



RAQUEL MARIA TRINDADE FERNANDES

**POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA EXTRAÇÃO
SELETIVA DE FÁRMACOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS E
DETERMINAÇÃO POR LC-MS/MS E MS/MS**

CAMPINAS

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

RAQUEL MARIA TRINDADE FERNANDES

**POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA EXTRAÇÃO
SELETIVA DE FÁRMACOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS E
DETERMINAÇÃO POR LC-MS/MS E MS/MS**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM
CIÊNCIAS**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR RAQUEL
MARIA TRINDADE FERNANDES, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA
EBERLIN.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

F391p

Fernandes, Raquel Maria Trindade (1979-).
Polímeros de impressão molecular para extração
seletiva de fármacos em matrizes biológicas e
determinação por LC-MS /MS e MS/MS / Raquel Maria
Trindade Fernandes. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Polímeros de impressão molecular. 2. Omeprazol.
3. Cocaína. 4. Matrizes biológicas. 5. Espectrometria de
massas. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Molecularly imprinted polymer for selective extraction of drugs in biological
matrices by LC-MS/MS e MS/MS

Palavras-chave em Inglês:

Molecularly imprinted polymer
Omeprazole
Cocaine
Biological matrices
Mass spectrometry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]
Eduardo Costa Figueiredo
Eduardo César Meurer
Carol Hollingworth Collins
Maria Izabel Maretti Silveira Bueno

Data de defesa: 30/08/2012

Programa de pós-graduação: Química

O FÁCIL, O DIFÍCIL E O IMPOSSÍVEL

O que chamamos de fácil nada mais é do que aquilo que já conhecemos muito bem. E por que conhecemos bem? Porque já convivemos com aquilo diariamente.

Mas, se pensarmos bem, veremos que uma determinada coisa se tornou fácil depois de muito tempo de convivência com ela. Descobrimos, então, que fácil é aquilo que já fizemos repetidas vezes.

Ótimo! Eu acabo de descobrir uma coisa muito importante: se fácil é aquilo que já repetimos várias vezes, daqui pra frente eu posso então transformar as coisas difíceis e impossíveis. Como? Começando desde já a conviver com a possibilidade de alcançá-las; começando desde já a praticá-las; começando desde já, e em pequenas doses, a fazer com que o impossível torne-se difícil. Mais adiante, fazendo o difícil tornar-se fácil...

Sabemos que ver as coisas dessa maneira não é fácil... é até um pouco difícil, mas também impossível já não é mais, a partir do momento em que já descobrimos, pelo menos, qual é o caminho a seguir.

Se a vida vai ser algo fácil, difícil ou impossível, isso vai depender de nós mesmos. Aquilo que nem sequer tentamos será sempre impossível. Aquilo que começamos a tentar agora é difícil. E aquilo que já fazemos há muito tempo tornou-se algo fácil.

Autor Desconhecido

À Deus, por ter sempre estado presente em minha vida, e por nunca deixar faltar-me confiança no caminho a ser seguido.

Aos meus pais, José Fernandes (in memoriam) e Telma Trindade por terem me proporcionado o apoio, o carinho e a confiança necessários para seguir a diante.

As minhas irmãs Perla e Bruna e ao meu irmão Júnior pelo incentivo e apoio prestados durante esse período.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin, o qual admiro muito como profissional, pela oportunidade, orientação, apoio, confiança e amizade;

À UNIFAG – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, nas pessoas do Prof. Dr. Eduardo César Meurer e Nilson César Pereira, pelas amostras cedidas e pela amizade;

Ao Centro de Controle de Intoxicação da UNICAMP, na pessoa do Dr. Rafael Lanaro, pelas amostras cedidas;

À Maira Silva Ferreira, minha amiga de coração, pelo incentivo no ingresso do doutorado na UNICAMP, pelo convívio e pelo apoio incondicional nos vários momentos que necessitei de uma palavra amiga ou de um puxão de orelha;

Ao Alamgir Khan, meu amigo paquistanês, que me ensinou que uma amizade verdadeira supera quaisquer obstáculos, quer seja o idioma, os costumes, a religião e a distância.

Aos amigos Leandro Pereira, Wanderson Romão, Boniek Gontijo, Clécio Klitzke, pelo apoio e pela amizade adquirida;

Aos colegas do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, que me receberam como uma verdadeira família;

Aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, em especial a Izabel Aquino Calasso, Gabriela Lima Marques e Miguel da Silva Morel (CPG) pela forma atenciosa e amigável que sempre se dirigiam a minha pessoa nas várias horas que precisei;

À CAPES pela bolsa e auxílio concedidos;

Enfim, a todos que de uma forma direta ou indireta colaboraram com este trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

CURRICULUM VITAE

Raquel Maria Trindade Fernandes

I. Formação Acadêmica

I.1. Graduação

I.1.1. Farmácia

Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís – MA.

Título da Monografia: **Composição físico-química e teores médios de 4-hidroxiprolina nas bexigas natatórias das espécies Cynoscion leiarchus (Pescada Branca), Cynoscion acoupa (Pescada Amarela) e Arius parkeri (Gurijuba).**

Orientador: Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra.

Início: março/1998 a agosto/2001.

I.2. Pós-graduação

I.2.1. Mestrado em Química Analítica

Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís – MA.

Título da Dissertação: **Preparação, Caracterização e Propriedades Elétricas de Membranas de Colágenos Píscios**

Orientador: Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra.

Início: março/2003 a dezembro/2005.

I.2.2. Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas– UNICAMP, Campinas – SP

Título da Tese: **Polímeros de impressão molecular para extração seletiva de drogas em matrizes biológicas e determinação por LC-MS/MS e MS/MS**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

Início: março/2007 a agosto/2012.

II. Produção Científica

II.1. Artigos Publicados Durante o Doutorado

AMARAL, PHELLIPE H.; FERNANDES, R. M. T.; EBERLIN, MARCOS N.; HÖEHR, NELCI F. Direct monitoring of drug degradation by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: the case of enalapril. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 46, p. 1269-1273, 2011.

FERNANDES, R.M.T.; GOMES, G.C.; PORCARI, A.M.; PIMENTEL, J.R.V.; PORCIÚNCULA, P.M.; MARTINS-JÚNIOR, H.A.; MIGUEZ, P.H.P.; COSTA, J.L. DA; AMARAL, P.H.; PERECIN, F.; MEURER, E.C.; FURTADO, P.V.; SIMAS, R.C.; EBERLIN, M.N.; FERREIRA, C.R.; MADUREIRA, E.H. LC-MS/MS quantitation of plasma progesterone in cattle. *Theriogenology*, v. 76, p. 1266-1274, 2011.

FERNANDES, R.M.T.; COUTO NETO, R.G.; PASCHOAL, C.W.A.; ROHLING, J.H.; BEZERRA, C.W.B. . Collagen films from swim bladders: Preparation method and properties. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, v. 62, p. 17-21, 2008.

II.2. Participação em Eventos Técnico Científicos Durante o Doutorado

FERNANDES, R.M.T.; LANARO, R.; EBERLIN, M.N. Development of a online MISPE-MS/MS method for Cocaine and its metabolites in human urine. In: 4 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas – BrMASS, 2011, Campinas.

PORCIÚNCULA, P.M.; FERNANDES, R.M.T. ; PORCARI, A.M.; PIMENTEL, J.R.V.; MIGUEZ, P.H.P.; SIMAS, R.C. ; FERREIRA, C.R.; COSTA, J.L.; AMARAL, P.; EBERLIN, M.N.; MADUREIRA, E.H. Analytical method for progesterone quantitation in bovine serum by LC-MS/MS. In: XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2010, Porto de Galinhas. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2010. v. 38. p. s735-s735.

FERNANDES, R.M.T.; MEURER, E.C.; CALAFATTI, S.A.; PEDRAZZOLI JR, J.; EBERLIN, M.N. Síntese, caracterização e aplicação de MIP como sorbente em extração em fase sólida para extração de omeprazol em plasma humano. In: 33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 33 RASBQ, 2010.

RESUMO

Título: “Polímeros de Impressão Molecular para Extração Seletiva de Fármacos em Matrizes Biológicas e Determinação por LC-MS/MS e MS/MS”

Autora: Raquel Maria Trindade Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Palavras-chave: Polímeros de impressão molecular, omeprazol, cocaína, matrizes biológicas e espectrometria de massas.

O presente trabalho descreve a utilização de polímeros de impressão molecular (MIP) no preparo de amostra para a extração seletiva de fármacos em matrizes biológicas com determinação por LC-MS/MS e MS/MS.

Inicialmente foi sintetizado e caracterizado um MIP seletivo a omeprazol, sendo o mesmo empregado na extração com fase sólida molecularmente impressa (MISPE) de omeprazol em amostras de plasma humano, seguido de determinação por LC-MS/MS. A metodologia foi validada por meio do estudo dos parâmetros: precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), curva analítica, intervalo de linearidade, limite de detecção – LD e limite de quantificação – LQ, e seletividade. O limite de quantificação obtido foi de 5 ng mL⁻¹.

Posteriormente, foi sintetizado e caracterizado um MIP seletivo a cocaína, sendo este empregado na extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) *online* de cocaína em amostras de urina de usuários de drogas, seguido da quantificação por MS/MS. O limite de quantificação obtido foi de 10 ng mL⁻¹. A seletividade do método foi avaliada pelo estudo de adsorção de metabólitos (benzoilecgonina e cocaetileno) e interferente (lidocaína) pelo polímero sintetizado e posterior determinação por MS/MS.

ABSTRACT

Title: “Molecularly Imprinted Polymer for Selective Extraction of Drugs in Biological Matrices by LC-MS/MS and MS/MS”

Author: Raquel Maria Trindade Fernandes

Adviser: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Keywords: Molecularly imprinted polymer, omeprazole, cocaine, biological matrices and mass spectrometry.

The present work describes the applications of molecularly imprinted polymers (MIP) in sample preparation for the selective extraction of drugs in biological matrices by LC-MS/MS and MS/MS.

Initially a MIP selective for omeprazole was synthesized and characterized. It was used in molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) of omeprazole from human plasma samples, followed by LC-MS/MS determination. The methodology was validated by studying the parameters: precision (repeatability and intermediate precision), accuracy (recovery), calibration curve, linear range, detection limit - LOD and quantification limit - LOQ, and selectivity. The quantification limit was 5 ng mL⁻¹.

Subsequently a MIP selective for cocaine was synthesized and characterized which was used in online molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) for cocaine in urine samples of drug users, followed by quantification by MS / MS. The quantification limit was 10 ng mL⁻¹. The selectivity of the method was evaluated by studying the adsorption of metabolites (benzoylecgonine and cocaethylene) and an interferent (lidocaine) by the synthesized polymer with subsequent determination by MS / MS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AA	- ácido acrílico
ABDV	- azo-bis-dimetilvaleronitrila
ACN	- acetonitrila
AEME	- éster metil anidro ecgonina
AIBN	- 2,2'-azo-bis-isso-butironitrila
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i>
BET	- Brunauer-Emmett-Teller
BPO	- peróxido de benzoíla
BZE	- benzoilecgonina
CAD	- <i>collision-activated dissociation</i>
CCD	- cromatografia em camada delgada
CID	- <i>collisional induced dissociation</i>
COE	- cocaetileno
CQA	- controle de qualidade alto
CQB	- controle de qualidade baixo
CQM	- controle de qualidade médio
DC	- corrente contínua
DIP	- diisopropenil benzeno
DRGE	- doença de refluxo gastroesofágico
EASI	- <i>easy ambient sonic-spray ionization</i>
ECG	- ecgonina
EGDMA	- etilenoglicol dimetacrilato
EI	- <i>electron ionization</i>
EME	- éster metilecgonina
ESI	- <i>electrospray</i>
FT-IR	- infravermelho com transformada de Fourier
GC	- cromatografia gasosa

2-HEMA	- 2-hidroxietilmetacrilato
HPLC	- cromatografia líquida de alta eficiência
IBP	- inibidores da bomba de prótons
ICR	- ressonância ciclotrônica de íons
IT	- íon trap
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada
LC	- cromatografia líquida
LLE	- extração líquido-líquido
LD	- limite de detecção
LQ	- limite de quantificação
LSD	- dietilamida ácido lisérgico
MAA	- ácido metacrílico
MALDI	- <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MeOH	- metanol
MEV	- microscopia eletrônica de varredura
MIP	- polímero de impressão molecular
MISPE	- extração em fase sólida molecularmente impressa
MRC	- material de referência certificado
MRM	- Monitorização de reações múltiplas
MS	- espectrometria de massas
<i>m/z</i>	- razão massa / carga
NIP	- polímero não impresso
QqQ	- triplo quadrupolo
RF	- radiofrequência
RIA	- radioimunoensaio
RPM	- rotações por minuto
RSD	- desvio padrão relativo
SNC	- sistema nervoso central
SPE	- extração em fase sólida
SPME	- microextração em fase sólida
TDMA	- tetrametileno dimetacrilato

TEM	- temperatura de dessolvatação
TFMAA	- ácido trifluorometilacrílico
TOF	- tempo de voo
TRIM	- trimetilpropano trimetacrilato
UNIFAG	- Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia
USF	- Universidade São Francisco
UV	- ultravioleta
4-VP	- 4-vinilpiridina

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	XXVII
------------------	-------

LISTA DE FIGURAS	XXIX
------------------	------

Capítulo I – Introdução Geral	1
-------------------------------	---

I.1 Introdução	3
----------------	---

I.2 Polímeros de Impressão Molecular	4
--------------------------------------	---

I.2.1 Estratégias de Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular	6
---	---

I.2.2 Aplicações	15
------------------	----

I.3 Espectrometria de Massas	19
------------------------------	----

I.3.1 Ionização a Pressão Atmosférica por <i>Electrospray</i> (ESI-MS)	21
--	----

I.3.2 Analisadores para Espectrometria de Massas	24
--	----

I.3.3 Aplicações de Polímeros de Impressão Molecular acoplado à Espectrometria de Massas	27
--	----

Capítulo II – MISPE-LC-MS/MS para Determinação de Omeprazol em Plasma Humano	31
--	----

II.1 Introdução	33
-----------------	----

II.2 Omeprazol	34
----------------	----

II.3 Objetivos	36
----------------	----

II.4 Parte Experimental	37
-------------------------	----

II.4.1 Reagentes	37
------------------	----

II.4.2 Amostras	37
-----------------	----

II.4.3 Síntese do Polímero de Impressão Molecular	38
---	----

II.4.4 Caracterização dos Polímeros	38
II.4.5 Determinação do Omeprazol por LC-MS/MS	40
II.4.6 Estudos de Adsorção	40
II.4.7 Otimização do MISPE	40
II.4.8 Validação do Método Analítico	42
II.5 Resultados e Discussão	44
II.5.1 Caracterização dos Polímeros	44
II.5.2 Determinação do Omeprazol por HPLC-MS/MS	49
II.5.3 Estudos de Adsorção	51
II.5.4 Otimização do MISPE	53
II.5.5 Validação do Método Analítico	59
II.5.6 Aplicação do Método	66
II.6 Conclusões	68
 Capítulo III – MISPE-MS/MS para Determinação de Cocaína em Urina Humana	 69
III.1 Introdução	71
III.2 Cocaína	72
III.3 Objetivos	75
III.4 Parte Experimental	76
III.4.1 Reagentes	76
III.4.2 Amostras	76
III.4.3 Síntese do Polímero de Impressão Molecular	77
III.4.4 Medidas de Infravermelho	77
III.4.5 Medidas de Ressonância Magnética	78

III.4.6 Medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura	78
III.4.7 Medidas de Área Superficial Específica (S_{BET})	78
III.4.8 medidas de Volume Específico e Diâmetro Médio dos Poros	79
III.4.9 Sistema MISPE <i>online</i>	79
III.4.10 Determinação de Cocaína por MS/MS	79
III.5 Resultados e Discussão	81
III.5.1 Infravermelho com Transformada de Fourier	81
III.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C	82
III.5.3 Microscopia de Varredura Eletrônica	83
III.5.4 Porosimetria de Sorção de Nitrogênio	83
III.5.5 Determinação de Cocaína por MS/MS	84
III.5.6 Aplicação do Método MISPE <i>online</i> -MS/MS	86
III.6 Conclusões	96
 Capítulo IV – Referências Bibliográficas	 97

LISTA DE TABELAS

Capítulo I – Introdução Geral

I.1 Estruturas de monômeros funcionais utilizados no preparo de MIP, de acordo com suas características químicas	10
I.2 Exemplos de aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais utilizando MISPE	18
I.3 Modos de operação de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo	27
I.4 Exemplos de aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais utilizando polímeros de impressão acoplada a espectrometria de massas	29

Capítulo II – MISPE-LC-MS/MS para Determinação de Omeprazol em Plasma Humano

II.1 Porosimetria do polímeros MIP e NIP	48
II.2 Omeprazol adsorvido nos polímeros MIP e NIP (mg g^{-1})	52
II.3 Parâmetros de validação do método de determinação de omeprazol em plasma humano por MISPE-LC-MS/MS	66
II.4 Parâmetros farmacocinéticos obtidos através da curva de concentração <i>versus</i> tempo	67

Capítulo III – MISPE-MS/MS para Determinação de Cocaína em Urina Humana

III.1 Programação dos eluentes utilizados no MISPEonline-MS/MS	80
III.2 Porosimetria dos polímeros MIP e NIP	84
III.3 Resultados obtidos pelo método MISPEonline-MS/MS para cocaína e metabólitos em urina de usuários	94

