntese dos monólitos.

Esquema 2.7- Esquema da reacção de modificação das paredes da coluna ⁽⁴⁸⁾

2.4.1.2- Polimerização do GMA com EDMA com formação do monólito poli(GMA-co-EDMA)

Os iniciadores radiculares usados nas reacções de polimerização foram o peróxido de benzoílo (BPO) e o azobisisobutironitrilo (AIBN), numa proporção de 1% do peso dos monómeros. Normalmente, o iniciador usado é o AIBN, contudo, o uso deste para temperaturas acima dos 50 °C conduz a uma reacção fortemente exotérmica, aumentando substancialmente a temperatura da reacção, acelerando a polimerização e causando uma rápida decomposição do iniciador, acompanhada de uma libertação violenta de azoto, conduzindo a monólitos com uma estrutura irregular. Quando se usam volumes maiores, acima de 10 mL, a utilização do AIBN conduz a polímeros com uma estrutura irregular, não se conseguindo produzir um material homogéneo. A utilização do BPO apresenta vantagens já que este se decompõe a temperaturas mais altas e produz menos quantidades de produtos laterais gasosos ⁽⁴⁹⁾.

A concentração de iniciador também é um factor a ter em conta na síntese de monólitos, uma vez que o aumento da concentração de iniciador aumenta a taxa de polimerização, resultando na separação de fases tardia. Este fenómeno conduz a núcleos de pequena dimensão e, portanto, à formação de glóbulos resultando na diminuição do tamanho dos poros. Um aumento do teor de iniciador de 0,5% para 1,5% em peso de monómeros, resulta numa diminuição do tamanho dos poros ⁽³³⁾.

No presente trabalho, a quantidade de iniciador usada, tanto para o AIBN, como para o BPO, foi de 1% do peso de monómeros. O volume total de reagentes usados para a preparação

dos monólitos foi de 2-5 mL, pelo que se esperaria obter sempre polímeros homogêneos, independentemente do iniciador usado. Por análise da tabela 2.6, verifica-se que o tipo de iniciador não alterou a estrutura do monólito obtido.

As misturas reaccionais, após a adição da mistura de monómeros, mistura de solventes e iniciador, foram colocados durante 20 min nos ultra-sons, de modo a torná-las homogêneas.

Em seguida, estas misturas foram desarejadas de modo a retirar o oxigénio, já que este actua como supressor dos radicais livres. O processo de desarejamento consistiu em fazer passar azoto gasoso, durante 15 a 20 min, dentro da coluna onde se processou a reacção, mantendo posteriormente, durante todo o tempo da reacção, um balão de borracha cheio de azoto sempre em comunicação com esta.

Como controlo, experimentou-se fazer a reacção sem proceder a este desarejamento e, como seria de esperar, não se verificou polimerização. O mesmo se observou quando, acidentalmente, este balão rebentava durante o estágio inicial da reacção, ou seja as primeiras 3 a 4 h.

A temperatura utilizada para a polimerização foi de 50 °C, com excepção das primeiras duas reacções, em que não houve um controlo eficaz e esta subiu para valores maiores. A relação monómero/solvente (40/60) foi também mantida constante. A manutenção destas duas condições fixas deveu-se ao facto de estas já terem sido optimizadas em estudos anteriores⁽⁴⁶⁾. É também importante salientar que o tempo de reacção usado inicialmente foi de 48 h, tendo, igualmente em conta os resultados obtidos quando se usaram as colunas descartáveis de plástico⁽⁴⁶⁾. Em ensaios posteriores, experimentou-se reduzir o tempo para metade desse valor, obtendo-se resultados semelhantes, pelo que se poderá dizer que a reacção de polimerização se completa nas 24 h.

Na tabela 2.6 resumem-se as condições usadas em cada uma das reacções efectuadas para a obtenção do monólito poli(GMA-co-EDMA).

Todas as proporções apresentadas são volumétricas.

Tabela 2.6- Condições usadas na síntese dos monólitos poli(GMA-co-EDMA).

	Monólito 1	Monólito 2	Monólito 3	Monólito 4*	Monólito 5	Monólito 6*	Monólito 7	Monólito 8*	Monólito 9	Monólito 10*	Monólito 11	Monólito 12
%Ciclohexanol %Dodecanol	80 20	80 20	100 0	100 0	80 20	80 20	70 30	70 30	60 40	60 40	50 50	50 50
Temp. (°C)	85	70	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Tempo (h)	48	48	48	24/48	48	24/48	48	24/48	48	24/48	48	48
Tipo de iniciador	BPO	BPO	AIBN	BPO	AIBN	BPO	AIBN	BPO	AIBN	BPO	AIBN	BPO
Observações	Não permeável à passagem de etanol, mesmo com aplicação de pressão	Não permeável à passagem de etanol, mesmo com aplicação de pressão	Não permeável à passagem de etanol, mesmo com aplicação de pressão	Não permeável à passagem de etanol, mesmo com aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mas apenas com aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mas apenas com aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mas apenas com aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mas apenas com aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mesmo sem aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mesmo sem aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mesmo sem aplicação de pressão	Permeável à passagem de etanol, mesmo sem aplicação de pressão

* Monólitos realizados nas mesmas condições, mas com um tempo de reação de 24h.

- $V_{\text{Monómeros}} / V_{\text{Solventes}}$: 40/60 (% , v/v)

Todas as reacções foram efectuadas num banho termostaticado a 50 °C com a excepção das duas primeiras (monólito 1 e 2). A primeira foi efectuada num banho de óleo com um termómetro acoplado, contudo, verificou-se que o controlo da temperatura não foi eficaz na primeira reacção e esta subiu até cerca de 85 °C, o que se traduziu num polímero bastante compacto e pouco poroso. Já a segunda reacção foi efectuada num banho termostaticado a 70 °C, originando também um polímero compacto e pouco poroso. Este facto verificou-se aquando da lavagem com etanol, para remover restos de monómero não reagido e de solvente, pois, mesmo aplicando pressão, este solvente não atravessava o polímero. Como já foi referido anteriormente, temperaturas de reacção maiores levam à formação de um grande número de radicais livres, e estes a um grande número de núcleos em crescimento e, conseqüentemente, de glóbulos, o que origina que estes sejam pequenos e, portanto, os espaços entre eles, ou seja, os poros, também sejam pequenos.