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I – Introdução Geral

I.1 Esquema representando o processo de síntese do MIP	7
I.2 Estruturas químicas de reagentes de ligação cruzada utilizados na impressão molecular. (a) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA); (b) p-divinilbenzeno; (c) tetrametileno dimetacrilato (TDMA); (d) N,O,bisacriloil-L-fenilalaninol; (e) 1,3 diisopropenil benzeno (DIP); (f) 2,6 bisacriloilamidopiridina; (g) 1,4 fenileno diacrilamina; (h) anidroeritrol dimetacrilato; (i) N,N' metileno bisacrilamida; (j) 1,4 diacrilol; (l) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) e (m) isopropilenebis (1,4-fenileno) dimetacrilato	11
I.3 Estruturas moleculares de iniciadores radicalares empregados na síntese de MIP. (a) 2,2'-azo-bis-isso-butironitrila (AIBN); (b) azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzíla; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico)	13
I.4 Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas	20
I.5 Esquema do processo de ionização por ESI	23
I.6 Esquema representativo de um analisador do tipo quadrupolo	25
I.7 Detalhes do espectrômetro tipo triplo quadrupolo	26

Capítulo II – MISPE-LC-MS/MS para Determinação de Omeprazol em Plasma Humano

II.1 Estrutura química do omeprazol	34
II.2 Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP	45
II.3 ^{13}C CP-MAS NMR do MIP (a) e NIP (b)	46
II.4 Imagem de microscopia de varredura eletrônica dos polímeros MIP e NIP. Aumentos de 5000 e 40000 x	47
II.5 Espectro de massas ESI-MS do omeprazol (100 ng mL^{-1} em MeOH)	49

II.6 Espectro de fragmentação do omeprazol	50
II.7 Proposta de rota de fragmentação do omeprazol	50
II.8 Isotermas de adsorção do omeprazol pelos polímeros MIP e NIP	53
II.9 Perda de omeprazol em função da quantidade de etapas e do solvente de lavagem	55
II.10 Porcentagem de omeprazol recuperado após as etapas de lavagem com acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e eluição com diversos tipos de solventes	56
II.11 Estrutura química do pantoprazol (a) e lansoprazol (b).	57
II.12 Cromatogramas de HPLC-MS/MS correspondente a extração de solução metanólica contendo omeprazol, pantoprazol e lansoprazol utilizando os polímeros MIP e NIP	58
II.13 Cromatogramas de HPLC-MS/MS correspondente a extração de amostra branco de plasma (em detalhe) e amostra branco de plasma fortificada com omeprazol a 5 ng mL⁻¹, utilizando o MISPE no preparo de amostra	60
II.14 Esquema geral da etapa de preparo de amostra utilizando MISPE para extração de omeprazol de plasma humano	61
II.15 Curvas analíticas obtidas para a determinação de omeprazol em plasma humano utilizando o método MISPE-LC-MS/MS em três dias diferentes	62
II.16 Curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo de três voluntários de um estudo farmacocinético	67

Capítulo III – MISPE-MS/MS para Determinação de Cocaína em Urina Humana

III.1 Estrutura química da cocaína	72
III.2 Principais metabólitos da cocaína. Cocaetileno (COE), norcocaína (NOR), benzoilecgonina (BZE), éster metilecgonina (EME) e ecgonina (ECG)	73

III.3 Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP	81
III.4 ^{13}C CP-MAS NMR do MIP (a) e NIP (b)	82
III.5 Imagem de microscopia de varredura eletrônica dos polímeros MIP e NIP. Aumento de 40000 x	83
III.6 Proposta de rota de fragmentação da cocaína	84
III.7 Espectro de fragmentação da cocaína	85
III.8 Curvas analíticas obtidas para a determinação de cocaína em urina humana utilizando o método MISPEonline-MS/MS em três dias diferentes	86
III.9 Espectro de amostra de urina analisada por <i>Scan MS</i>. Amostra diluída 1:100 (MeOH)	87
III.10 Espectro de amostra de urina analisada pelo método MISPEonline-MS/MS	88
III.11 Espectro de fragmentação da benzoilecgonina	89
III.12 Espectro de fragmentação do cocaetileno	90
III.13 Espectro de fragmentação da lidocaína	90
III.14 Espectro no modo MRM correspondente a extração de amostra de urina contendo cocaína, os metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno, utilizando os polímeros MIP e NIP	91
III.15 Monitoramento das moléculas cocaína e lidocaína durante o método MISPEonline-MS/MS	92
III.16 Sinais MRM de multi-injeções do limite de quantificação em matriz (10 ng mL⁻¹) pelo método MISPEonline-MS/MS	93
III.17 Espectro da amostra A8 antes da análise pelo método MISPEonline-MS/MS	95

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

I.1 Introdução

Uma questão crucial na química analítica é a seletividade, sobretudo quando o analito de interesse encontra-se em baixa concentração ou na presença de matrizes complexas. Por isso, o desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos é de fundamental importância. Dentre as técnicas analíticas amplamente empregadas para análise de substâncias químicas nos mais diferentes ambientes, como nas indústrias alimentícia, farmacêutica, biotecnológica, no meio ambiente, e no diagnóstico de doenças, pode-se destacar a Cromatografia acoplada à Espectrometria de Massas. Porém em várias situações rotineiras, é necessária a introdução de uma etapa pré-cromatográfica na metodologia analítica, com o objetivo de eliminar interferentes que podem comprometer o sistema cromatográfico. Essa etapa é conhecida como Preparo de Amostras, e emprega diferentes procedimentos a fim de converter uma amostra bruta representativa em uma forma apropriada para a análise química.

O preparo de amostras ideal deve ser rápido e conveniente, apresentando perdas mínimas dos analitos e baixo custo de análise. É a etapa mais crítica envolvida na análise de misturas presentes em matrizes complexas, uma vez que é a etapa que mais consome tempo e onde é a possível fonte de imprecisão e inexatidão (MAJORS, 1996).

Um dos métodos rotineiros mais utilizados no preparo de amostras é a extração por intermédio de solventes (extração líquido-líquido, LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*). Esta se baseia na solubilidade dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis (WANG *et al.*, 2005). A LLE requer solventes orgânicos, é de difícil automação, possui baixa seletividade e existe a necessidade de solventes ultrapuros para a análise (HUCK & BONN, 2000). Uma possível alternativa para minimizar esses problemas tem sido a utilização da Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*). Comparado com a LLE, a SPE pode reduzir o tempo de extração, bem como o

consumo de solventes. Consequentemente, a SPE é uma das técnicas de preparo de amostras que tem sido muito utilizada atualmente (HENNION, 1999).

Os Polímeros de Impressão Molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) têm se destacado como materiais promissores para aplicação em extração em fase sólida (SPE). Eles são obtidos através da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos, o que se deve ao arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor da molécula molde (HAUPT, 2001; XU *et al.*, 2004; MASQUÉ *et al.*, 2001). Com base no exposto, a seguir são descritas as estratégias que têm sido empregadas para o uso e desenvolvimento desses polímeros com impressão molecular.

I.2 Polímeros de Impressão Molecular

O reconhecimento específico molecular é um requisito fundamental dos sistemas vivos. Assim, não é surpreendente que os cientistas ao longo dos anos tenham investido grandes somas de tempo e esforço na tentativa de mimetizar funções biológicas responsáveis pela seletividade inerente às interações enzima-substrato, antígeno-anticorpo e fármaco-receptor.

O conceito de impressão molecular para formação de anticorpos, processo no qual um antígeno era usado como molécula molde para dar forma à cadeia polipeptídica de anticorpos, surgiu a partir da teoria de Pauling (PAULING, 1940). Desta concepção, idealizou-se produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular.

Cronologicamente, o primeiro resultado positivo no uso de polímeros impressos, foi obtido em 1971, por Günter Wulff e seu estudante Ali Sarhan, o qual

descrevia a síntese de um polímero enantioseletivo para o ácido glicérico, onde as interações entre a molécula e os monômeros funcionais eram de natureza covalente. A principal característica desses polímeros era sua alta seletividade, como consequência da boa interação entre os monômeros funcionais e a molécula molde. Contudo, cabe ressaltar que o processo de retirada da molécula molde do sítio de ligação mostrou-se difícil, sendo necessário, em alguns casos, o emprego de condições drásticas de hidrólise. Este trabalho foi apresentado no anual “Freiburger Makromolekulares Kolloquium” (1972), um encontro para cientistas acadêmicos e industriais de polímeros(WULFF & SARHAN, 1972). Os resultados deste trabalho provocaram várias discussões, dividindo a plateia em dois grupos, os que gostaram da ideia e os que não acreditaram nos resultados obtidos (YAN & RAMSTRÖM, 2005).

Em 1972, Wulff escreveu sua primeira patente sobre impressão, embora esta não tenha sido publicada antes de 1974. Este material esboçou muitos conceitos do método de impressão molecular, incluindo polimerização de radicais livres, condensação e adição para dar forma a poliuretanos. Apresentava também, exemplos usando interações covalentes e não covalentes(YAN & RAMSTRÖM, 2005).O primeiro artigo acadêmico sobre a síntese de polímeros impressos foi publicado por Wulff *et al.* (1973), onde o próprio autor o considera como a publicação mais importante do seu grupo, desde que expôs o princípio que sustenta o conceito de impressão molecular(YAN & RAMSTRÖM, 2005).

Na década de 1980, Arshady e Mosbach (1981) reportaram o primeiro artigo sobre um MIP que interagiu com a molécula molde por meio de ligações não covalentes, permitindo que o processo de desligamento fosse suscetível a fatores como modificação de pH, força iônica, solvente, dentre outros. Por fim, Whitcombe *et al.* (1995) propuseram um novo MIP, onde a molécula molde e o monômero funcional interagiam por ligações covalentes no momento da síntese e, por ligações não covalentes no momento de re-ligação (outras ligações da molécula molde com o sítio do MIP). Após a síntese, era necessária uma hidrólise para retirada da molécula molde do sítio do MIP, permanecendo, nesse local, grupos

ligantes capazes de interagir não covalentemente com a molécula molde de futuras interações. Dessa forma, foi possível associar vantagens inerentes às metodologias de síntese covalente e não covalente.

A partir daí, observou-se um aumento exponencial do número de trabalhos utilizando os MIP na etapa de preparo de amostras, como a extração em fase sólida (SPE)(KAABI & PICHON, 2007) e microextração em fase sólida (SPME)(DJOZAN & BAHERI, 2007);em técnicas de separação, atuando com material de preenchimento de superfícies e colunas cromatográficas(PUOCI *et al.*, 2008; OGISO *et al.*, 2006; SCHMID *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2006). São também empregados em outros campos de pesquisa, tais como: eletroanalítica (KAMEL *et al.*, 2008) e desenvolvimento de biossensores (GAO *et al.*, 2007).

I.2.1 Estratégias de Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular

O processo geral de síntese de um MIP consiste na interação de uma molécula utilizada como molde com as moléculas de monômeros funcionais por meio de ligações covalentes e/ou não covalentes e posterior adição ao meio de um reagente de ligação cruzada, a fim de formar uma matriz polimérica rígida. A reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar.

Após a polimerização, a molécula molde é removida da matriz polimérica por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares ao tamanho e forma do analito, as quais são capazes de reter seletivamente a molécula molde e/ou substâncias com estrutura semelhante a ele, presente numa amostra complexa (TARLEY *et al.*, 2005; TURIEL & MARTIN-ESTEBAN, 2004; TAMAYO *et al.*, 2005; TOTH *et al.*, 2007; DONG *et al.*, 2007;YOSHIMATSU *et al.*, 2007). Esse princípio da impressão molecular é mostrado na **Figura I.1**.

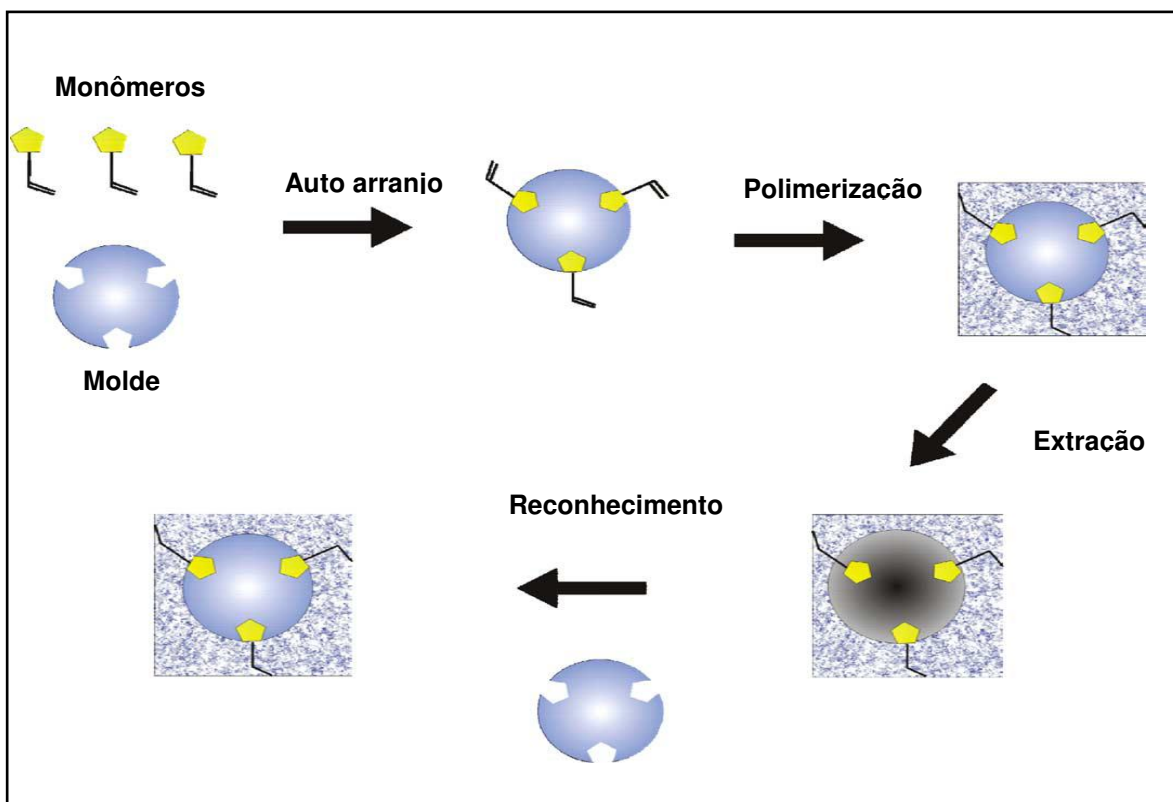


Figura I.1 – Esquema representando o processo de síntese do MIP. Adaptado de MAHONY *et al.*, 2005.

Em todos os processos de impressão molecular, inicialmente é feita a avaliação da estrutura da molécula que será utilizada como molde, pois na maioria das vezes, este composto é o analito de interesse. Com base nesta avaliação, é direcionada a organização dos grupos funcionais do molde que permitam a interação com algum tipo de monômero funcional, a fim de formar uma espécie de complexo estável. No entanto, para uma variedade de reações, nem todos os “moldes” são diretamente favoráveis ao modelamento. Em termos de compatibilidade com a polimerização, os moldes devem preferencialmente ser quimicamente inertes sob as condições de polimerização. Assim, se o molde apresentar reações radiculares ou reações instáveis sob as condições da polimerização, estratégias de impressão alternativa devem ser pesquisadas. No

momento da escolha da molécula que servirá de molde no preparo do polímero de impressão, deve-se verificar: 1) se o molde possui algum grupo funcional polimerizável; 2) se o molde possui grupos funcionais que podem inibir ou retardar potencialmente a reação de polimerização e 3) se o molde é estável a temperaturas moderadamente elevadas (por exemplo, em torno de 60 °C, para o caso de utilizar o reagente azo-bis-isobutironitrila - AIBN como iniciador químico) ou expostas à radiação ultravioleta (UV)(CORMACK & ELORZA, 2004).

Os monômeros funcionais são responsáveis pelas interações das ligações químicas nos sítios impressos. É claramente importante combinar os grupos funcionais do molde com os grupos funcionais do monômero em uma forma complementar, a fim de favorecer a formação do complexo, como também a impressão resultante (CORMACK & ELORZA, 2004). Assim sendo, moléculas-molde que possuem grupos funcionais básicos interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, e vice-versa (TARLEY *et al.*, 2005).

As interações químicas entre o molde e o monômero podem se dar por meio de ligação covalente ou não covalente, por meio de ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica, interação hidrofóbica ou por transferência de carga (TARLEY *et al.*, 2005; SPIVAK, 2005).

Polímeros preparados por ligação covalente possuem sítios mais seletivos, dada a uniformidade gerada pelos mesmos. Porém, quando esta estratégia é adotada, a necessidade de monômeros e analitos que estabeleçam ligações covalentes restringem a aplicabilidade dos MIP para poucos analitos. Adicionalmente, estudos têm mostrado que tais polímeros apresentam uma cinética lenta de retenção dos analitos na cavidade do polímero (AL-KINDY *et al.*, 2000).