Assim, estas sínteses foram repetidas usando as mesmas proporções de reagentes e solventes, mas usando um banho termostaticado a 50 °C, obtendo-se um polímero muito mais poroso, como seria de esperar.

Nas restantes sínteses efectuadas em que se utilizou uma proporção volumétrica de monómero/solvente de 40/60, fez-se variar a constituição da mistura de solventes porogénicos, ou seja, a proporção ciclohexanol/dodecanol de 100/0 até 50/50.

Confirmando o que se previa teoricamente, monólitos em que se usa uma proporção maior de solvente mais pobre, neste caso o dodecanol, apresentam poros maiores, visto que a separação de fases ocorre mais cedo, pois o limite de solubilidade nestes solventes mais pobres é atingido mais cedo.

Assim, o polímero separa-se da solução e aglomera-se numa rede porosa homogénea. Como os monómeros são termodinamicamente muito melhores solventes para o polímero que o solvente porogénico, ocorre um inchamento devido à concentração local destes nesta rede porosa. A reacção de polimerização ocorre, então, preferencialmente nestes núcleos. Assim, os glóbulos formados são maiores e, conseqüentemente, os espaços entre eles, os poros, também serão maiores.

Da análise da tabela 2.6, observa-se que, para uma concentração de dodecanol de 0% na mistura de solventes porogénicos, o monólito não é permeável à passagem do solvente de lavagem (etanol), mesmo com aplicação de pressão, enquanto que, aumentando a concentração deste solvente para 20%, já é permeável quando se aplica pressão. Um aumento para 40%, torna-o permeável à passagem do etanol mesmo na ausência de pressão. Assim, pode dizer-se que, para uma determinada temperatura, a proporção dos constituintes da mistura de solventes porogénicos é crítica para a obtenção de um determinado tamanho de poro.

Como já foi referido anteriormente, um facto interessante que se verificou neste trabalho foi que, em estudos anteriores quando se utilizaram colunas descartáveis de plástico, os monólitos não se formavam completamente após 24 h de reacção, motivo pelo qual se optou pelas 48 h quando se iniciou o estudo com as colunas de vidro. Posteriormente, sintetizaram-

se monólitos mantendo todas as outras condições (monólitos 4, 6, 8 e 10), mas reduzindo o tempo de reacção para 24 h, tendo-se verificado que as características destes monólitos eram idênticas às dos seus homólogos obtidos passadas 48 h.

Ao sintetizar monólitos exactamente nas mesmas condições, mas apenas mudando o iniciador radicalar, pretendeu-se comparar a porosidade dos monólitos sintetizados com o BPO e com o AIBN. Verifica-se que, aquando das lavagens, ambos tinham praticamente o mesmo comportamento. Esta semelhança de resultados pode dever-se ao valor de temperatura usado, uma vez que para temperaturas superiores a 50 °C a decomposição do AIBN ocorre mais rapidamente dando origem a monólitos com características menos porosas ⁽³³⁾.

2.4.1.3- Lavagem dos monólitos obtidos

As lavagens dos monólitos para remover restos de monómeros que não reagiram e solventes, foram realizadas com etanol, recorrendo a uma bomba peristáltica para baixas pressões. Nos casos em que se verificou que o monólito era poroso, o etanol percorria a coluna sem dificuldade, quando era muito pouco poroso, este solvente começava a verter pelos vedantes que serviam de apoio à coluna.

Para o tratamento das colunas foram usados dois agentes silanizantes, o hexametildissilano e o 3-(trimetoxisilil)propilmetacrilato, no caso dos monólitos 11 e 12. Nas colunas onde foi usado o primeiro agente verificou-se que, quando se procedeu à lavagem dos monólitos com aplicação de pressão, estes não aderiram de uma forma muito eficaz às paredes da coluna, observando-se uma deslocalização destes.

A utilização de monólitos poli(GMA-co-EDMA), sintetizados e comerciais, está já bastante difundida para a purificação de biomoléculas, contudo, o uso de cianinas como ligandos está numa fase inicial. Assim, com este trabalho pretendeu-se otimizar as condições de síntese deste monólito, de modo a comparar o seu desempenho relativamente a monólitos comerciais para purificação de biomoléculas, usando aminocianinas como ligandos. Esta optimização das condições reaccionais serviria igualmente de base para uma nova abordagem em que a aminocianina se ligaria inicialmente a um dos co-monómeros (metacrilato de glicidilo), sendo apenas posteriormente, efectuada a polimerização com o dimetacrilato de etileno.

2.5- Conclusões

As principais conclusões que podemos retirar dos resultados obtidos e discutidos ao longo deste trabalho são as seguintes:

- Na síntese de monometinocianinas, a utilização do método do tioalquilo é bastante eficaz, permitindo a síntese das nitrocianinas com bons rendimentos;
- De todos os métodos utilizados para a obtenção de aminocianinas, apenas no método onde foram usados etilenoglicol, hidrato de hidrazina, e níquel Raney, foi possível isolar a aminocianina pretendida, com um rendimento de 23%. Assim, este método afigura-se como sendo o método a utilizar na obtenção de aminocianinas, cujo grupo amina vai permitir uma imobilização directa aos monólitos;
- Na síntese dos monólitos, verifica-se que para uma temperatura de 50 °C e composição de monómeros (GMA 60% e EDMA 40%), a porosidade destes aumenta, com o aumento da percentagem de dodecanol;
- Verifica-se que, para as diferentes condições usadas, a permeabilidade dos monólitos é praticamente igual, quer se use AIBN, ou BPO como iniciadores radicalares;
- Embora o objectivo inicial deste trabalho, nomeadamente a comparação do desempenho dos monólitos sintetizados com os comerciais para a purificação de biomoléculas, usando cianinas como ligandos, não tivesse sido plenamente alcançado, atingiu-se um dos objectivos propostos que foi a optimização das condições reaccionais para a obtenção do monólito.

A obtenção da aminocianina com um grau de pureza satisfatório, e em quantidade que permita iniciar os ensaios de imobilização veio revelar-se uma das principais dificuldades deste trabalho.

Nesta altura, estamos em condições de iniciar os estudos de imobilização da aminocianina, quer na imobilização desta depois de formados os monólitos, quer no seu uso ligada ao GMA, funcionando como co-monómero, dando-se posteriormente a polimerização. Assim tanto por uma abordagem, como pela outra, aquando dos ensaios cromatográficos, seriam utilizados os monólitos onde se obteve o melhor desempenho, ou seja, os monólitos 9-12 (40 e 50% de dodecanol).