Em contrapartida, polímeros preparados a partir de ligações não-covalentes freqüentemente apresentam diâmetro de partículas e sítios seletivos menos uniformes. Porém, apesar destas desvantagens, esta abordagem de

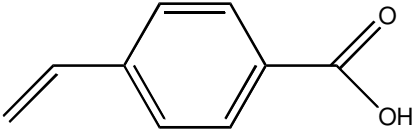
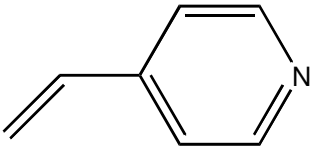
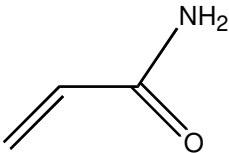
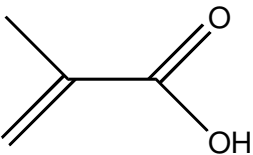
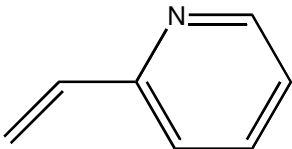
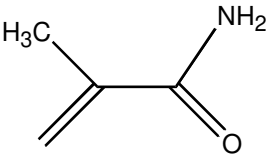
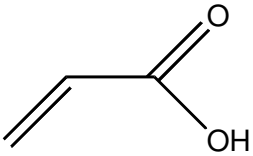
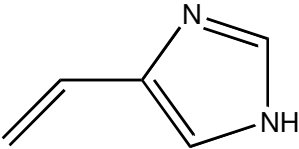
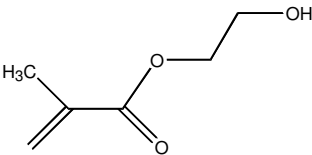
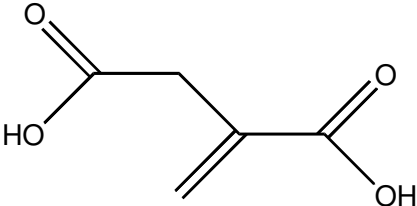
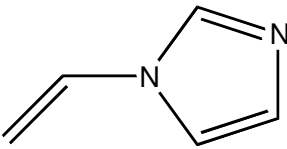
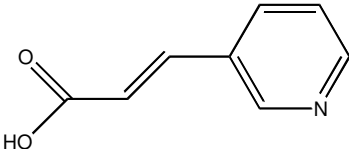
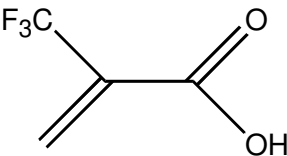
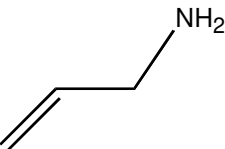
preparo é mais utilizada, dada a maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes analitos e a facilidade de eluição (ANDERSSON *et al.*, 1984).

Como descrito anteriormente, as interações são responsáveis pela formação do complexo molde-monômero funcional durante a síntese do MIP. Este complexo obedece ao princípio de Le Chatelier. Assim, quantidades superiores do monômero em relação ao analito (geralmente 4:1), devem ser empregadas com intuito de deslocar o equilíbrio, a fim de formar uma maior quantidade de sítios específicos de reconhecimento (TARLEY *et al.*, 2005; CORMACK & ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005). Quando dois ou mais monômeros funcionais são utilizados simultaneamente no processo de polimerização, é importante verificar a razão da reatividade dos monômeros, a fim de assegurar que a copolimerização seja realizada, pois a complexação do molde pelo monômero funcional pode influenciar na reatividade do co-monômero, devido ao resultado de perturbações eletrônicas e/ou estéricas do monômero (CORMACK & ELORZA, 2004).

Existem vários monômeros funcionais com estruturas químicas e polaridades diversas disponíveis comercialmente e muitos outros podem ser sintetizados. A **Tabela I.1** apresenta as estruturas químicas de uma seleção dos mais importantes monômeros funcionais.

Em um polímero impresso, o reagente de ligação cruzada cumpre três funções majoritárias: é importante no controle da morfologia da matriz polimérica, a qual pode ser do tipo gel, pó macroporoso ou microporoso; serve para estabilizar o sítio de ligação impresso e fornece a estabilidade mecânica à matriz do polímero. Muito foi escrito sobre a proporção dos reagentes de ligação cruzada durante a síntese. Porém, o que se pode concluir, sob o ponto de vista da polimerização, é que razões elevadas de reagente de ligação cruzada são geralmente preferidas para formação de materiais porosos (macroporosos), e capazes de gerar materiais com estabilidade mecânica adequada (CORMACK & ELORZA, 2004). Polímeros com razões de reagente de ligação cruzada em excesso de 80 % são frequentemente normais (CORMACK & ELORZA, 2004 e SPIVAK, 2005).

Tabela I.1 – Estruturas de monômeros funcionais utilizados no preparo de MIP, de acordo com suas características químicas.

Ácido	Básico	Neutro
Ácido p-vinilbenzóico 	4-Vinilpiridina 	Acrilamida 
Ácido metacrílico (MAA) 	2-Vinilpiridina 	Metacrilamida 
Ácido acrílico (AA) 	4-Vinilimidazol 	2-hidroxietilmetacrilato (2-HEMA) 
Ácido Itacônico 	1-Vinilimidazol 	Ácido T-3-(3-piridina)- acrílico 
Ácido trifluorometilacrílico (TFMAA) 	Alilamina 	

Um grande número de reagentes de ligação cruzada é compatível com impressão molecular. Alguns são capazes de complexar simultaneamente com o molde e, assim, atuar como monômeros funcionais. As estruturas químicas de alguns reagentes de ligação cruzada bem conhecidos são apresentadas na **Figura I.2**.

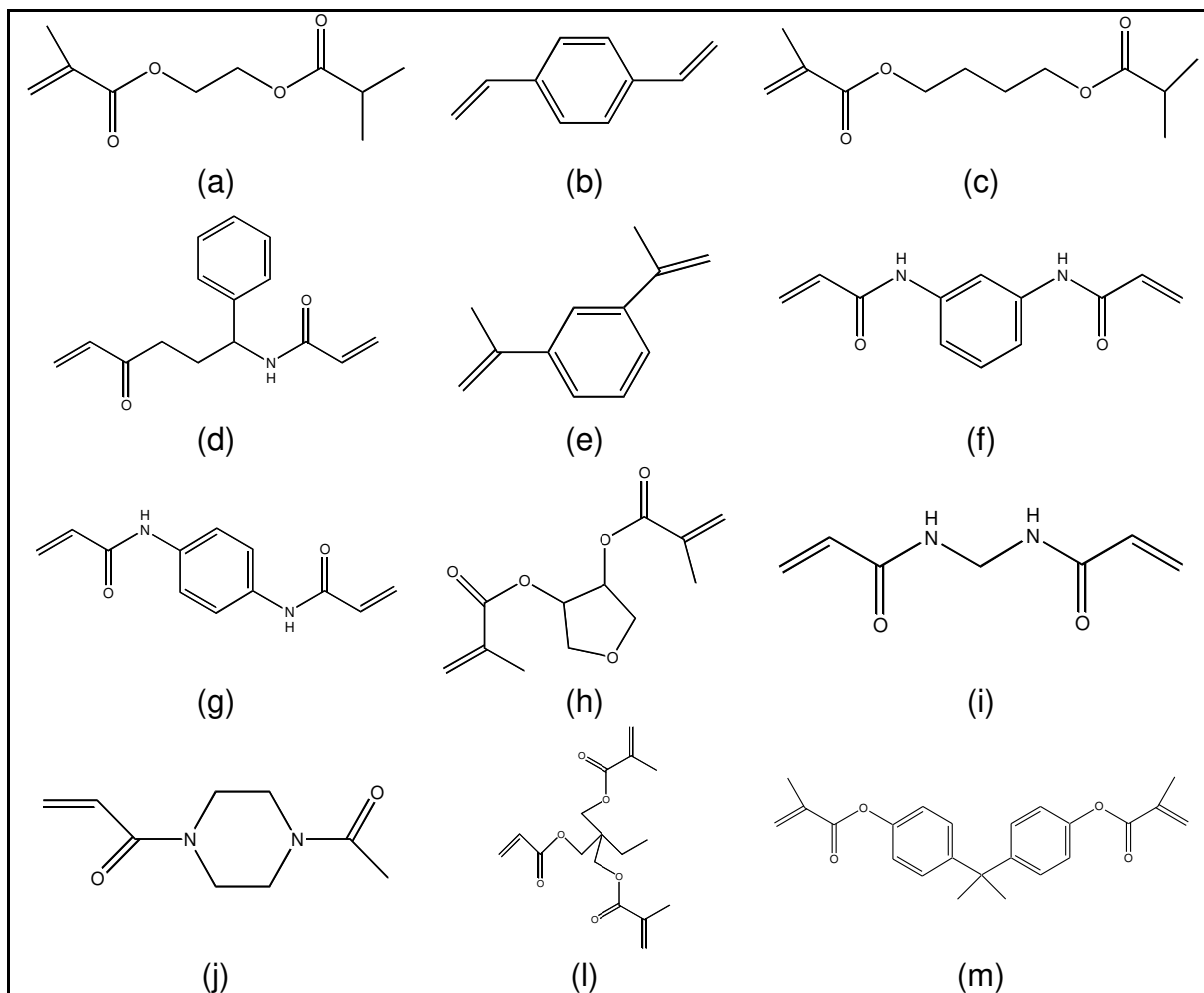


Figura I.2 – Estruturas químicas de reagentes de ligação cruzada utilizados na impressão molecular. (a) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA); (b) p-divinilbenzeno; (c) tetrametileno dimetacrilato (TDMA); (d) N,O,bisacriloil-L-fenilalaninol; (e) 1,3 diisopropenil benzeno (DIP); (f) 2,6 bisacriloilamidopiridina; (g) 1,4 fenileno diacrilamina; (h) anidroeritrotol dimetacrilato; (i) N,N' metileno bisacrilamida; (j) 1,4 diacrilol; (l) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) e (m) isopropilenebis (1,4-fenileno) dimetacrilato.

Contudo, cabe destacar que o etileno glicol dimetacrilato tem sido o reagente de ligação cruzada mais largamente empregado, devido à formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa.

O solvente é outro parâmetro importante na síntese de MIP, sendo que sua função é deixar solúvel todos os componentes da polimerização, isto é, molde, monômero funcional, reagente de ligação cruzada e iniciador. No entanto, ele não deve interferir na interação molde-monômero, uma vez que tal interferência pode conduzir à formação de sítios de ligação pouco seletivos e de pequeno número. Além desta função, o solvente também é responsável pela criação dos poros nos polímeros macroporosos. Por este motivo, é completamente comum referir-se ao solvente como porogênico. Quando polímeros macroporosos estão sendo preparados, a natureza e quantidade do porogênico podem ser utilizados para controlar a morfologia e o volume total do poro. Especificando, se é utilizado um solvente termodinamicamente favorável, a tendência é produzir polímeros com estrutura de poro bem desenvolvida e com alta área superficial específica; ao contrário, utilizando um solvente desfavorável termodinamicamente, um polímero pouco poroso e com pequena área superficial específica é obtido, os quais apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular, devido basicamente à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos. Conclui-se, portanto, que aumentando o volume de solvente (porogênico), aumenta-se o volume dos poros (TARLEY *et al.*, 2005; CORMACK & ELORZA, 2004).

Além de seu duplo papel, como solvente e como um agente de formação de poro, na polimerização impressa não covalente, o solvente deve ser escolhido com critério, para que ele possa maximizar a probabilidade da formação do complexo molde-monômero funcional. Assim, solventes apolares, apróticos, por exemplo, tolueno e clorofórmio, são preferidos como solventes pois não interferem nas interações ocorridas por meio de forças eletrostáticas e por ligação de hidrogênio. Entretanto, se forças hidrofóbicas estão sendo utilizadas para a

formação do complexo, metanol e água podem ser os solventes de escolha (TARLEY *et al.*, 2005; CORMACK & ELORZA, 2004).

A reação de polimerização do reagente de ligação cruzada em torno do complexo molde-monômero funcional deve ocorrer na presença de um iniciador radicalar, o qual sofre uma quebra homolítica em sua estrutura, desencadeada por estímulos físicos como temperatura e/ou radiação UV, a fim de gerar radicais que iniciem o mecanismo da reação de polimerização. A escolha do iniciador deve ser ditada pelas propriedades físico-químicas do molde. Por exemplo, se um molde for fotoquimicamente ou termoquimicamente instável, logo, iniciadores que podem reagir fotoquimicamente e termoquimicamente, respectivamente, não devem ser selecionados. Se a interação ocorrer por ligação de hidrogênio, a polimerização deve ser feita em baixas temperaturas, e nestas circunstâncias, os iniciadores ativos fotoquimicamente são mais indicados (TARLEY *et al.*, 2005; CORMACK & ELORZA, 2004). O 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) é o mais empregado na síntese dos MIP, porém outros também podem ser utilizados (**Figura I.3**).

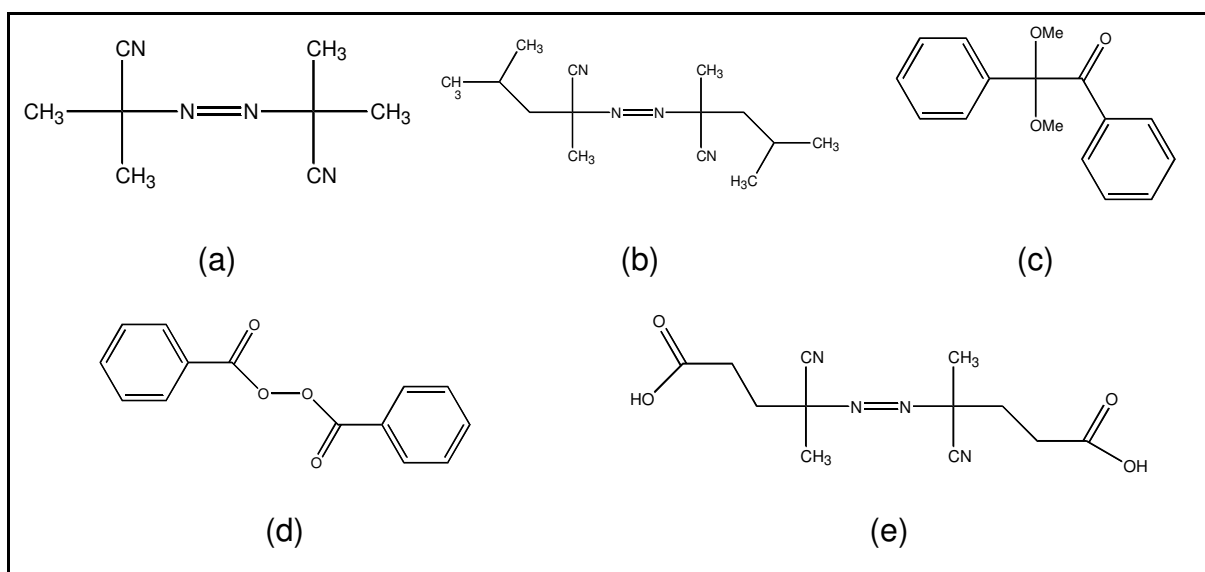


Figura I.3 – Estruturas moleculares de iniciadores radiculares empregados na síntese de MIP. (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzíla; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).

Cronologicamente, o primeiro método de polimerização empregado para sintetizar polímeros de impressão molecular, foi baseado na polimerização em solução “*bulk*” (PAULING, 1940). Este é considerado o método universal de preparo dos MIP, basicamente devido a sua simplicidade (TARLEY *et al.*, 2005; TURIEL & MARTIN-ESTEBAN, 2004; PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004). A reação é realizada em sistemas homogêneos, utilizando exclusivamente, solventes orgânicos e consiste na mistura de todos os componentes (molde, monômero funcional, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador) e posterior polimerização dos mesmos (elevado tempo reacional – ca de 20 h). O resultado é um bloco polimérico (monólito), o qual deve ser triturado, moído e peneirado para a obtenção de partículas de forma e porosidade irregulares e o tamanho, variando de 20 a 150 μm . Este processo além de demorado implica numa considerável perda de material (uma estimativa de 70 %) durante o processo de moagem, uma vez que alguns sítios específicos formados são parcialmente destruídos, diminuindo assim, a capacidade seletiva de retenção do polímero (TARLEY *et al.*, 2005; PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004; YILMAZ *et al.*, 2002). Outra desvantagem é a produção de áreas heterogêneas na matriz polimérica, resultante da falta de controle durante o processo de polimerização, em particular, quando a iniciação radicalar por UV é utilizada (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004).

Desta forma, os MIP obtidos pelo método de polimerização em “*bulk*” são mais indicados para técnicas de extração como a SPE (QIAO *et al.*, 2006), ao passo que seu uso é desfavorável como fase estacionária em HPLC, pois a heterogeneidade das partículas reduz a eficiência cromatográfica, além de se observar em alguns casos, elevadas contrapressões e baixa transferência cinética de massa (TARLEY *et al.*, 2005; TURIEL & MARTIN-ESTEBAN, 2004 e YILMAZ *et al.*, 2002).

Diante destas considerações, novas concepções de preparo de MIP são relatadas na literatura, com intuito de produzir partículas com tamanhos uniformes. Ao contrário do método de polimerização em “*bulk*”, cuja síntese é realizada num sistema homogêneo, a maioria dos novos métodos de preparo contemplam

reações em sistemas heterogêneos. Entre eles podemos citar a polimerização por suspensão (MAYES & MOSBACH, 1996), por expansão em multietapas (HOSOYA *et al.*, 1994), por precipitação (YE *et al.*, 1999) e por sol-gel (DICKY, 1955).

Além destes, existem os métodos de preparo que apresentam reações de polimerização sobre uma superfície de suporte sólido (YILMAZ *et al.*, 2000) e reações de polimerização dentro dos poros de sólidos (YILMAZ *et al.*, 2002). Estes métodos de preparo de MIP são conhecidos por polimerização em suporte.

I.2.2 Aplicações

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica amplamente empregada na extração e concentração de analitos quando os mesmos estão presentes em baixos níveis de concentração, na remoção de compostos interferentes em matrizes complexas e na mudança do meio de solubilização de um analito antes de sua análise cromatográfica. Sendo assim, a SPE é considerada a técnica mais importante para a preparação de amostras (CARO *et al.*, 2006). Porém, sorventes típicos de extração em fase sólida possuem, em algumas situações, baixa seletividade e isto pode se tornar um grande empecilho quando uma extração seletiva precisa ser realizada em uma matriz complexa. No entanto, esta dificuldade pode ser contornada através da utilização dos MIP como fases estacionárias para SPE mais seletivas (LAI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2005; PRADA *et al.*, 2005; MASQUÉ *et al.*, 2000; CARO *et al.*, 2005). Este processo recebe o nome de MISPE (do inglês, *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*).