2.6- Perspectivas futuras

O trabalho apresentado, devido a limitações de tempo e a condições alheias à vontade do autor apresenta algumas lacunas. Assim, são apresentadas as seguintes propostas de trabalho futuro:

- No que respeita à obtenção de aminocianinas, tentar otimizar o método onde se obteve êxito, de maneira a aumentar o seu rendimento;
- Em relação aos monólitos sintetizados pela polimerização entre o GMA e o EDMA, ambiciona-se determinar o tamanho dos seus poros, recorrendo a um porosímetro de intrusão de mercúrio, uma vez que este permite quantificar o tamanho dos poros, e deste modo avaliar com maior rigor a porosidade dos monólitos sintetizados;
- Comparar o desempenho destes monólitos relativamente a monólitos comerciais para purificação de biomoléculas, usando a aminocianina sintetizada ou outras como ligandos;
- Efectuar a abordagem prevista em que a aminocianina se ligaria inicialmente a um dos co-monomeros, GMA, sendo apenas posteriormente, efectuada a polimerização com o EDMA.

Capítulo 3 - Parte Experimental

3.1- Reagentes e Equipamento

Todos os reagentes e solventes utilizados no trabalho eram analiticamente puros e foram, sempre que necessário, secos e purificados por métodos padronizados ⁽⁵⁰⁾ ⁽⁵¹⁾.

A evolução das reacções foi acompanhada por c.c.f. usando placas de sílica Merck Kieselgel GF₂₅₄ com 0,2 mm de espessura. O eluente usado foi o diclorometano, ou uma mistura deste com diferentes percentagens de metanol.

Após eluição das placas, os compostos separados foram visualizados à luz ultravioleta, de comprimento de onda de 254, 312 e 365 nm, e revelados em câmaras de iodo e/ou por pulverização com uma solução adequada ao tipo de composto em estudo. Na tabela 3.1 encontra-se indicado a composição das soluções reveladoras, a coloração desenvolvida e o tipo de composto a que se aplica.

Os p.f. foram determinados num aparelho de determinação por capilar Büchi 540.

Os espectros de UV/Vis foram realizados em espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 6, utilizando cubas de 1 cm de espessura e etanol, etanol/etilenoglicol (1%), como solventes.

Os espectros de IV foram registados num espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet™ iS10™ FT-IR. São indicadas apenas as bandas mais intensas e/ou características. Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: frequência do máximo de uma banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}); tipo de banda [F (forte), m (média), f (fraca)] e atribuição a um grupo de átomos na molécula.

Os espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN foram efectuados num espectrómetro Brüker AC-250-P (250,13 e 62,90 MHz, respectivamente), usando como referência interna tetrametilsilano (TMS) e como solvente dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆).

Os dados de ¹H RMN são indicados referindo-se o solvente usado, o desvio químico (em ppm), o número de prótons a que corresponde o sinal, a multiplicidade do sinal [singuleto (s), singuleto largo (sl), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t), quarteto (q)], valor da constante de acoplamento (*J*, em Hz) e finalmente a atribuição do sinal ao próton ou prótons na molécula. Os dados de ¹³C RMN são indicados referindo-se o solvente usado, o desvio químico (em ppm) e a atribuição do carbono na molécula.

Tabela 3.1 Soluções reveladoras utilizadas nas pulverizações

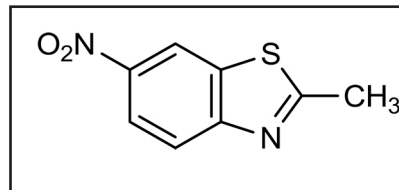
Tipo de composto a identificar	Solução	Coloração Desenvolvida
Aminas primárias aromáticas	1º- Solução de nitrito de sódio 1%, em ácido Clorídrico 1N 2º- Solução de 1-Naftol 0,2 %, em hidróxido de potássio 1N	Castanho claro
Geral	Vapores de iodo	Amarela

3.2- Síntese de materiais de partida

3.2.1- Precursores de sais quaternários de amónio

2-Metil-6-nitrobenzotiazole (2)

A uma mistura de 2-metilbenzotiazole (1) (1,3 mL; 10 mmol) em ácido sulfúrico concentrado (5,9 mL; 60 mmol), arrefecida em banho de gelo, adicionou-se, gota a gota, com agitação, ácido nítrico (1,2 mL; 30 mmol) em ácido sulfúrico (1,0 mL; 10 mmol). Deixou-se a mistura

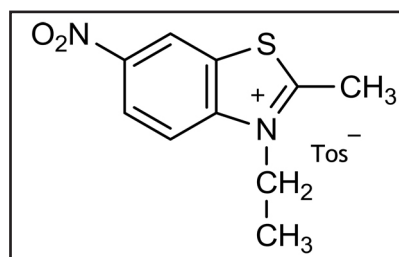


reaccional em agitação, a 2-3 °C, durante 30 min e, de seguida, à temperatura ambiente (t.a.), durante 2,5 h. Seguiu-se a evolução da reacção por c.c.f. (sílica; diclorometano/metanol 5 %), tendo as alíquotas sido neutralizadas com NaHCO₃ 5 % e extraídas com diclorometano. Finda a reacção, verteu-se a mistura sobre gelo e deixou-se no frigorífico 24 h. Filtrou-se o produto obtido e recristalizou-se com metanol, obtendo-se o 2-metil-6-nitrobenzotiazole na forma de agulhas amarelo pálido, com um rendimento de 71 %; p.f. 164-165 °C (164,5-165 °C⁽⁷⁾ (39)); IV ($\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) 1573 (m, C-C_{Arom}), 1514, 1334 (F, NO₂) cm⁻¹; ¹H RMN δ (DMSO-*d*₆) 2,87 (3H, s, CH₃), 8,06 (1H, d, *J*=9,0 Hz, 4-CH), 8,29 (1H, dd, *J*=6,8; 2,3 Hz, 5-CH), 9,09 (1H, d, *J*=2,3 Hz, 7-CH) ppm; ¹³C RMN δ (DMSO-*d*₆) 19,9 (CH₃), 118,8 (CH_{Arom}), 121,0 (CH_{Arom}), 121,9 (CH_{Arom}), 136,0 (C_{Arom}), 143,1 (C_{Arom}), 155,8 (C_{Arom}), 173,7 (C_{Arom}) ppm.

3.2.2- Síntese de sais quaternários de amónio isolados

Tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io (7)

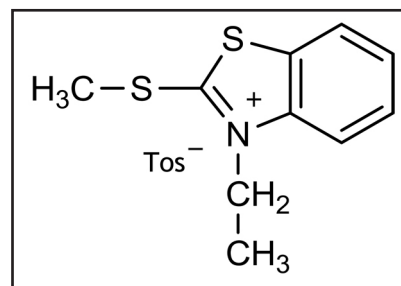
Num balão previamente tarado, fundiu-se a 140 °C, uma mistura de 2-metil-6-nitrobenzotiazole (2) (1,94 g 10 mmol) e *p*-toluenossulfonato de etilo (4) (5,0 g; 25 mmol), durante 21 h, verificando-se a formação do sal como um óleo. Seguiu-se a evolução da reacção por c.c.f. (sílica; diclorometano/metanol 5 %). Recristalizou-se este óleo com acetonitrilo para remover as impurezas e material



de partida, obtendo-se assim o tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io na forma de cristais violetas, com um rendimento de 71 %; p.f. 223,8-225,3 °C; IV ($\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) 1573 (m, NO₂), 1510 (f, NO₂), 1170 (F), 2922 (f) cm⁻¹; ¹H RMN δ (DMSO-*d*₆) 1,45 (3H, t, *J*=7,3 Hz, NCH₂CH₃), 2,27 (3H, s, CH_{3Tos}), 3,27 (3H, s, CH₃), 4,80 (2H, q, *J*=7,3 Hz, NCH₂CH₃), 7,10 (2H, d, *J*=8,0 Hz, CH_{Tos}), 7,46 (2H, d, *J*=8,0 Hz, CH_{Tos}), 8,63 (1H, d, *J*=9,0 Hz, 4-CH), 8,67 (2H, dd, *J*=7,0; 2,5 Hz, 5-CH), 9,42 (1H, d, *J*=2,5 Hz, 7-CH) ppm; ¹³C RMN δ (DMSO-*d*₆) 13,0 (NCH₂CH₃), 17,3 (CH_{3Tos}), 20,7 (CH₃), 45,4 (NCH₂CH₃), 117,9 (CH_{Arom}), 121,3 (CH_{Arom}), 124,2 (CH_{Arom}), 125,4 (CH_{Tos}), 128,1 (CH_{Tos}), 130,2 (C_{Arom}), 135,9 (C_{Arom}), 137,9 (C_{Tos}), 145,2 (C_{Tos}), 156,8 (C_{Arom}), 174,6 (C_{Arom}), ppm.

Tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io (8)

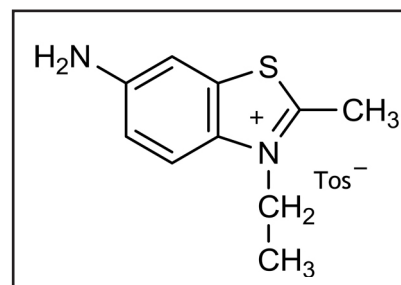
Num balão, fundiu-se a 120 °C, uma mistura de 2-(metiltio)benzotiazól-3-io (3) (1,8128 g; 10 mmol) e *p*-toluenossulfonato de etilo (4) (5,0 g; 25 mmol), durante 17 h, verificando-se a formação do sal como um óleo. Seguiu-se a evolução da reacção por c.c.f. (sílica; diclorometano/ metanol 5 %). Dissolveu-se o produto formado em acetato de etilo e adicionou-se éter etílico, precipitando o produto



sob a forma de um sólido branco, com um rendimento de 78 %; p.f. 142,1-146,3 °C; IV ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}) 1168 (F) , 1117 (m), 1009 (m), 2917 (f), 2986 (f); ^1H RMN δ (DMSO- d_6) 1,42 (3H, t, $J=7,0$ Hz, NCH_2CH_3), 2,28 (3H, s, $\text{CH}_{3\text{Tos}}$), 3,12 (3H, s, CH_3), 4,65 (2H, q, $J=7,0$ Hz, NCH_2CH_3), 7,10 (2H, d, $J=8,0$ Hz, CH_{Tos}), 7,47 (2H, d, $J=8,0$ Hz, CH_{Tos}), 7,72 (1H, t, $J=7,3$ Hz, 6-CH), 7,84 (1H, t, $J=7,5$ Hz, 5-CH), 8,24 (1H, d, $J=8,5$ Hz, 7-CH) , 8,40 (1H, d, $J=8,3$ Hz, 4-CH) ppm; ^{13}C RMN δ (DMSO- d_6), 11,8 (NCH_2CH_3), 17,7 ($\text{CH}_{3\text{Tos}}$), 20,5 (CH_3), 45,0 (NCH_2CH_3), 113,9 (CH_{Arom}), 115,9 (CH_{Arom}), 123,6 (CH_{Arom}), 124,1 ($\text{CH}_{2\text{Tos}}$), 125,2 (CH_{Tos}), 126,8 ($\text{CH}_{2\text{Arom}}$), 127,1 (CH_{Tos}), 128,7 (C_{Tos}), 130,6 (C_{Arom}), 135,5 (C_{Arom}), ppm.

Tosilato de 6- amino-3-etil-2-metilbenzotiazól-3-io (9)

Dissolveu-se 4,514 g (11,44 mmol) de tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazólio (7) em etanol (50 mL), transferiu-se esta mistura para um balão de plástico, adicionou-se 2,55 g (45,76 mmol) de ferro e 1,55 mL (18,64 mmol) de HCl, colocou-se esta reacção nos ultrasounds durante 5-10 horas (h). Num filtro de pregas filtrou-se a quente a mistura, para remover os óxidos de ferro,



posteriormente adicionou-se éter etílico ao filtrado, precipitando o produto sob a forma de sólido. Pela análise de ^1H RMN não é possível identificar o composto sintetizado.

3.3- Síntese de monometinocianinas funcionalizadas

3.3.1- Síntese de Nitrocianinas

3.3.1.1- Preparação dos sais quaternários

O 2-metilbenzotiazole **1**, o 2-(metiltio)benzotiazole **3** e o *p*-toluenossulfonato de etilo **4** foram adquiridos comercialmente, não tendo sido necessária qualquer purificação prévia.