A técnica de MISPE consiste, basicamente, em 3 etapas que devem ser otimizadas para que sejam conseguidos resultados máximos de seletividade no processo de reconhecimento molecular. O primeiro passo consiste na otimização

das condições de condicionamento e carregamento do cartucho de SPE empacotado com o MIP. Neste estudo deve-se verificar qual é o solvente mais adequado para ativar as cavidades do polímero de modo que as interações com a molécula de interesse sejam maximizadas (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004). Além disso, deve ser feita a escolha do solvente no qual as amostras serão percoladas através do cartucho. Este solvente, preferencialmente, não deve interferir nas interações formadas entre o polímero e a molécula alvo afim de que a retenção deste analito seja a melhor possível. A segunda etapa consiste na otimização do solvente utilizado na lavagem do cartucho. Devem ser otimizadas condições como pH, natureza e volume de solvente necessário para que seja feita a eluição dos compostos interferentes mantendo a molécula de interesse retida nas cavidades seletivas do polímero (TARLEY *et al.*, 2005; CARO *et al.*, 2006).

A última etapa a ser otimizada é a eluição da molécula de interesse dos sítios seletivos de ligação do MIP. Neste caso devem ser determinadas condições como pH, o tipo de solvente bem como o volume do mesmo para que sejam rompidas as interações específicas formadas entre o analito e o material. Por fim, o analito concentrado pode ser quantificado através de um sistema de detecção adequado.

A capacidade de reconhecimento molecular do MIP deve ser avaliada em relação a um material não seletivo ou polímero não impresso, que é chamado de NIP (do inglês, *Non Imprinted Polymer*). Este material é sintetizado da mesma forma que o polímero impresso, exceto pela adição da molécula molde ao meio reacional. Desta forma, o NIP funciona como um polímero de controle uma vez que não apresenta sítios específicos de ligação (YAN & RAMSTRÖM, 2005). Assim, todas as condições otimizadas devem ser aplicadas igualmente no MIP e NIP para que seja feita a verificação da seletividade do material (CARO *et al.*, 2006). Deste modo espera-se que a etapa de lavagem seja eficiente para a remoção de todos os compostos retidos do NIP, mantendo somente a molécula de interesse presa aos sítios de ligação do MIP.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos nos últimos anos demonstrando a utilidade da técnica de MISPE na extração de compostos em diferentes amostras: biológicas, tecidos, água, solo e plantas. Contudo, a aplicação dos MIP não se resume apenas a sua utilização em SPE. Sua aplicação tem sido explorada em sensores, eletrocromatografia capilar, separações enantioméricas, catálise, cromatografia líquida e cromatografia em camada delgada (TAMAYO *et al.*, 2005; LAI *et al.*, 2004; CARO *et al.*, 2006; MASQUE *et al.*, 2000).

No trabalho efetuado por Zamora *et al.* (2009), os autores descrevem a extração on-line dos fungicidas tiabendazol, carbendazim e benomil em amostras de água de torneira, água de poço e água de rio, seguida da separação cromatográfica por HPLC. O polímero foi sintetizado empregando-se como “*template*” o tiabendazol numa mistura de acetonitrila e tolueno numa proporção 3:1 (v/v). O ácido metacrílico e o divinilbenzeno foram utilizados como monômero funcional e reagente de ligação cruzada, respectivamente. O material apresentou uma alta seletividade e eficiências de extração satisfatórias, demonstrando seu potencial no preparo de amostras. O método proposto diminuiu o tempo de análise de 6 a 8 h para cerca de 1 h.

Yang *et al.* (2006), descreveram a síntese de um polímero impresso com cotinina (metabólito principal da nicotina no corpo humano) utilizando ácido metacrílico como monômero funcional e etileno glicol dimetacrilato como reagente de ligação cruzada. O material foi aplicado na extração de cotinina em urina humana de fumantes ativos e passivos. O MIP obtido apresentou uma boa seletividade e alta recuperação na extração de cotinina em urina. As recuperações ficaram em torno de 85 %.

Song *et al.* (2008) sintetizaram e caracterizaram um polímero de impressão molecular seletivo para eritromicina a partir do ácido metacrílico (monômero funcional) e etileno glicol dimetacrilato (reagente de ligação cruzada). A seletividade do material obtido foi avaliada frente os macrolídeos espiramicina e roxitromicina e a quinolona enrofloxacin. Foi observado que o MIP apresentou uma alta seletividade para as moléculas de eritromicina e roxitromicina

(recuperações de 89 e 88 %, respectivamente), um reconhecimento moderado da molécula espiramicina (recuperação de 63 %) e baixa seletividade para a molécula de enrofloxacin (recuperação de 24 %). Desta forma, o polímero impresso foi aplicado na extração de eritromicina em carne suína, apresentando recuperações em torno de 85 %, com baixos desvios.

Outras aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais podem ser encontradas na **Tabela I.2**.

Tabela I.2 – Exemplos de aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais utilizando MISPE.

Analito	Amostra	Referência
Fenitrotona	Tomate	LEANDRO & RATH, 2009
Colesterol	Queijos	PUOCI <i>et al.</i> , 2008
Cafeína	Urina e café	THEODORIDIS <i>et al.</i> , 2004
Ciprofloxacino	Urina	YAN & ROW, 2008
Propranolol	Urina e plasma	HU <i>et al.</i> , 2009
Bromexina	Urina e soro	JAVANBAKHT <i>et al.</i> , 2009
β -estradiol	Leite	QIUJIN <i>et al.</i> , 2009
Clorotriazina	Sedimento	FERRER <i>et al.</i> , 2000
2,4-dinitrofenol	Água	LUO <i>et al.</i> , 2008

I.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas começou a ser desenvolvida no início do século XX, através do trabalho desenvolvido por JJ Thomson e seus colaboradores, no Laboratório Cavendish, em Cambridge (LINDON *et al.*, 2000). Nos últimos tempos, passou por grande avanços na área de instrumentação e no desenvolvimento de novas técnicas de ionização, tornando-se uma das técnicas instrumentais mais abrangentes da ciência. Desde pesquisas aplicadas até as mais fundamentais, a espectrometria de massas tem exercido papel de grande destaque nas diversas áreas da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas.

É uma técnica analítica que consiste na ionização das moléculas de interesse e separação dos íons de acordo com suas diferentes razões massa/carga m/z (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). A espectrometria de massas não analisa átomos neutros ou moléculas neutras e sim, espécies iônicas. Antes de discriminar os íons é necessário primeiramente gerá-los, utilizando um sistema de ionização ou fonte de íons. Os diferentes tipos de fonte de ionização e analisadores de massas são os que determinam a aplicabilidade da MS (HAM, 2008).

Em geral a análise de um composto compreende cinco etapas: introdução da amostra; ionização das moléculas; passagem por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a razão m/z ; o detector que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica; e o processador que converte a magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z em dados, proporcionando um espectro de massas correspondente (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

A **Figura I.4** apresenta um diagrama esquemático de um espectrômetro de massas onde se pode observar que o analisador de massas e o sistema de detecção são mantidos sob alto vácuo, o que não se aplica necessariamente aos

sistemas de ionização, pois alguns deles estão à pressão atmosférica, fato que revolucionou a espectrometria de massas.

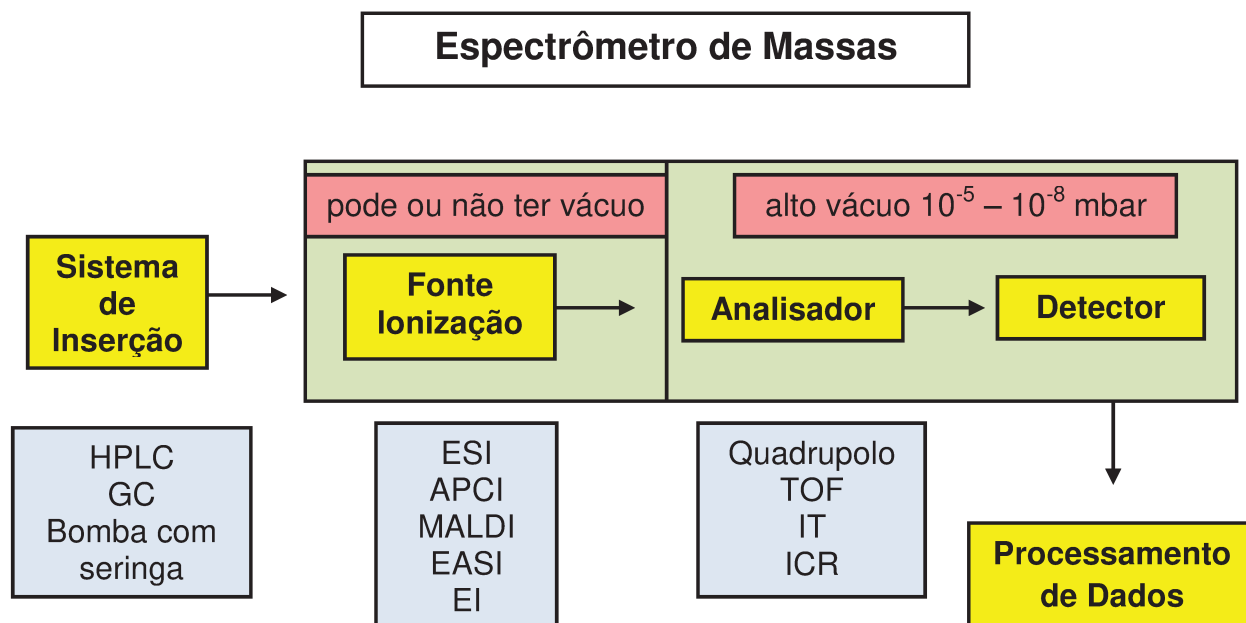


Figura I.4 – Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.

Os sistemas de ionização determinam a versatilidade da MS, pois as fontes de íons são responsáveis pelos tipos de analitos que podem ser determinados. Inúmeros métodos para gerar íons foram desenvolvidos ao longo da história da MS, desse modo há métodos de ionização aplicáveis praticamente a todos os tipos de analitos tanto para moléculas apolares e voláteis, onde fontes de ionização por elétrons: *electron ionization* (EI); ou a ionização química: *chemical ionization* (CI) podem ser utilizadas; quanto para moléculas polares com a ionização por eletrospray (ESI, *electrospray ionization*), técnica a pressão atmosférica que transfere íons em solução para fase gasosa e MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization*), a ionização sob vácuo por dessorção de matriz (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). As técnicas de ionização ambiente como EASI

(*easy ambient sonic-spray ionization*) tornaram a introdução da amostra em MS mais simples e prática.

Existem diferentes estratégias para se discriminar os íons dependendo do analisador de massas. O mais comum é o quadrupolo, que possui resolução unitária. Outros analisadores que podem ser citados são os analisadores de aprisionamento de íons, *íon trap* (IT), tempo de voo (TOF) e ressonância ciclôtrônica de íons (ICR). Cada analisador possui diferenças de resolução e exatidão de acordo com sua eletrônica e princípio físico utilizado para discriminar as razões m/z medidas.

I.3.1 Ionização a Pressão Atmosférica por *Electrospray* (ESI-MS)

Sendo uma das técnicas de ionização em maior expansão, a ionização por *electrospray* passou por duas fases distintas de investigação e desenvolvimento. A primeira decorreu antes de 1970 e centrou-se mais nos aspectos fundamentais do processo de produção de carga assim como no modo experimental de concretizá-lo, podendo salientar o trabalho realizado por Dole *et al.* (1968). A segunda fase deu-se a partir de 1970 com destaque para o trabalho desenvolvido em 1984 por Yamashita e Fenn (1984), considerado pioneiro da espectrometria de massas de ionização por *electrospray*. A partir deste trabalho, a técnica sofreu um incremento notório com o desenvolvimento e construção de fontes de ionização comercializáveis baseadas no princípio de carregar gotas eletricamente.

Há essencialmente três características que fazem com que ESI seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira destas características é a capacidade de produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo assim a razão m/z , de tal modo que é possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa, em praticamente todo tipo de analisadores. Uma segunda característica é que as

amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que torna possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último, e não menos importante, o fato de ser o *electrospray* uma técnica de ionização suave, permite que as interações não covalentes entre as moléculas existentes em solução sejam preservadas na fase gasosa.

A ESI é uma técnica de ionização que opera à pressão atmosférica, e pode ser acoplada a analisadores do tipo setor magnético, quadrupolo e tempo de voo (ASHCROFT, 1997). A produção de íons por *electrospray* requer essencialmente duas etapas: dispersão das gotas altamente carregadas seguida de condições que permitam a evaporação da gota.

As soluções são primeiramente pulverizadas eletrostaticamente com formação de gotas pequenas e altamente carregadas. A nebulização da solução é em alguns casos facilitada pela ajuda de um gás nebulizador (N_2). Posteriormente, as moléculas do analito devem de alguma forma ser separadas do solvente na forma de íons. Este passo de formação de íons, como em muitas das técnicas de ionização consideradas suaves, é provavelmente o menos compreendido no processo global do *electrospray*. Alguns mecanismos têm sido propostos para a dessorção dos íons a partir de gotas carregadas, sendo que o modelo de resíduo de carga de Dole *et al.* (1968), aplicado a macromoléculas, foi talvez o primeiro a servir de base para a atual técnica de *electrospray*. Neste modelo é considerado que à medida que o solvente se evapora, a densidade de carga na superfície aumentará até que as forças repulsivas de Coulomb entre as cargas superficiais excederão a tensão superficial, levando à divisão da gota inicial. Se este processo de divisão continuar e se a solução inicial for suficientemente diluída será alcançado um estado no qual cada gota conterá uma única molécula que reterá parte da carga inicial, ou seja, formará macro íons. A **Figura I.5** apresenta um esquema representativo do processo de ionização por ESI no modo positivo.

Outro mecanismo para geração de pequenos íons, o da evaporação iônica, foi proposto por Iribarne e Thomson (1976), onde sugerem que a evaporação do solvente conduz a uma instabilidade das gotas com razões elevadas de densidade

de carga superficial/raio da gota. A energia eletrostática associada com a gota carregada torna-se então suficientemente grande para ejetar os íons do analito para a fase gasosa.

Este mecanismo foi aplicado a macromoléculas por Fenn (1988), o qual propôs que uma parte da molécula carregada teria capacidade de penetrar a superfície da gota devido ao movimento Browniano. A existência de repulsão coulombiana entre esta parte da molécula e a superfície da gota ejetará a molécula para fora da gota.

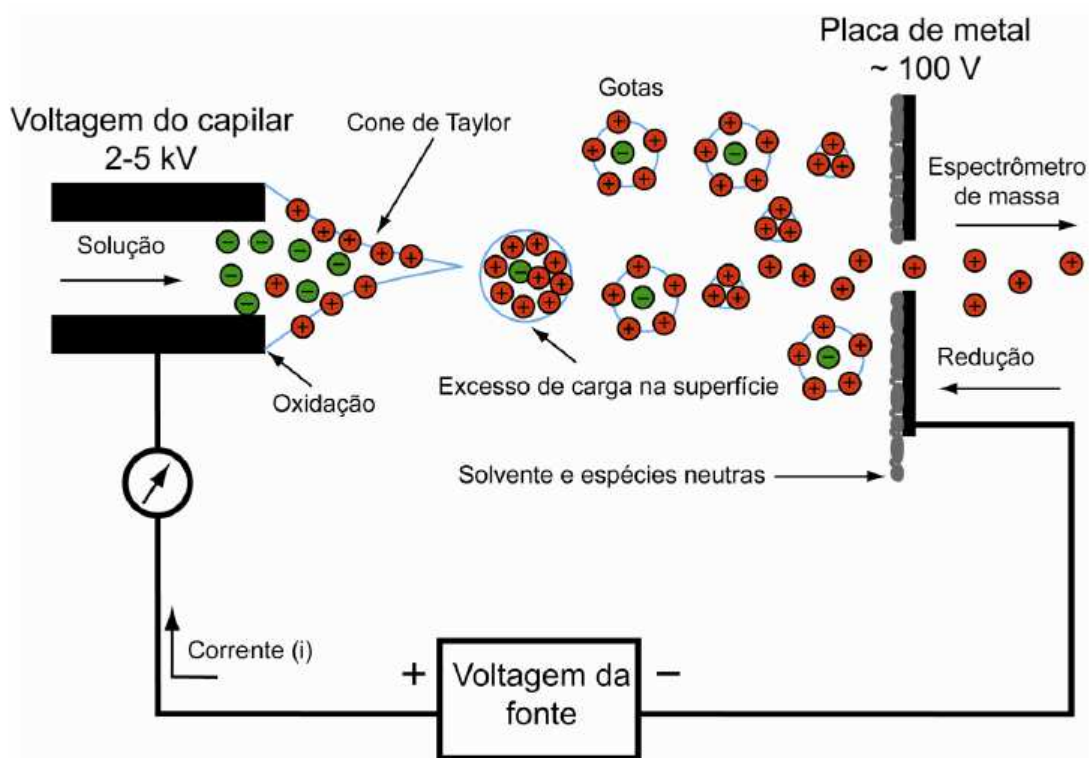


Figura I.5 – Esquema do processo de ionização por ESI. Adaptado de DOLE *et al.*, 1968.

I.3.2 Analisadores para Espectrometria de Massas

Diversos analisadores de massas estão disponíveis atualmente e a escolha do analista depende do tipo de aplicação desejada e das características dessa demanda. Aspectos tais como intervalo de massas, poder de resolução, exatidão de massa, taxa de transmissão dos íons e sensibilidade, quantificação, velocidade de varredura, bem como facilidade de acoplamento com o sistema de separação devem ser consideradas. As opções para escolha incluem analisadores de massa do tipo quadrupolo (Q), *íon trap* 2D e 3D, tempo de voo (TOF), setores do tipo elétrico e magnético e equipamentos com transformada de Fourier do tipo ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR) e *orbitrap* (BASIC, 1995; MAKAROV, 2000). Além dessas, há a possibilidade de combinação de mais de um analisador para obtenção de análise em *tandem* no espaço, quer seja com acoplamento de analisadores do mesmo tipo (ex.: triploquadrupolo) ou com equipamentos híbridos (ex.: Q-TOF) (VEKEY, 2001). Adicionalmente, alguns equipamentos do tipo *íon trap* permitem a fragmentação e isolamento de íons de interesse sucessivas vezes, operando no modo chamado *tandem* no tempo. As características dos diferentes analisadores e suas principais aplicações encontram-se disponíveis na literatura (COOKS *et al.*, 1992; CHOI *et al.*, 2003; LEMIÉRE, 2001).