O 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2** foi sintetizado e purificado conforme a síntese descrita em pontos anteriores.

Processo geral

O método utilizado para a síntese destas monometinocianinas foi o método do tialquilo, amplamente descrito na literatura ^{(41) (52)} e usado em trabalhos anteriores para sintetizar compostos análogos. Assim, aqueceu-se a 140 °C uma mistura do 2-metil-6-nitrobenzotiazole **2** (10 mmol), 2-(metiltio)benzotiazole **3** (10 mmol) e *p*-toluenossulfonato de etilo **4** (40 mmol). Seguiu-se a evolução da reacção por c.c.f. (sílica, diclorometano/metanol 10 %), tendo-se completado num período de 5 a 15 h. Obtiveram-se, deste modo, em mistura, os seguintes sais quaternários: tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-íio **7** e o tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-íio **8**, que não foram isolados, sendo usados imediatamente no passo seguinte:

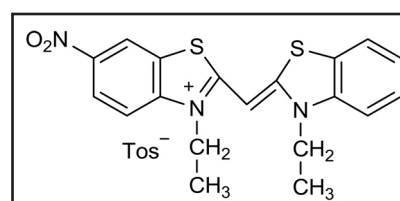
3.3.1.2- Condensação dos sais quaternários

Refluxaram-se as misturas dos sais quaternários de tosilato **7** e **8**, referidas no ponto anterior em piridina (10 mL/g sal esperado). Seguiu-se a evolução da reacção por c.c.f. (sílica, diclorometano/metanol 10 %), tendo-se completado num período de 2 a 5 h. Seguiu-se a evolução da reacção por c.c.f. (sílica, diclorometano/metanol 10 %). O produto foi isolado por filtração, lavagem do filtrado com éter etílico e recristalização de metanol.

Deste modo, obteve-se a seguinte nitrocianina:

Tosilato de 3,3'-dietil-6-nitrotiacianina ou tosilato de [3-etil-6-nitrobenzotiazole-(2)]-[3-metilbenzotiazole-(2)]metinocianina (**5**)

Obtido a partir dos sais quaternários de tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-íio **7** e de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-íio **8**, por refluxo durante 4 h, recristalizada de metanol com um rendimento de 51 %;



crystal orange; p.f. 309,3-309,9 °C (312-314 °C ⁽⁷⁾ (39)); UV/Vis [EtOH/EG (1 %)] $\lambda_{\text{máx}}=439$ nm; IR ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}) 1526 (F, C-C_{Arom}), 1465 (F, NO₂), 1328 (m, NO₂) cm^{-1} ; ¹H RMN δ (DMSO-*d*₆) 1,39 (6H, t, *J*=3,4 Hz, NCH₂CH₃), 2,27 (3H, s, CH_{3Tos}), 4,74 (4H, q, *J*=8,0 Hz, N-CH₂CH₃), 6,86 (1H, s, α -CH), 7,10 (2H, d, *J*=7,8 Hz, CH_{Tos}), 7,47 (2H, d, *J*=8,3 Hz, CH_{Tos}), 7,58 (1H, t, *J*=7,8 Hz, 6'-CH), 7,75 (1H, t, *J*=7,3 Hz, 5'-CH), 8,01 (1H, d, *J*=6,0 Hz, 4'-CH), 8,03 (1H, d, *J*=2,3 Hz, 7'-CH), 8,33 (1H, d, *J*=8,0 Hz, 4-CH), 8,49 (1H, dd, *J*=6,5; 2,3 Hz, 5-CH), 9,21 (1H, d, *J*=2,5 Hz, 7-CH) ppm; ¹³C RMN δ (DMSO-*d*₆) 12,1 (N-CH₂CH₃), 12,5 (N-CH₂CH₃), 20,7 (CH_{3Tos}), 42,1 (N-CH₂CH₃), 42,2 (N-CH₂CH₃), 83,8 (α -CH), 113,6 (CH_{Arom}), 114,3 (CH_{Arom}), 120,1 (CH_{Arom}), 124,0 (CH_{Arom}), 124,5 (CH_{Arom}), 125,6 (CH_{Tos}), 125,7 (CH_{Arom}), 126,2 (C_{Arom}), 128,1 (CH_{Tos}), 129,1 (CH_{Arom}), 137,7 (C_{Arom}), 139,8 (C_{Arom}), 143,5 (C_{Arom}), 144,7 (C_{Arom}), 145,7 (C_{Arom}), 162,6 (C_{Arom}), 162,8 (C_{Arom}) ppm.

3.3.2- Síntese de aminocianinas

As aminocianinas foram sintetizadas por dois métodos diferentes, através da redução da nitrocianina formada (Método A) e por redução do sal tosilato de 3-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazól-3-io (7), sendo posteriormente efectuada a condensação com o tosilato de 3-etil-2-(metiltio)benzotiazól-3-io (8), usando a piridina, sendo os sais de amónio quaternários sintetizados individualmente (Método B).

3.3.2.1- Redução de nitrocianinas

Método A

Processo Geral

Dissolveu-se a nitrocianina 5 (1 mmol) em 15 mL de metanol, adicionou-se ácido clorídrico (0,2-0,4 mL) e ferro (0,34-1,35 g). Colocou-se esta mistura nos ultra-sons ou placa sob agitação durante respectivamente, 5-13 h e 86 h. A evolução foi seguida por c.c.f. (sílica, diclorometano/metanol 10 %, pulverização para aminas). Filtrou-se para remover os óxidos de ferro, adicionou-se posteriormente éter etílico para precipitar o produto desejado. Por este método obtém-se a aminocianina 6 com um rendimento 1-3 %, passível de baixar ainda mais, visto que, por análise ¹H RMN se verifica que o produto não está puro.

Método B

1) Processo Geral

Dissolveu-se a nitrocianina **5** (1 mmol) em 30-40 mL de etanol, adicionou-se hidrato de hidrazina (1 mL) e refluxou-se alguns minutos. Após este tempo, juntaram-se algumas gotas de níquel Raney, refluxando-se, novamente. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, diclorometano/metanol 15 %, pulverização para aminas), após diluição das alíquotas em diclorometano, tendo-se completado num período de 7 h. Finda a reacção, filtrou-se a suspensão a quente para retirar o níquel, concentrou-se e posteriormente tentou-se isolar o produto pretendido com vários solventes. Usando uma mistura de diclorometano/éter precipitou um sólido, que pela análise em c.c.f verificou-se conter duas manchas com diferentes r.f. (factor de retardação). Para separar estes dois componentes do sólido, recorreu-se a uma coluna cromatográfica (diclorometano/metanol 0-30 %). Depois de separado fez-se uma análise ^1H RMN, para cada um dos compostos separados, onde se verificaram não serem o produto desejado, ou seja, a aminocianina **6**.

2) Processo Geral

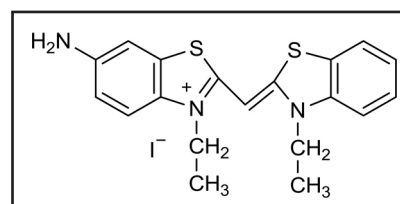
Dissolveu-se a nitrocianina **5** (1 mmol) em 20 mL de etilenoglicol, adicionou-se hidrato de hidrazina (0,20 mL) e refluxou-se alguns minutos. Após este tempo, juntaram-se algumas gotas de níquel Raney, refluxando-se, novamente. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, diclorometano/metanol 15 %, pulverização para aminas), após diluição das alíquotas em diclorometano, tendo-se completado num período de 6 h. Finda a reacção, filtrou-se a suspensão a quente para retirar o níquel, deixou-se arrefecer, adicionou-se uma solução de KI 14 %, filtrou-se o sólido resultante e recristalizou-se de metanol.

Obteve-se, assim a seguinte aminocianina:

Iodeto de 6-amino-3,3'-dietiltiacianina ou iodeto de [6-amino-3-etilbenzotiazole-(2)]-[3-metilbenzotiazole-(2)]metinocianina (**6**)

Obtida na forma de cristais castanhos, em quantidades vestigiais pelo método A e pelo método B (etilenoglicol), com um rendimento de 23 %; p.f. 261,2-263,8 °C (203-204 °C^{(7),(39)}); UV/Vis [EtOH/EG (1 %)] $\lambda_{\text{máx}}=431$ nm; IV ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}) 3441, 3218 (m, NH_2), 1603 (f, NH_2),

1526 (F, $\text{C}-\text{C}_{\text{Arom}}$), 1264 (m, NH_2) cm^{-1} ; ^1H RMN δ ($\text{DMSO}-d_6$) 1,34 (6H, t, $J=5,8$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,95 (2H, sl, NH_2) 4,60 (4H, q, $J=4,8$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6,59 (1H, s, $\alpha\text{-CH}$), 7,08 (1H, dd, $J=9,0$; 2,0 Hz, 5- CH), 7,22 (1H, d, $J=2,0$ Hz, 7- CH), 7,64 (1H, t, $J=8,2$ Hz, 6- CH_{Arom}), 7,69 (1H, d, $J=9,3$ Hz,



4-CH), 7,76 (1H, t, $J=8,0$ Hz, 5-CH_{Arom}), 7,81 (1H, d, $J=8,5$ Hz, 4-CH_{Arom}), 8,14 (1H, d, $J=7,8$ Hz, 7-CH_{Arom}) ppm; ¹³C RMN δ (DMSO-*d*₆) 12,1 (N-CH₂CH₃), 12,6 (N-CH₂CH₃), 41,2 (N-CH₂CH₃), 41,7 (N-CH₂CH₃), 81,1 (α -CH), 105,6 (CH_{Arom}), 113,0 (CH_{Arom}), 114,5 (CH_{Arom}), 115,7 (CH_{Arom}), 123,3 (CH_{Arom}), 124,4 (CH_{Arom}), 124,6 (C_{Arom}), 126,7 (C_{Arom}), 128,4 (CH), 130,2 (C_{Arom}), 139,9 (C_{Arom}), 147,4 (C_{Arom}), 158,6 (C_{Arom}), 159,2 (C_{Arom}) ppm.

3.4- Síntese de Monólitos

3.4.1- Pré-tratamento da coluna

Este pré-tratamento inicia-se com a lavagem da coluna com uma base forte (NaOH), em refluxo, durante 30 min, seguida de uma lavagem com ácido (HCL), igualmente em refluxo, durante o mesmo tempo. Estas lavagens permitem que os grupos siloxanos da superfície interna da coluna sejam hidrolisados, aumentando a densidade de grupos silanóis, que, por sua vez, servirão como “âncoras” para reacções subsequentes. Posteriormente faz-se passar o agente silanizante bifuncional, o hexametildissilano ou o 3-(trimetoxissilil)propil metacrilato, em acetona (50 % v/v), em refluxo, durante 12 h. Os resíduos são removidos por lavagem da coluna com metanol, em refluxo (30 min). Devido a este tratamento, ligações do tipo $\equiv\text{Si-O-Si-C}\equiv$ são formadas entre as paredes da coluna, ficando os grupos metacrilóila reactivos disponíveis para posterior fixação da matriz monolítica à parede da coluna, durante a reacção de polimerização^{(47) (48)}.

3.4.2- Reacção de polimerização do poli(GMA-co-EDMA)

Processo Geral

Numa coluna de vidro previamente tratada, introduziu-se a mistura de monómeros, constituída por 60 % de GMA e 40 % de EDMA, a mistura de solventes, constituída por 50-100 % de ciclohexanol e 0-50% de dodecanol e BPO e AIBN (1 % do peso dos monómeros).

Esta solução foi colocada nos ultra-sons, à t.a., durante 20 min, para homogeneizar.

Purgou-se esta mistura com azoto, durante 20 min, de modo a desarejar e deixou-se sob atmosfera de azoto, selando a outra extremidade.

Colocou-se num banho termostatizado, a 50 e 70 °C, durante 24 e 48 h, de modo a ocorrer a reacção de polimerização. Alternativamente, colocou-se num banho de óleo a 85 °C.

Após este tempo, abriram-se as duas extremidades da coluna e lavou-se o monólito com etanol, usando uma bomba peristáltica para caudais baixos, para remover restos de solvente e monómero não reagido.

Obtiveram-se por este método, os seguintes monólitos:

3.4.2.1- Monólito 1

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-80 % e dodecanol-20 %) e BPO, a uma temperatura de 85 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho de óleo, abertas as duas extremidades, fez-se passar sob pressão etanol, de modo a remover material não reagido e solventes, contudo, o monólito obtido revelou-se impermeável à passagem deste.