Nos trabalhos descritos nessa tese, os analisadores quadrupolares (simples e triplo) foram utilizados e serão brevemente discutidos.

O analisador do tipo quadrupolo (**Figura I.6**) consiste de quatro hastes simetricamente arranjadas às quais é aplicado um potencial alternado por rádio frequência (RF) sobreposto a um potencial de corrente contínua (DC). Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados no centro da região entre as quatro hastes, atravessando axialmente o quadrupolo. Suas trajetórias serão dependentes do campo elétrico produzido, onde apenas os íons de uma razão m/z específica terão uma trajetória estável e chegarão ao detector. A RF é variada para que íons de diferentes razões m/z obtenham uma trajetória estável ao longo

do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim um espectro de massas (MILLER & DENTON, 1986).

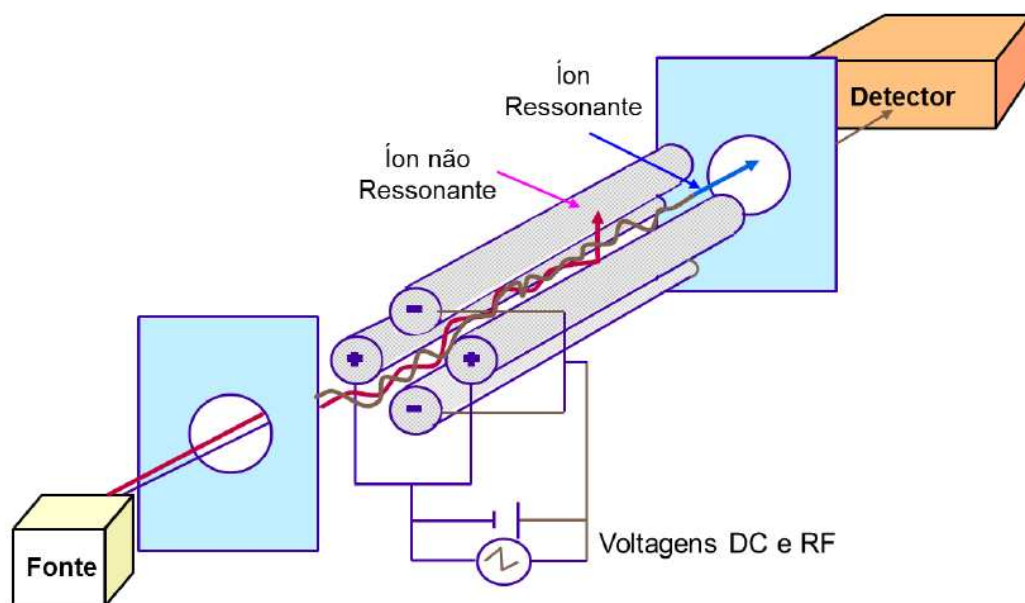


Figura I.6 – Esquema representativo de um analisador quadrupolo.

Nos sistemas do tipo “triplo” quadrupolo (QqQ), um analisador quadrupolo é acoplado a uma câmara de colisão preenchida com um gás inerte (geralmente um quadrupolo, hexapolo ou octapolo operando apenas em modo RF), a qual é, em seguida, conectada a um segundo analisador quadrupolo. Nessa câmara os íons provenientes do primeiro analisador, se acelerados com energia suficiente, podem fragmentar-se ao colidirem com as moléculas inertes de gás. A esse tipo de reação dá-se o nome de fragmentação induzida ou ativada por colisão (do inglês, *collisional induced dissociation* – CID ou *collision-activated dissociation* – CAD). Os íons secundários obtidos pelos processos de fragmentação podem então ser filtrados pelo segundo quadrupolo, conferindo maiores informações estruturais e aumento de seletividade para a espectrometria de massas. Esse aumento de seletividade é muito útil para aumentar a confiabilidade dos métodos

desenvolvidos para a determinação de fármacos em amostras complexas. A **Figura I.7** apresenta um esquema representativo do analisador tipo triplo quadrupolo.

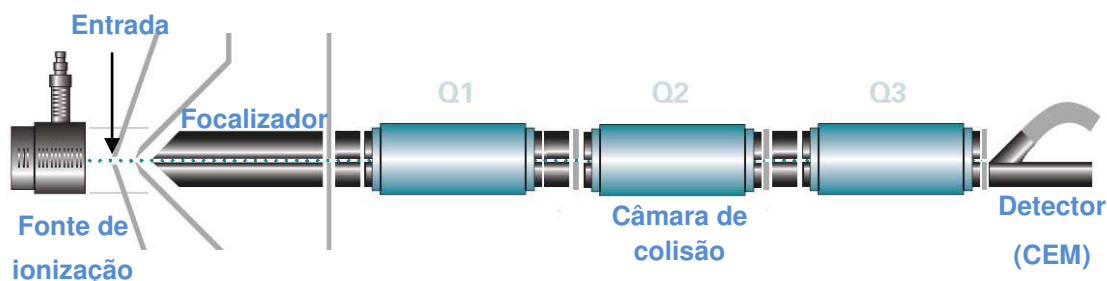
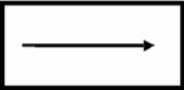
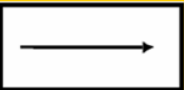
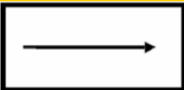


Figura I.7 – Detalhes do espectrômetro triploquadrupolar.

A **Tabela I.3** resume os modos de operação de um instrumento do tipo triplo quadrupolo. Entre outras utilidades, o modo de operação para obtenção de íons filhos ou produtos é importante para a determinação do perfil de fragmentação dos compostos de interesse. O modo para obtenção do espectro dos íons pais ou precursores é interessante quando um determinado fragmento ionizado é esperado para algum composto ou grupo de compostos de interesse. O modo de perda neutra serve para a identificação de compostos que tenham seus produtos ionizados da fragmentação relacionados com a perda neutra de uma determinada massa constante. Por exemplo, pode funcionar para a identificação de moléculas fosforiladas, glicosiladas, ou produtos de biotransformação conjugados que perdem esses grupos na forma neutra durante a fragmentação. O modo de monitoramento de reações múltiplas (do inglês *multiple reaction monitoring* – MRM) permite a observação de transições específicas provenientes da fragmentação de um determinado íon de interesse em fragmento particular. Esse é o principal modo utilizado na determinação e quantificação de compostos conhecidos de interesse, uma vez que confere seletividade e excelente

detectabilidade, reduzindo amplamente o ruído da linha de base e elevando assim a razão sinal/ruído.

Tabela I.3 – Modos de operação de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.

	MS1	Cela de colisão	MS2
Espectro dos íons filhos	 precursor	 RF apenas	 varredura
Espectros dos íons pais	 varredura		 produto
MRM	 precursor		 produto
Perda neutra	 sincronizado c/ MS2		 sincronizado c/ MS1

I.3.3 Aplicações de Polímeros de Impressão Molecular acoplado à Espectrometria de Massas

A análise de fármacos em fluidos biológicos, tais como soro, plasma e urina tem se tornado importante atualmente, pois fornece informações para estudos de farmacocinética, biodisponibilidade, fármaco e toxico genética, funções de órgãos e interações medicamentosas. A análise de drogas ilícitas em matrizes biológicas e a avaliação da intoxicação com fármacos e outros xenobióticos são outros exemplos de aplicações que se valem de ferramentas analíticas e são

desenvolvidas no âmbito da toxicologia forense e clínica. Nesse caso, a varredura e a confirmação de fármacos em fluídos biológicos são importantes na detecção e tratamento dos usuários e controle de pessoas que seguem alguma terapia.

Fluídos biológicos são matrizes complexas que contêm proteínas, sais, ácidos, bases e outros compostos orgânicos endógenos, os quais dificultam a determinação dos analitos presentes. Adicionalmente, muito frequentemente esse composto de interesse está presente em uma concentração baixa, inferior aquela de muitos outros compostos também presentes na matriz (KATAOKA, 2003). Para esse tipo de determinação, diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas, dependendo do analito alvo e do objetivo da aplicação.

A escolha das técnicas analíticas a serem empregadas no desenvolvimento de uma determinada metodologia deve responder a uma série de questões. Entre elas, o tipo de matriz, a concentração esperada dos analitos, a necessidade de medidas quantitativas ou qualitativas, a precisão exigida, o custo da análise, o custo dos equipamentos e as exigências de produtividade são alguns dos itens que devem ser considerados.

Desta forma, em busca da perfeição e excelência na determinação de fármacos em matrizes biológicas, nos deparamos com o casamento entre duas técnicas analíticas: MIP e MS, onde uma trata do preparo de amostras e a outra na identificação e quantificação dos fármacos analisados (CHIUMINATTO *et.al.*, 2010; YOSHIMATSU *et.al.*, 2007; MASQUÉ *et.al.*, 2000).

Dentre os estudos que utilizam polímeros de impressão molecular no preparo de amostra em conjunto à espectrometria de massas para a identificação e/ou quantificação dos analitos de interesse, vale ressaltar dois estudos desenvolvidos no Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas. São eles:

✓ FIGUEIREDO *et.al.* (2010) utilizou a técnica MIP-EASI-MS na análise de cinco fenotiazinas (clorpromazina, perfenazina, triflupromazina, tioridazina e proclorperazina) em amostras de urina. O polímero foi sintetizado empregando-se como “*template*” a molécula de clorpromazina. O ácido metacrílico e o EGDMA

foram utilizados como monômero funcional e reagente de ligação cruzada, respectivamente, o AIBN como iniciador radicalar e clorofórmio como solvente porogênico. O método apresentou seletividade para as cinco moléculas estudadas e foi eficiente na quantificação das mesmas, apresentando um limite de quantificação em torno de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

✓ FIGUEIREDO *et.al.* (2011) utilizou da técnica MIP-ESI-MS na análise de seis benzodiazepínicos (medazepam, nitrazepam, diazepam, clordiazepóxido, clonazepam e midazolam) em plasma humano. O polímero foi sintetizado empregando-se como “*template*” a molécula de diazepam. O método apresentou boa seletividade para cinco das moléculas estudadas, com exceção do clonazepam. Os coeficientes de variação ficaram em torno de 9 a 18% e os erros relativos em torno de -7 a 18%, demonstrando assim uma boa precisão e exatidão.

Na **Tabela I.4** podemos encontrar alguns estudos que utilizaram a técnica de polímeros de impressão molecular acoplada à espectrometria de massas.

Tabela I.4 – Exemplos de aplicações biológicas, farmacêuticas e ambientais utilizando polímeros de impressão acoplada a espectrometria de massas.

Analito	Amostra	MS	Referência
Primidona	Medicamento e plasma	<i>Electrospray</i> Mobilidade Iônica	REZAEI <i>et al.</i> , 2009
Verapamil	Urina e plasma	<i>Electrospray</i> - QqQ	MULLETT <i>et al.</i> , 2004
Metronidazol	Medicamento e plasma	<i>Electrospray</i> Mobilidade Iônica	JAFARI <i>et al.</i> , 2009
Anfetamina	Água	<i>Electrospray</i> - QqQ	GONZÁLEZ-MARINO <i>et al.</i> , 2009
Propranolol	Urina	<i>Electrospray</i> - Q	MEESTERS <i>et al.</i> , 2008

CAPÍTULO II

MISPE-LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE OMEPRAZOL EM PLASMA HUMANO

II.1 Introdução

No mundo ocidental em torno de 20 a 40 % da população apresenta sintomas da doença de refluxo gastroesofágico (DRGE), sendo que 20 % dos adultos apresentam pirose e/ou regurgitação pelo menos uma vez por semana e 40 %, mensalmente. Esta enfermidade pode acarretar desconforto na qualidade de vida dos pacientes, pois a DRGE tem sido associada a sintomas extra-esofágicos tais como: asma, tosse crônica, pneumonia recorrente, pneumonite, abscesso pulmonar, apneia em crianças, laringite, amigdalite, rouquidão, pigarro, sensação de engasgo entre outros (NASI *et al.*, 2006).

A eficácia dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H_2 na redução da acidez gástrica, associada a sua baixa toxicidade, constituiu um avanço significativo no tratamento dessa doença. Estes constituíram uma classe de inibidores da secreção ácida mais específica do que os antiácidos utilizados até a década de 70, quando se evidenciou o papel da bomba de próton, a enzima H^+/K^+ ATPase, na secreção ácida da célula parietal (WALLMARK *et al.*, 1986).

Assim, vários inibidores da bomba de prótons (IBPs) têm sido desenvolvidos. IBPs são compostos benzimidazois substituídos que inibem irreversivelmente a H^+/K^+ ATPase. Os fármacos exigem ativação no ambiente ácido do canalículo secretor da célula parietal, isto é, trata-se de pró-fármacos. Atuam mais provavelmente do lado externo da membrana. A administração de uma dose única diária pode inibir efetivamente 100 % da secreção de ácido gástrico (KATZUNG & SILVA, 2003).

O derivado benzimidazólico que já foi bastante investigado e que se tem mostrado eficaz em promover uma potente inibição da secreção gástrica de ácido clorídrico é o omeprazol, objeto de estudo deste capítulo.

II.2 Omeprazol

O primeiro fármaco da classe dos inibidores de bomba de prótons é o omeprazol(**Figura II.1**), utilizado principalmente como um potente agente inibidor da secreção ácida gástrica no tratamento de úlceras gastrointestinais, refluxo gastroesofágico, dispepsias, na síndrome de Zollinger-Ellison e no tratamento para *Helicobacter pylori*(MATON, 1991 e PÉREZ-RUIZ *et al.*, 2006).

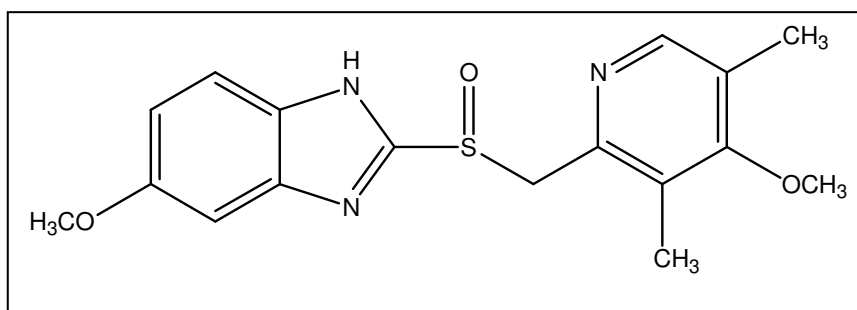


Figura II.1 – Estrutura química do omeprazol.

O omeprazol foi sintetizado em 1979 e iniciou a era dos bloqueadores da bomba protônica, ou era dos IBPs. A síntese do omeprazol foi precedida pela síntese do timoprazol que, embora iniba a secreção gástrica, não se mostrou adequado para uso clínico. Pequenas modificações na estrutura química do omeprazol levaram à síntese de substâncias equivalentes e que constituem o grupo dos IBPs: pantoprazol, lanzoprazol e rabeprazol (WALLMARK, 1989).

Trata-se de uma substância quimicamente estável, lipofílica, que se apresenta na forma de um pó branco solúvel em meio básico. Comporta-se como uma base fraca, com $pK_{a1} = 4,2$ e $pK_{a2} = 9,0$, e degrada-se rapidamente em soluções com valores de pH baixos (MATHEW *et al.*, 1995).

É administrado por via oral, entretanto, devido a sua rápida degradação quando exposto à secreção gástrica, é apresentado na forma de cápsula contendo grânulos de revestimento entérico. Apresenta um pico de concentração plasmática alcançado entre 30 e 40 minutos após a administração oral (LIND *et al.*, 1983; REGARDH *et al.*, 1985; CLISSOLD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986). Cerca de 95 % do fármaco liga-se a proteínas plasmáticas, é metabolizado pelo fígado e excretado pela urina (80 %) e pelas fezes (20 %) (ANDERSSON, 1996).

Os efeitos indesejáveis não são comuns e incluem cefaleia, diarreia e exantema. Há relatos de efeitos sob o sistema nervoso central, tais como: estados de confusão, agitação, depressão e alucinações em pacientes bastante comprometidos (VARONA *et al.*, 1996).

A grande maioria dos métodos descritos na literatura para a determinação de omeprazol (ORLANDO & BONATO, 2003; IUGA & BOJITÃ, 2010) são métodos cromatográficos (LC – cromatografia líquida) com detecção UV. Pode-se encontrar também a determinação de omeprazol por eletroforese capilar (PEREZ-RUIZ *et al.*, 2006). No entanto, indubitavelmente, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) tem sido, nos últimos anos, a técnica mais recomendada para a determinação deste fármaco em matrizes complexas (ZHANG *et al.*, 2010; VITTAL *et al.*, 2008; De SMET *et al.*, 2010; ISHII *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2005; HOFMANN *et al.*, 2006; KANAZAWA *et al.*, 2002).

Como explicado anteriormente, embora estes métodos tenham elevada detectabilidade, alguns deles requerem consumo de solventes orgânicos no preparo de amostra (quando utilizam, por exemplo, extração líquido-líquido), outros requerem pré-concentração por extração em fase sólida e, pelo fato dos cartuchos não serem reutilizáveis, implicam em um custo elevado. Neste sentido, os polímeros de impressão molecular representam uma alternativa interessante na etapa de preparo de amostra, uma vez que podem ser sintetizados no laboratório a baixo custo e apresentam durabilidade e capacidade de reutilização.

Em vista destes fatos, propõe-se sintetizar um polímero de impressão molecular adotando o omeprazol como molécula molde e avaliar a potencialidade deste material como fase sólida em cartuchos de extração em fase sólida. O MISPE será empregado no preparo de amostras na determinação do omeprazol em plasma humano. Uma busca na literatura mostrou que ainda não foram publicados trabalhos utilizando MIP no preparo de amostras contendo omeprazol.

II.3 Objetivos

O objetivo geral deste capítulo foi sintetizar polímeros de impressão molecular para serem utilizados no preparo de amostra para a determinação de omeprazol em plasma humano por LC-MS/MS.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Sintetizar polímeros de impressão molecular, através da técnica de polimerização *in bulk* utilizando a molécula de omeprazol como molde.
- Caracterizar o material sintetizado.
- Avaliar a potencialidade do MISPE no preparo de amostras.
- Desenvolver e validar um método de determinação de omeprazol em plasma humano por LC-MS/MS utilizando o MISPE desenvolvido como preparo de amostra.
- Aplicar o método MISPE-LC-MS/MS desenvolvido na determinação de omeprazol em plasma humano.

II.4 Parte Experimental

II.4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada. Os reagentes, soluções e ácidos empregados estão descritos a seguir: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, 4-vinilpiridina (4-VP), etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). O metanol, acetonitrila e tolueno, todos grau HPLC, foram adquiridos da J.T. Baker (EUA). Ácido acético ($C_2H_4O_2$) e acetato de amônio ($C_2H_7NO_2$) foram adquiridos da Synth (Brasil).

II.4.2 Amostras

Amostras de plasma humano foram cedidas pela UNIFAG – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia ligada a USF – Universidade São Francisco (Bragança Paulista, SP, Brasil). A coleta das amostras foi feita através de cateter heparinizado, centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e o plasma removido foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a utilização da amostra.

II.4.3 Síntese do Polímero de Impressão Molecular

O MIP foi sintetizado a partir de omeprazol (0,25 mmol) como molécula molde, 4-vinilpiridina (1,25 mmol) como monômero funcional, etileno glicoldimetacrilato (EGDMA) (6,25 mmol) como reagente de ligação cruzada e a mistura MeOH:tolueno (1:1 v/v 4,0 mL) como solvente porogênico. O iniciador radicalar utilizado foi 2,2'-azo-bis-iso-butyronitrila (AIBN) (0,25 mmol). A polimerização foi "*in bulk*", onde após a adição dos reagentes numa ampola de vidro, a mesma foi sonicada por aproximadamente 10 minutos, seguida pela remoção do O₂ mediante atmosfera de N₂ por 5 minutos e posterior aquecimento através de um banho de silicone a 60 °C por 24 h. Ao término deste período, foi obtido um sólido, o qual foi triturado e peneirado (malha de 100 µm). O material foi então transferido para cartuchos de SPE (vazios) contendo *frit* e então lavado com MeOH:H₃CCOOH (7:3v/v) até que as alíquotas recolhidas estivessem livres da molécula molde (omeprazol). Por fim, os polímeros foram secos em uma estufa a 100 °C por um período de aproximadamente 12 h, e guardados em dessecador.

Polímeros de controle (NIP) também foram sintetizados, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, exceto pela não adição da molécula molde no meio reacional.

II.4.4 Caracterização dos Polímeros

Polímeros de impressão molecular (MIP) são sólidos insolúveis e por isto não podem ser caracterizados por métodos geralmente empregados no caso de polímeros comuns, já que estas técnicas requerem a preparação de uma solução do material. No entanto, alguns testes podem ser realizados para que alguns aspectos químicos e morfológicos do material sejam conhecidos (CORMACK & ELORZA, 2004). A caracterização química do polímero pode ser feita por

microanálise elementar, infravermelho com transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear do estado sólido. Já as características morfológicas podem ser obtidas através de microscopia de varredura eletrônica, porosimetria de sorção de nitrogênio e porosimetria de intrusão de mercúrio (CORMACK & ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005).

No estudo em questão, os polímeros MIP e NIP foram caracterizados da seguinte forma:

➤ Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em pastilhas de KBr 1% no intervalo espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando espectrofotômetro FIT-IR Bomem MB Series (Canadá), modelo B100, em resolução de 4 cm^{-1} e uma taxa de 20 varreduras por minuto.

➤ As medidas de ressonância magnética nuclear de ^{13}C empregando as técnicas de polarização cruzada e ângulo mágico de rotação (C^{13} CP-MAS NMR) foram feitas em um equipamento Bruker Avance II (Alemanha) de 400 MHz com tempo de contato de 3 μs e intervalo de acumulações de 3 s. No caso do MIP, o número de acumulações foi de 985 e para o NIP, 1784.

➤ Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras foram dispersas sobre uma fita de carbono condutora com dupla face (3MTM) previamente fixada sobre um porta amostra de latão. Em seguida foram recobertos com um filme condutor de ouro até a espessura de 12 nm utilizando-se um metalizador Balzers, modelo MED 020 da Bal-Tec. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um JEOL LV-JSM 6360 (Japão) operando em voltagem de 15 keV.

➤ As medidas de porosimetria de sorção de nitrogênio foram realizadas em um ASAP 2010 da Micromeritics (EUA) adotando-se temperatura máxima de até 200 °C.

II.4.5 Determinação do Omeprazol por LC-MS/MS

A determinação de omeprazol foi realizada utilizando um sistema HPLC Alliance Waters, modelo 2695 (EUA) constituído de um sistema de bombeamento quaternário e um sistema de injeção de amostra. Foi empregada uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ à base de sílica (150 x 4,6 mm, 5 µm – Agilent, EUA) e coluna de guarda C₁₈ 4 x 3,0 mm, 5 µm (Phenomenex, EUA). O sistema HPLC foi acoplado a um QTrap LC-MS/MS System AB Sciex (Canadá) com fonte de ionização por *electrospray*.

A ionização por *electrospray* foi obtida trabalhando no modo positivo. Os parâmetros instrumentais utilizados foram: *curtain* gás (N₂) a 50 psig; gás nebulizador GS1 e GS2 a 15 e 35 psig respectivamente; temperatura de dessolvatação (TEM) a 450 °C; gás de dissociação (CAD) a 6 unidades de uma escala arbitrária do equipamento; e voltagem do *ion spray* (IS) a 5500 V. O QTrap foi utilizado no modo MRM (monitorização de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) considerando as transições do analito em estudo.

A fase móvel foi empregada em sistema isocrático constituída de acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ : acetonitrila : metanol na proporção 50:35:15 (v/v/v). A velocidade do fluxo foi 1,0 mL min⁻¹. O volume de injeção foi 10 µL. O tempo total de corrida foi de 2,5 minutos. O tempo de retenção do omeprazol foi de 1,8 min.

Todos os resultados foram processados e analisados pelo software Analyst[®], versão 1.5 (AB Sciex, Canadá).

II.4.6 Estudos de Adsorção

Para a construção das isotermas de adsorção, alíquotas de 10 mg dos polímeros MIP e NIP sintetizados foram agitadas por 1 hora numa mesa agitadora

com 1 mL de uma solução de omeprazol em diferentes concentrações ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $4500 \mu\text{g mL}^{-1}$). As soluções foram preparadas em MeOH. A quantificação do omeprazol no sobrenadante foi feita de acordo com as condições descritas no item II.4.5. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

II.4.7 Otimização do MISPE

O MISPE funciona tal qual um procedimento de SPE convencional, exceto pela substituição das fases estacionárias comuns pelo polímero impresso. Compreendendo assim as etapas de condicionamento, carregamento, lavagem e eluição dos cartuchos (QIAO *et al.*, 2006).

Quantidades de 100 mg dos polímeros MIP e NIP foram transferidas para cartuchos de SPE que continham um *frit* posicionado em sua base e um segundo *frit* foi posicionado no topo da fase polimérica.

A etapa de condicionamento destes cartuchos consistiu na percolação de 3 mL de metanol seguidos de 3 mL de água. Em seguida, extraiu-se 2 mL de uma solução contendo 1 mL de plasma fortificado com omeprazol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparado em MeOH) + 1 mL H_2O a uma vazão de 1 mL min^{-1} . O analito foi eluído com 2 mL do solvente de eluição e o extrato foi analisado por LC-MS/MS. Foram estudados os efeitos de natureza e volume do solvente de eluição. Nestes estudos, foram testados acetonitrila, metanol, etanol e clorofórmio.

A quantificação do omeprazol no eluato foi realizada de acordo com as condições descritas no item II.4.5. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

II.4.8 Validação do Método Analítico

Para a validação do método desenvolvido, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), tendo como referência as recomendações da ANVISA (2003) para métodos bioanalíticos.

➤ ***Seletividade***

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos na análise de plasma branco e plasma fortificado com omeprazol em concentração correspondente ao limite de quantificação (5 ng mL^{-1}), submetidas ao processo de extração proposto, com o objetivo de avaliar a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem comprometer a determinação do analito. Como critério de aceitação foi estabelecido que as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito deveriam ser inferiores a 20 % da resposta do respectivo limite de quantificação.

➤ ***Curva Analítica, Linearidade e Sensibilidade***

Para quantificação de omeprazol em plasma humano por LC-MS/MS foram elaboradas curvas analíticas fortificando-se plasma branco em seis níveis de concentração do analito ($5 \text{ a } 2500 \text{ ng mL}^{-1}$). Não foi utilizado padrão interno, uma vez que nas condições do preparo de amostra utilizado, nenhum análogo estrutural do analito foi reconhecido molecularmente pelo polímero impresso.

A linearidade (coeficiente de correlação linear, r) e a sensibilidade (coeficiente angular) foram obtidas através da curva analítica.

➤ **Limite de Detecção (LD)**

O limite de detecção (LD) foi determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 3, no tempo de retenção do omeprazol, em amostras de plasma humano fortificado ($n = 3$), e o resultado é apresentado como valor médio das repetições.

➤ **Limite de Quantificação (LQ)**

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 10, no tempo de retenção do omeprazol, em amostras de plasma humano fortificado ($n = 3$), e o resultado é apresentado como valor médio das repetições.

➤ **Precisão**

A precisão obtida foi avaliada em situação de intra- e inter-ensaios. A precisão intra-ensaios foi obtida para quatro níveis de concentração, mediante fortificação de plasma branco, analisadas em quintuplicatas ($n = 5$), em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressa como a estimativa dos desvios padrão relativos (RSD).

A precisão inter-ensaios foi obtida para quatro níveis de concentração, mediante fortificação de plasma branco, analisadas em quintuplicatas ($n = 5$) e realizadas em três dias diferentes ($n = 3$). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e os resultados foram expressos como as estimativas dos desvios padrão relativos (RSD).

Os níveis de concentração utilizados nos ensaios de precisão foram: limite de quantificação (5 ng mL^{-1}), controle de qualidade baixo – CQB (10 ng mL^{-1}), controle de qualidade médio – CQM (800 ng mL^{-1}) e controle de qualidade alto – CQA (2000 ng mL^{-1}).

➤ **Exatidão**

A exatidão obtida pelo método foi avaliada mediante testes de recuperação. Para tanto, plasma branco foi fortificado em concentrações correspondentes ao limite de quantificação (LQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA), e os resultados transformados em porcentagem da quantidade conhecida do analito, após desenvolvimento do procedimento de extração. Foram realizadas cinco repetições ($n = 5$).

II.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.5.1 Caracterização dos Polímeros

➤ **Infravermelho com Transformada de Fourier**

Os espectros de FT-IR, obtidos em pastilhas de KBr, para os polímeros MIP e NIP são mostrados na **Figura II.2**, na qual se pode observar que não são caracterizadas diferenças no que diz respeito à composição química. Este fato é esperado uma vez que ambos os materiais foram sintetizados da mesma forma, exceto pela não adição da molécula molde ao polímero de controle.

As bandas encontradas nos espectros da **Figura II.2** são as seguintes:

- ✓ 3448 cm^{-1} – deformação axial de O-H em ligação hidrogênio intermolecular.
- ✓ $2956/1995\text{ cm}^{-1}$ – deformação axial de C-H dos grupos metila e metileno.
- ✓ 1727 cm^{-1} – deformação axial de C=O dos grupos carboxílicos.

- ✓ 1635 cm^{-1} – deformação axial de C=C dos grupos vinila.
- ✓ $1449/1480\text{ cm}^{-1}$ – deformação angular de C-H do grupamento metileno.
- ✓ 1393 cm^{-1} – deformação angular de C-H devido o grupamento t-butila.
- ✓ $1264/1156\text{ cm}^{-1}$ – deformação axial de ésteres (COO).
- ✓ 955 cm^{-1} – deformação angular fora do plano de O-H.
- ✓ 749 cm^{-1} – deformação angular fora do plano de C-H.
- ✓ 512 cm^{-1} – deformação axial de C-Cl.

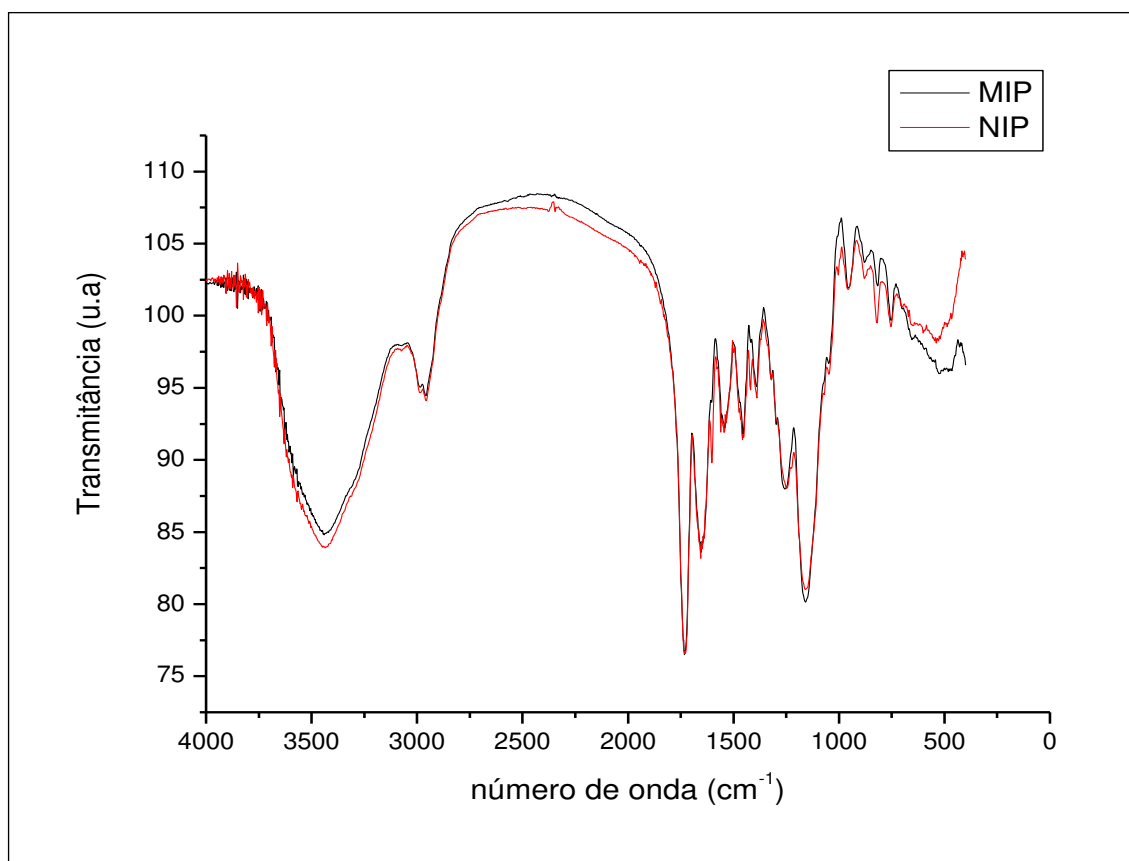


Figura II.2 – Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP.

➤ **Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C**

Por se tratarem de materiais insolúveis, as informações a respeito dos diferentes tipos de carbono, encontrados nos polímeros impresso e de controle, foram obtidas através de ressonância magnética nuclear do estado sólido. Neste caso, foi empregada a técnica de polarização cruzada com ângulo mágico de rotação (CP-MAS). As ressonâncias, mostradas nas **Figuras II.3**, em torno de 10-80 ppm são referentes a grupos metila e metileno presentes no EGDMA, entre 110-140 ppm e às duplas ligações não reagidas do EGDMA. Os picos por volta de 160-190 ppm são atribuídos a diferentes grupos C=O que podem ser encontrados no EGDMA (SELLERGREN, 2001; COURTOIS *et al.*, 2006).

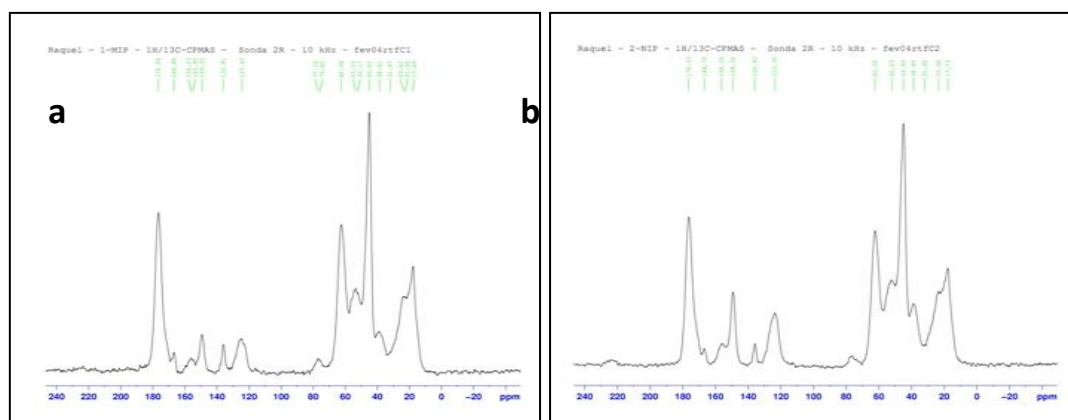


Figura II.3 – ^{13}C CP-MAS NMR do MIP (a) e NIP (b).