3.4.2.2- Monólito 2

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-80 % e dodecanol-20 %) e BPO (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 70 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades, fez-se passar sob pressão etanol, de modo a remover material não reagido e solventes, contudo, o monólito obtido revelou-se impermeável à passagem deste.

3.4.2.3- Monólito 3

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-100 % e dodecanol-0 %) e AIBN (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades, fez-se passar sob pressão etanol, de modo a remover material não reagido e solventes, no entanto, o monólito obtido revelou-se impermeável à passagem deste.

3.4.2.4- Monólito 4

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-100 % e dodecanol-0 %) e BPO (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 24-48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades, fez-se passar sob pressão etanol, de modo a remover material não reagido e solventes, no entanto, o monólito obtido revelou-se impermeável à passagem deste.

3.4.2.5- Monólito 5

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-80 % e dodecanol-20 %) e AIBN (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades, fez-se passar etanol para remover material não reagido e solventes, no entanto, apenas só sob pressão é que foi possível a passagem deste.

3.4.2.6- Monólito 6

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-80 % e dodecanol-20 %) e BPO (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 24-48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades e fez-se passar etanol para remover material não reagido e solventes, no entanto, apenas só sob pressão é que foi possível a passagem deste.

3.4.2.7- Monólito 7

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-70 % e dodecanol-30 %) e AIBN (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades, fez-se passar etanol para remover material não reagido e solventes, no entanto, apenas só sob pressão é que foi possível a passagem deste.

3.4.2.8- Monólito 8

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-70 % e dodecanol-30 %) e BPO (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 24-48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades, fez-se passar etanol para remover material não reagido e solventes, no entanto, apenas só sob pressão é que foi possível a passagem deste.

3.4.2.9- Monólito 9

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-60 % e dodecanol-40 %) e AIBN (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho termostaticado, abertas as duas extremidades, fez-se passar etanol de modo a remover material não reagido e solventes, neste monólito passou etanol sem aplicação de pressão.

3.4.2.10- Monólito 10

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-60 % e dodecanol-40 %) e BPO (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 24-48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho e abertas as duas extremidades, fez-se passar etanol de modo a remover material não reagido e solventes, neste monólito passou etanol sem aplicação de pressão.

3.4.2.11- Monólito 11

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-50 % e dodecanol-50 %) e AIBN (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho e abertas as duas extremidades, fez-se passar etanol de modo a remover material não reagido e solventes, neste monólito passou etanol sem aplicação de pressão.

3.4.2.12- Monólito 12

Obtido a partir de 40 % de uma mistura de monómeros (GMA e EDMA), 60 % de uma mistura de solventes (ciclohexanol-50 % e dodecanol-50 %) e BPO (1 % do peso dos monómeros), a uma temperatura de 50 °C, durante 48 h. Passado este tempo, a coluna foi retirada do banho e abertas as duas extremidades, fez-se passar etanol de modo a remover material não reagido e solventes, para este monólito passou etanol sem aplicação de pressão.

Referências Bibliográficas

1. R. L. M. Allen, *Colour Chemistry*, Pitman press, London, **1971**.
2. Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, New York, Vol.16, **1978**.
3. F. M. Hamer, *The Cyanines Dyes and Related Compounds in The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Interscience Publishers, John Wiley, New York, Vol. 18, **1964**.
4. M. J. Nunes, *Síntese de Metinocianinas Simétricas e Assimétricas com Variação do Núcleo Heterocíclico e do Contra-íão*, Projecto de Licenciatura em Química Industrial, Universidade da Beira Interior, Covilhã, **1994**.
5. P. Almeida, “Cianinas, a Cor não Visível da Fotografia”, *Química - Boletim da SPQ- A Cor*, 73, 9-12, **1999**.
6. R. E. F. Boto, *Synthesis and Characterization of Carboxycarbocyanines and Their Application as Ligands in Dye-Affinity Chromatography for Protein Purification*, Tese de Doutoramento em Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã, **2007**.
7. M. J. Nunes, *Desenvolvimento de Cianinas Funcionalizadas para Aplicação em Cromatografia de Afinidade*, Tese de Doutoramento em Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã, **2007**.
8. M. Matsuoka, *Infrared Absorbing Dyes-Topics in Applied Chemistry*, Plenum Press, New York, **1990**.
9. <http://lpas.epfl.ch/PDT/index.html> (Junho **2011**)
10. T. Deligeorgiev, S. Kaloyanova, A. Vasilev, “A Novel General Method for Preparation of Neutral Monomethine Cyanine Dyes”, *Dyes Pigments*, 90, 170-176, **2011**.
11. Y. D. Clonis, N. E. Labrou, V. P. Kotsira, C. Mazitsos, S. Melissis, G. Gogolas, “Biomimetic Dyes as Affinity Chromatography Tools in Enzyme Purification”, *J.Chromatogr. A*, 891, 33-44, **2000**.
12. C. Tozzi, L. Anfossi, G. Giraudi, “Affinity Chromatography Techniques Based on The Immobilisation of Peptides Exhibiting Specific Binding Activity”, *J.Chromatogr. B*, 797, 289-304, **2003**.
13. F. A. P. Garcia, E. M. V. Pires, *Recovery Processes for Biological Materials*, John Wiley & Sons, New York, **1993**.