Como pode ser visto na **Figura II.3**, ambos os espectros apresentaram o mesmo perfil, o que reafirma a igualdade química dos dois materiais.

➤ **Microscopia de Varredura Eletrônica e Porosimetria de Sorção de N**

Atualmente, a grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura emprega a polimerização “*in bulk*”, devido ao fato deste método ser simples,

barato e requerer uma única etapa de síntese. Contudo, a presença de partículas irregulares, que embora não seja descrita como problema quando o polímero é utilizado em SPE, torna o material inadequado para o recheio de colunas cromatográficas (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004; QIAO *et al.*, 2006; MAHONY *et al.*, 2005).

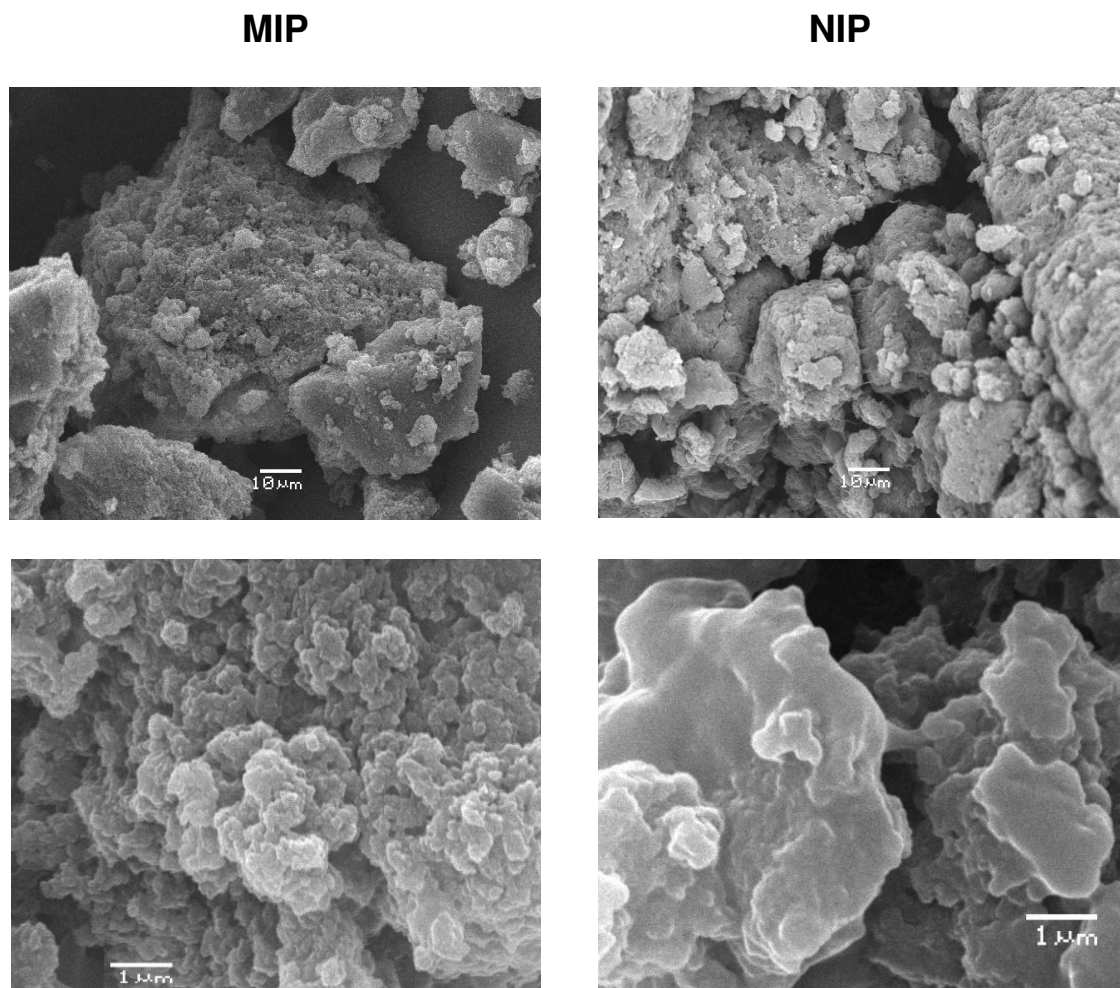


Figura II.4 – Imagem de microscopia de varredura eletrônica dos polímeros MIP e NIP. Aumentos de 5000 e 40000 x.

Embora o MIP e NIP tenham sido polimerizados da mesma forma, exceto pela não adição da molécula molde na síntese do polímero de controle, os dois materiais apresentaram morfologias diferentes, uma vez que a superfície do NIP

mostrou-se mais escamada quando comparada com o polímero impresso. A diferença na porosidade dos materiais foi nítida. A **Figura II.4** mostra que o polímero MIP apresentou-se mais granulado e poroso do que o polímero de controle. Devido a esta característica, os polímeros impressos apresentam maiores áreas superficiais do que os polímeros não impressos (FARRINGTON & REGAN, 2007).

A diferença na porosidade dos materiais foi confirmada através dos ensaios de porosimetria de sorção de nitrogênio, empregando o método BET. Este método consistiu na exposição de uma massa fixa de MIP e NIP a diferentes pressões de nitrogênio. Em seguida, a quantidade de gás sorvido foi medida em função da pressão do mesmo. Foram então construídas isotermas de sorção que forneceram informações a respeito das áreas superficiais, volume e diâmetro médio dos poros de ambos os polímeros.

Os resultados apresentados na **Tabela II.1** confirmam que os polímeros impressos tendem a possuir áreas superficiais e volume de poro maiores do que os polímeros de controle. Assim, pode-se afirmar que essa maior área superficial se dá pelo fato do polímero impresso apresentar um menor diâmetro de poro. Sugerindo assim que a molécula molde apresenta certa influência no crescimento da partícula durante a polimerização (YOSHIMATSU *et al.*, 2007).

Tabela II.1 – Porosimetria dos polímeros MIP e NIP.

Polímero	Área Superficial(m ² /g)	Volume do Poro(cm ³ /g)	Diâmetro médio do Poro (Å)
MIP	17,7	0,03	67,2
NIP	4,9	0,01	104,3

II.5.2 Determinação do Omeprazol por HPLC-MS/MS

Inicialmente, com o objetivo de se confirmar a massa nominal do analito, foi realizada a injeção de uma solução de omeprazol (100 ng mL^{-1} , em MeOH) através de uma bomba de seringa no espectrômetro de massas. Utilizando a função *Scan MS* e operando o equipamento em modo positivo, foi obtido o espectro de massas da solução de omeprazol em questão (**Figura II.5**).

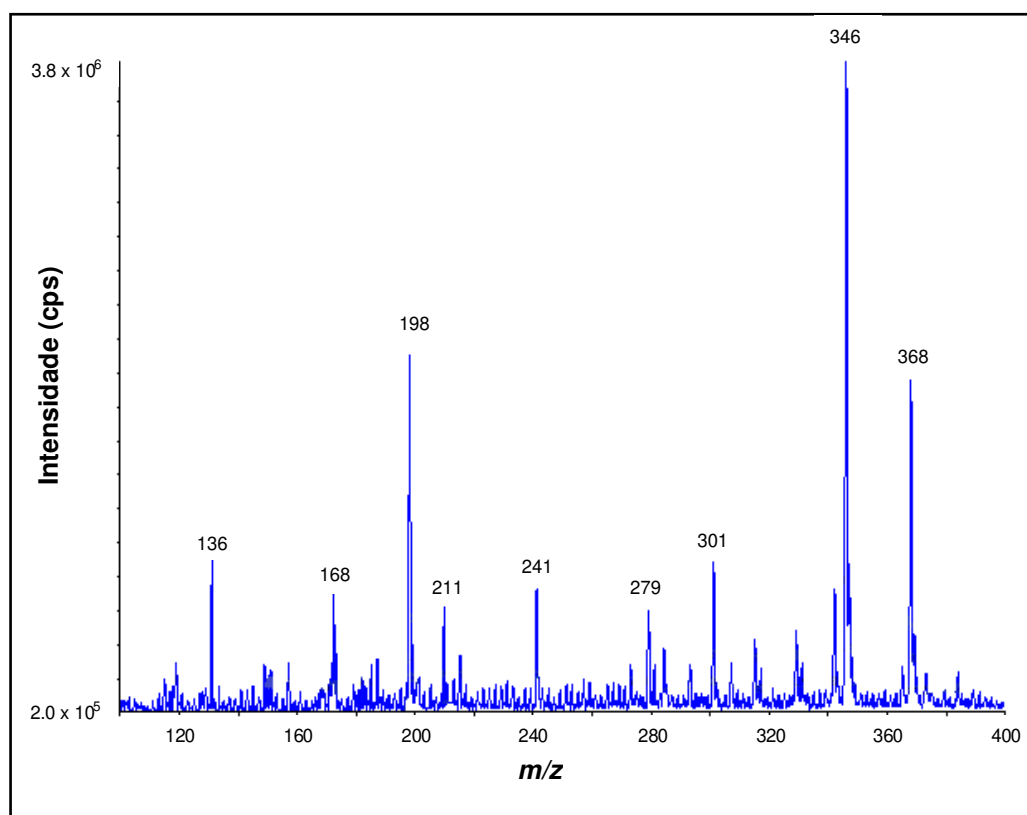


Figura II.5 – Espectro de massas ESI-MS do omeprazol (100 ng mL^{-1} , em MeOH).

Após esta etapa, foi realizada a fragmentação da molécula, a fim de escolherem-se as transições que seriam utilizadas na identificação e quantificação do omeprazol nas análises em plasma humano, utilizando o modo MRM. A **Figura**

II.6 ilustra a fragmentação do omeprazol e a **Figura II.7** apresenta a rota de fragmentação proposta.

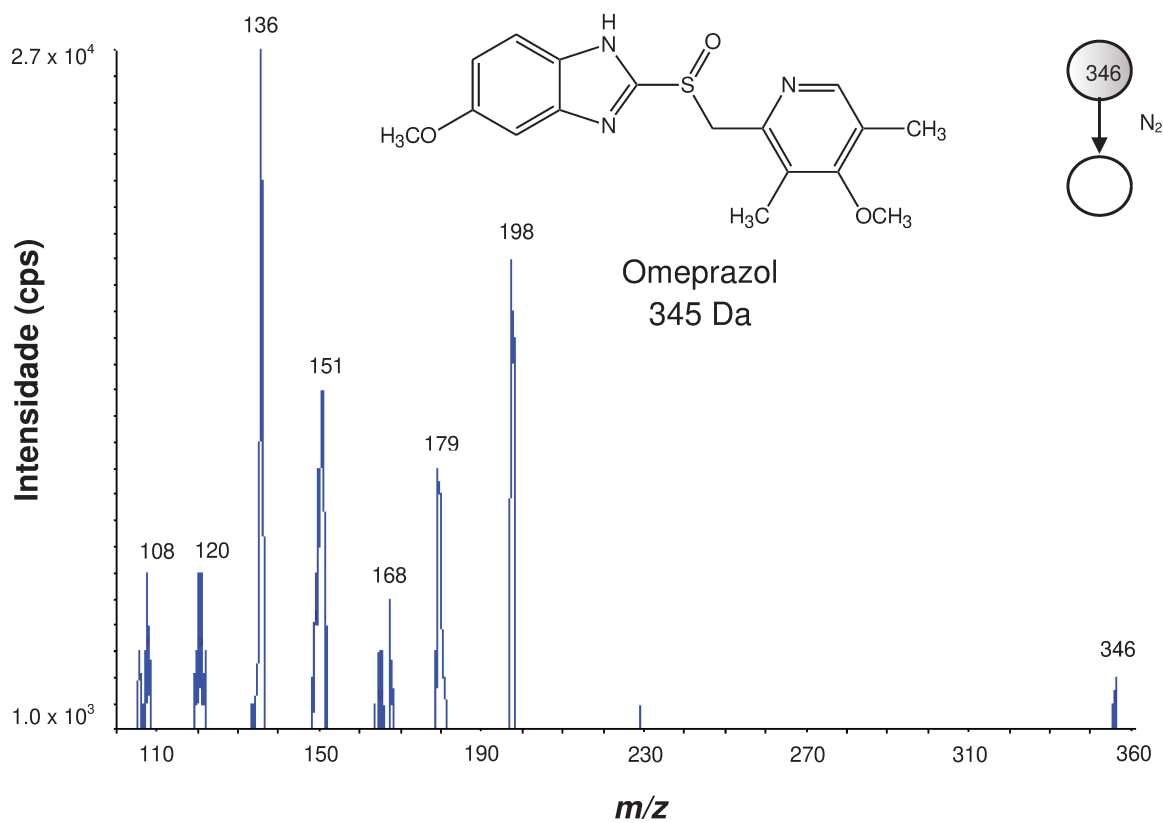


Figura II.6 – Espectro de fragmentação do omeprazol.

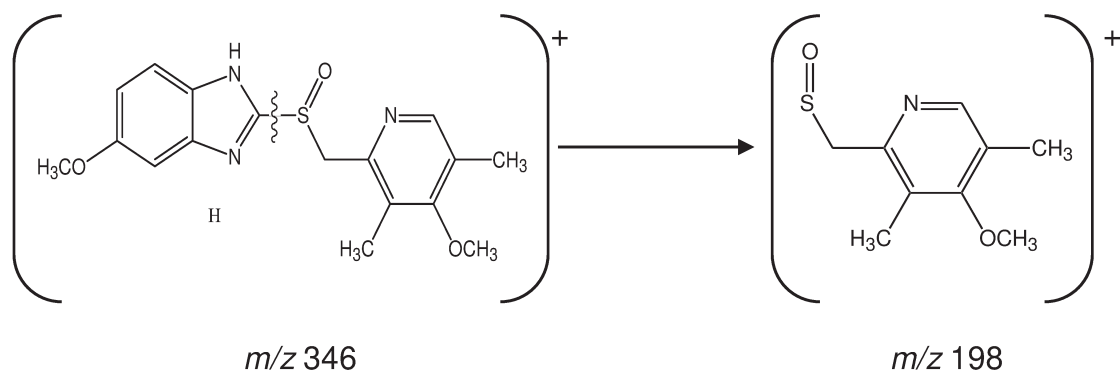


Figura II.7 – Proposta de rota de fragmentação do omeprazol.

A partir destes resultados, foram selecionadas as transições de identificação e confirmação do omeprazol nas análises quantitativas do fármaco utilizando o modo MRM. As transições selecionadas foram 346>198 e 346>136, respectivamente.

Utilizando-se os parâmetros citados no item **II.4.5**, foi possível realizar a quantificação do omeprazol em todas as etapas do estudo.

II.5.3 Estudos de Adsorção

Os estudos de adsorção, conforme descrito no item **3.4**, foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros sintetizados. Assim, a adsorção do omeprazol nos polímeros MIP e NIP foi verificada variando-se a concentração das soluções do analito, preparadas em MeOH, meio escolhido para o reconhecimento molecular. A quantidade de omeprazol adsorvida (*B*) pelos polímeros MIP e NIP foi estimada através da **Equação II.1**:

$$\frac{B = (I - F) \times V}{m_{polímero}} \quad \text{Equação II.1}$$

Onde:

I é a concentração inicial da solução ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

F é a concentração de analito em solução ($\mu\text{g mL}^{-1}$), após a etapa de adsorção;

B é a quantidade de omeprazol adsorvida pelo polímero ($\mu\text{g g}^{-1}$);

V é o volume de solução contendo omeprazol utilizado no estudo (mL);

m_{polímero} é a quantidade de polímero utilizada no estudo (g).

Os resultados do estudo de adsorção são mostrados na **Tabela II.2**.

Tabela II.2—Omeprazol adsorvido nos polímeros MIP e NIP (mg g^{-1}).

Omeprazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIP (mg g^{-1})	NIP (mg g^{-1})
100	$9,64 \pm 0,02$	$9,40 \pm 0,08$
200	$18,77 \pm 0,04$	$17,81 \pm 0,13$
300	$26,77 \pm 0,07$	$24,35 \pm 0,41$
400	$33,04 \pm 0,10$	$29,05 \pm 0,71$
600	$57,70 \pm 0,68$	$44,63 \pm 0,18$
800	$71,05 \pm 0,53$	$59,03 \pm 0,16$
1200	$76,62 \pm 0,25$	$62,81 \pm 0,13$
2000	$81,89 \pm 0,31$	$65,89 \pm 0,04$
3300	$84,78 \pm 0,51$	$66,44 \pm 0,35$
4500	$86,61 \pm 0,25$	$67,78 \pm 0,07$

As isotermas de adsorção obtidas são apresentadas na **Figura II.8**, na qual se verifica que ambas apresentam duas regiões distintas. A primeira, entre 100 e $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ aproximadamente, é conhecida como região de sub-saturação e a segunda, a partir de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, é chamada de região de saturação. Nesta última, os sítios específicos e não específicos de ligação são ocupados e a concentração do analito ligado ao polímero permanece constante.

A adsorção do omeprazol nos polímeros impresso e não impresso mostrou-se de forma diferenciada, uma vez que o analito apresentou uma preferência pelo MIP, característica evidenciada pelo maior valor de B na região de saturação da isoterma de adsorção do polímero impresso.