14. *Affinity Chromatography-Principles and Methods*, Amersham Biosciences, 2002, <http://www.chomatography.amershambiosciences.com> (Junho 2011).
15. C. R. Lowe, S. J. Burton, N. Burton, D. J. Stewart, D. R. Purvis, I. Pitfield, S. Eapen, “New Developments in Affinity Chromatography”, *J. Molec. Recogn.*, Vol. 3, 117, 1990.
16. S. R. Narayanan, “Preparative Affinity Chromatography of Proteins”, *J. Chromatog.A*, 658, 237-258, 1994.
17. G. E. Ficken, K. VenKataraman, *The Chemistry of Synthetic Dyes*, Ed. Academic Press, London, Vol. 4, 1971.
18. R. E. F. Boto, P. Almeida, J. A. Queiroz, “Thiocarbocyanine as Ligand in Dye-Affinity Chromatography for Protein Purification”, *Biomed. Chromatogr.*, 22, 278-288, 2008.
19. R. K. Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, Ed. Springer-Verlag, New York, 1994.
20. G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P. K. Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, London, 1992.
21. G. Walsh, *Proteins Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, 2002.
22. R. P. W. Scott, *Technique and Practice of Chromatography*, Chromatographic Science Series, Marcel Dekker, New York, Vol. 70, 1995.
23. A. L. Pombeiro, *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*, Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª Edição, Lisboa, 1991.
24. Y. Hey, P. D. G. Dean, *Dyes-A Colorful Addition to Protein Purification*, Chem. Ind, London, Vol.17, 1981.
25. E. Machtejevas, S. Andrecht, D. Lubda, K. K. Unger, “Monolithic Silica Columns of Various Format in Automated Sample Clean-Up/Multidimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Peptidomics”, *J.Chromatogr. A*, 1144, 97-101, 2007.
26. A. Jangbauer, R. Hahn, “Monoliths for Fast Bioseparation and Bioconversion and Their Applications in Biotechnology”, *J. Sep. Sci.*, 27, 767-778, 2004.

27. G. Guiochon, “Monolithic Columns in High-Performance Liquid Chromatography”, *J. Chromatogr. A*, 1168, 101-168, **2007**.
28. F. Svec, “My Favorite Materials: Porous Polymer Monoliths”, *J. Sep. Sci.*, 32, 3-9, **2009**.
29. F. Svec, “Porous Polymer Monoliths: Amazingly Wide Variety of Techniques Enabling Their Preparation”, *J. Chromatogr. A*, 1217, 902-924, **2010**.
30. I. Gusev, X. Huang, C. Horváth, “Capillary Columns With in Situ Formed Porous Monolithic Packing for Micro High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography”, *J. Chromatogr. A*, 855, 273-290, **1999**.
31. D. Josic, J. G. Clifton, “Use of Monolithic Supports in Proteomics Technology”, *J. Chromatogr. A*, 1144, 2-13, **2007**.
32. R. Mallik, D. S. Hage, “Affinity Monolith Chromatography” *J. Sep. Sci.*, 29, 1686-1704, **2006**.
33. M. K. Danquah, G. M. Forde, “Preparation of Macroporous Methacrylate Monolithic Material With Convective Flow Properties for Bioseparation: Investigating the Kinetics of Pore Formation and Hydrodynamic Performance”, *Chem. Eng.*, 140, 593-599, **2008**.
34. C. Viklund, F. Svec, J. M. J. Fréchet, “Monolithic, “Molded”, Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization”, *J. Chem. Mater.*, 8, 744-750, **1996**.
35. R. Tetala, K. Kishore, “Bioaffinity Chromatography on Monolithic”, *J. Sep. Sci.*, 33, 422-438, **2010**.
36. R. Hahn, E. Berger, K. Pfliegerl, A. Jungbauer, “Directed Immobilization of Peptide Ligands to Accessible Pore Sites by Conjugation with a Placeholder Molecule”, *Anal. Chem.*, 75, 543-548, **2003**.
37. R. Hahn, A. Podgornik, M. Merhar, E. Schallaun, A. Jungbauer, “Affinity Monoliths Generated by in situ Polymerization of the Ligand”, *Anal. Chem.*, 73, 5126-5132, **2001**.
38. Y. Mizuno, K. Adachi, *J. Pharm. Soc. Japan*, Chem. Abstr., 745, 48-72, **1952**.
39. A. C. Pardal, *Cianinas como Ligandos para a Purificação de Proteínas por Cromatografia de Afinidade*, Mestrado em Química, Universidade da Beira interior, Covilhã, **2000**.

40. S. S. Ramos, *Heptametincianinas Rigidificadas como Potenciais Sensibilizadores para a Fototerapia dinâmica*, Mestrado em Química, Universidade da Beira interior, Covilhã, 2000.
41. N. Abrahart, *Dyes and Their Intermediates*, Ed. Arnold Publishers Ltd, London, 1977.
42. P. Hrobárik, I. Sigmundová, P. Zahradník. "Preparation of Novel Push-pull Benzothiazole Derivates With Reverse Polarity: Compounds with Potencial Non-Linear Optic Application", *Synthesis*, 4, 600-604, 2005.
43. V. Hrobárikova, P. Hrobárik, P. Gajdos, I. Fitis, M. Fakis, P. Persephonis, P. Zahradník. "Benzothiazole-Based Fluorophores of Donor- π -Acceptor- π -Donor Type Displaying High Two-Photon Absorption", *J. Org. Chem.*, 75, 3053-3068, 2010.
44. D. Baicom, A. Furst A, "Reductions with Hydrazine Hydrate Catalyzed by Raney Nickel Aromatic Nitro Compounds to Amines", *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4334-4334, 1953.
45. C. Y. Vijayalakshmi, "Mercaptoheterocyclic Ligands Grafted on a Poly(Ethylene Vinyl Alcohol) Membrane for the Purification of Immunoglobulin G in a Salt Independent Thiophilic Chromatography", *J. Chromatog. B*, 808, 51-56, 2004.
46. N. M. A. Esteves, *Síntese de Suportes Cromatográficos Monolíticos para Purificação de Biomoléculas terapêuticas Usando Aminoácidos como Ligandos*, Projecto de Licenciatura em Química Industrial, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2009.
47. T. Umemura, Y. Ueki, K. Tsunoda, A. Katakai, M. Tamada, H. Haraguchi, "Preparation and Characterization of Methacrylate-based Semi-micro Monoliths for High-Throughput Bioanalysis", *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 566-571, 2006.
48. B. Buszewski, M. Szumski, "Study of Bed Homogeneity of Methacrylate-Based Monolithic Columns for Micro-HPLC and CEC", *Adv. Chromatogr.*, 60, 261-267, 2004.
49. E. C. Peters, F. Svec, J. M. J. Fréchet, "Preparation of Large-Diameter "Molded" Porous Polymer Monoliths and the Control of Pore Structure Homogeneity", *Chem. Mater.*, 9, 1898-1902, 1997.
50. D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Ed. Pergamon Press, Oxford, 1980.
51. *Handbook of Chemistry and Physics*, 69th, Ed. C. R. C. Press, 1988.

- ⁵². L. G. S. Brooker, G. H. Keyes, W. W. Williams, “Resonance as a Classification Basis for Dyes”, *J. Am. Chem. Soc.*, 9, 199-210, 1942.