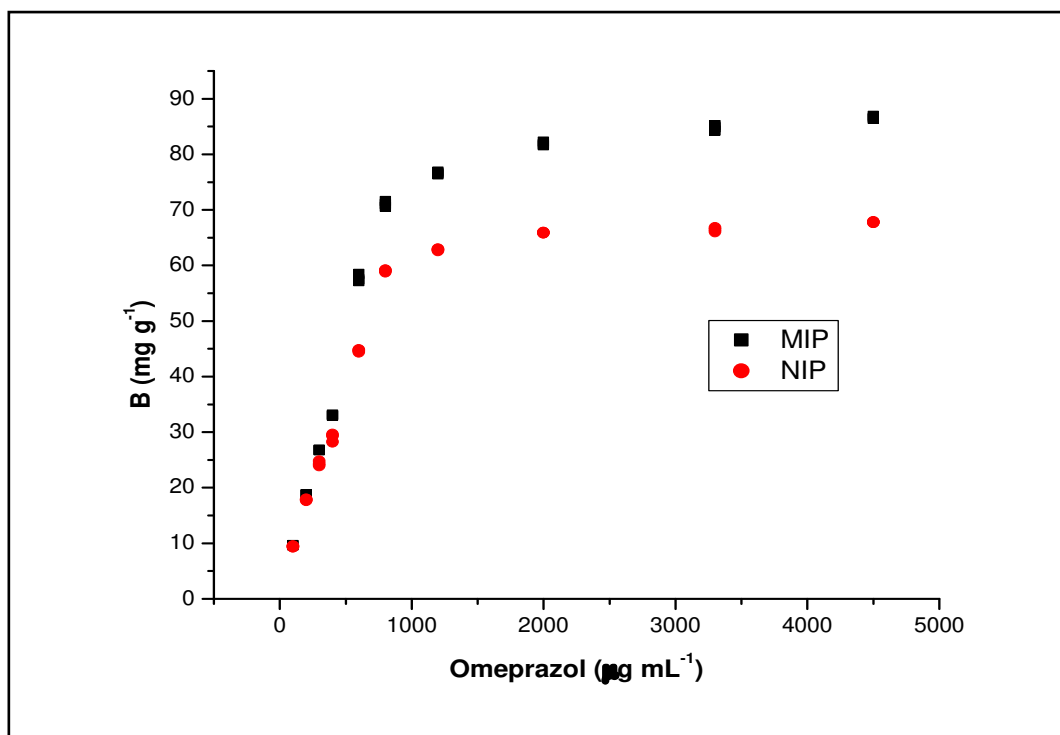


Figura II.8 – Isotermas de adsorção do omeprazol pelos polímeros MIP e NIP.

II.5.4 Otimização do MISPE

✓ *Lavagem do MISPE*

A seletividade durante a MISPE pode ser conseguida por dois modos distintos: através de um processo de adsorção seletiva ou por uma dessorção seletiva. No primeiro modo o analito é seletivamente retido nos sítios específicos de ligação, através de interações não covalentes, enquanto que as moléculas interferentes não são retidas por estes sítios. Por fim, a eluição do analito pode ser realizada por meio de um solvente orgânico apropriado. Já no processo de dessorção seletiva, que é o caso deste estudo, os analitos e outros interferentes

são retidos pela matriz polimérica hidrofóbica, que age como um material de fase reversa sem especificidade aparente. No entanto, a eluição dos compostos interferentes é conseguida aumentando-se a hidrofobicidade da fase móvel enquanto que a molécula molde não é eluída, permanecendo retida nos sítios específicos de ligação (BAGGIANI *et al.*, 2007b).

Desta forma, o procedimento de lavagem dos cartuchos foi estudado, no sentido de que fosse feito um processo de dessorção seletiva, que rompesse as interações não específicas entre a molécula de omeprazol e o polímero não impresso. Os solventes testados nesta etapa foram: água (H₂O), acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e a solução H₂O:MeOH (80:20).

Foi avaliada também a quantidade de etapas de lavagem do cartucho. Dessa forma, após o carregamento da amostra, foram efetuadas 1 ou 2 etapas de lavagem utilizando os solventes acima mencionados.

As porcentagens de omeprazol removida, após a etapa de lavagem dos cartuchos de acordo com a quantidade de etapas de lavagem e o solvente utilizado, são mostradas na **Figura II.9**.

Idealmente, o solvente de lavagem mais apropriado deveria promover a remoção do analito somente no cartucho do polímero de controle. Porém, como pode ser visto na **Figura II.9**, em nenhum dos casos esse comportamento foi verificado. Dentre as possibilidades avaliadas, a lavagem que utilizou acetato de amônio 10 mM apresentou o melhor grau de seletividade, uma vez que removeu cerca de 40 % de omeprazol do NIP e aproximadamente 4 % no caso do MIP. Por este fato, o mesmo foi empregado para a lavagem dos cartuchos em estudos posteriores.

Quanto ao número de etapas de lavagem, nenhum dos resultados apresentou uma diferença significativa. Por isso, optou-se por efetuar apenas 1 etapa de lavagem nos estudos posteriores.

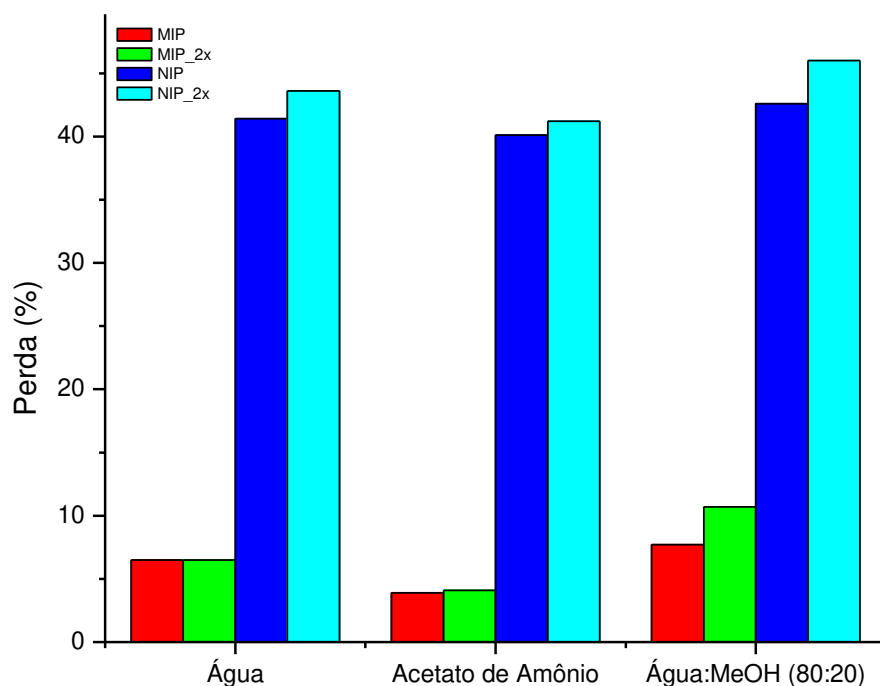


Figura II.9 –Perda de omeprazol em função da quantidade de etapas e do solvente de lavagem.

✓ *Eluição do Omeprazol*

Nesta etapa de otimização do MISPE foi avaliada a eficiência de eluição da molécula de omeprazol por diferentes solventes. Assim, os cartuchos contendo os polímeros MIP e NIP foram carregados com 2 mL de uma solução contendo 1 mL de plasmafortificado com omeprazol ($1\mu\text{g mL}^{-1}$ preparado em MeOH) + 1 mL H_2O a uma vazão de 1 mL min^{-1} , lavados com 3 mL de acetato de amônio 10 mmol L^{-1} e eluídos com 2 mL dos diferentes solventes testados. A **Figura II.10** apresenta as porcentagens totais de omeprazol recuperadas após as etapas de lavagem e eluição.

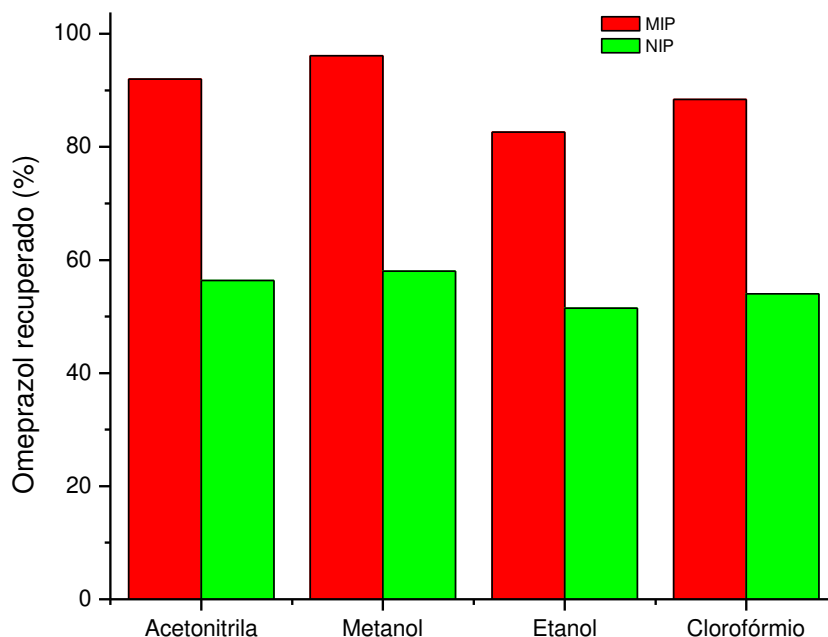


Figura II.10 – Porcentagem de omeprazol recuperado após as etapas de lavagem com acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e eluição com diversos tipos de solventes.

Como podemos observar na **Figura II.10**, a eficiência de eluição diminui na seguinte forma: metanol > acetonitrila > clorofórmio > etanol. Desta forma, o solvente de escolha para ser utilizado na etapa de eluição foi o metanol.

✓ *Seletividade*

A seletividade do MIP foi avaliada extraíndo-se soluções teste contendo omeprazol e seus análogos estruturais pantoprazol e lansoprazol na concentração 250 ng mL⁻¹ (MeOH), em cartuchos contendo os polímeros MIP e NIP. O método de extração contemplou todas as etapas do preparo de amostras, ou seja, o cartucho contendo os polímeros foi condicionado com 3 mL de metanol seguidos de 3 mL de água; o carregamento dos cartuchos foi efetuado com 1 mL da

solução teste; a lavagem do cartucho foi realizada com 3 mL de acetato de amônio 10 mmol L^{-1} e a eluição foi feita com 2 mL de metanol. A análise do eluato foi efetuada utilizando-se as condições citadas no item **II.4.5**.

A **Figura II.11** apresenta as estruturas químicas do pantoprazol e do lanzoprazol, análogos estruturais do omeprazol.

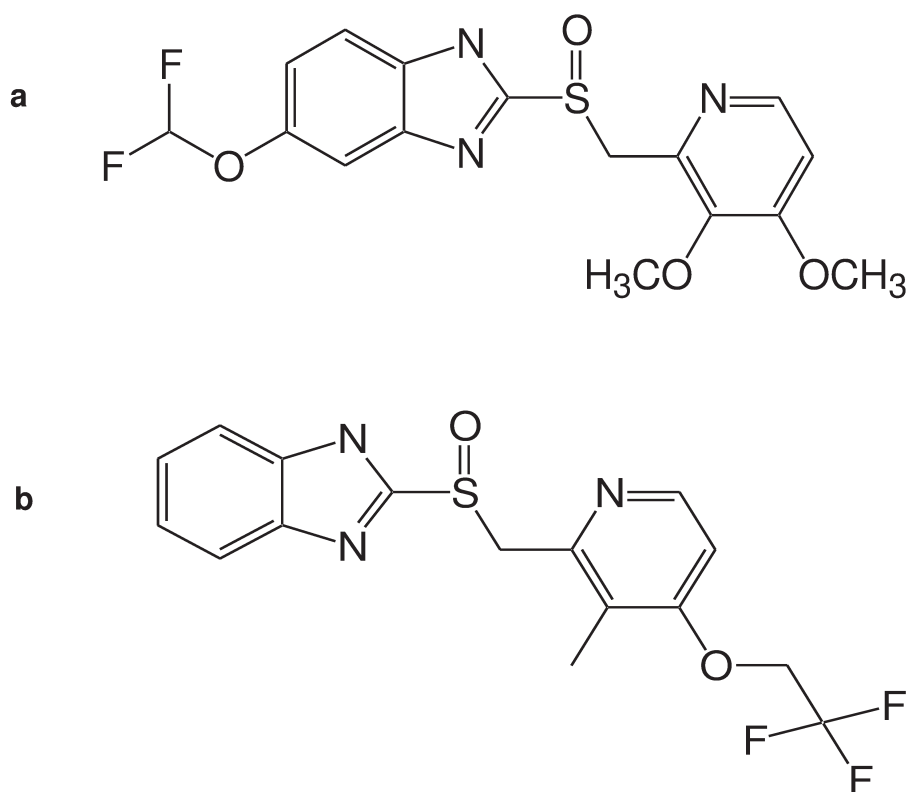


Figura II.11 – Estrutura química do pantoprazol (a) e lanzoprazol (b).

A **Figura II.12** compara os cromatogramas de HPLC-MS/MS obtidos após a extração das soluções teste pelos polímeros MIP e NIP.

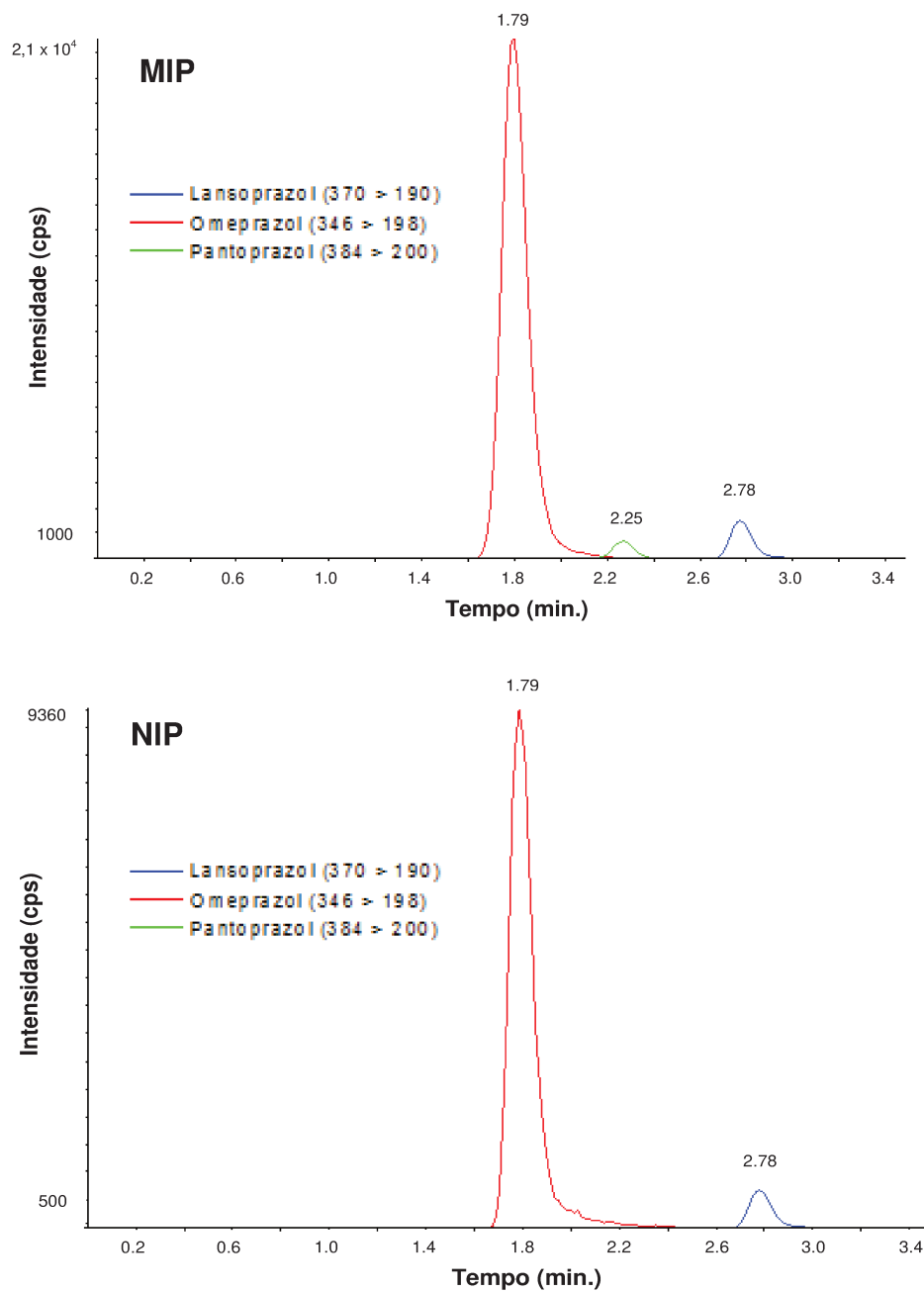


Figura II.12 – Cromatogramas de HPLC-MS/MS correspondente a extração de solução metanólica contendo omeprazol, pantoprazol e lansoprazol utilizando os polímeros MIP e NIP.

A comparação entre os cromatogramas mostra o sucesso da impressão molecular pelo polímero impresso sintetizado. O pico para o omeprazol no cromatograma obtido após a extração utilizando o cartucho contendo o polímero

de controle é menos intenso, se comparado ao pico obtido após extração com o cartucho contendo o MIP, confirmando assim que ocorreu a impressão molecular. Apesar das três moléculas avaliadas apresentarem estruturas semelhantes, pode-se notar que a retenção pelo polímero MIP destas estruturas se mostrou deficiente. O pantoprazol apresentou uma retenção mínima pelo polímero MIP e uma retenção abaixo do identificado para o polímero NIP. Esta situação pode ser explicada pelas propriedades físico-químicas da molécula de pantoprazol, uma vez que a mesma, diferentes das outras moléculas avaliadas, é solúvel em água. Assim, pode sugerir que a etapa de lavagem dos cartuchos foi um fator que influenciou na eliminação da molécula de pantoprazol pelos polímeros.

O lansoprazol apresentou mínima retenção para ambos os polímeros. Como as propriedades físico-químicas do lansoprazol e do omeprazol são semelhantes, sugeriu-se que a retenção do lansoprazol pelo polímero MIP e NIP ocorreu por interações não-específicas. Desta forma, pode-se concluir que o polímero impresso sintetizado é seletivo apenas para a molécula de omeprazol.

II.5.5 Validação do Método Analítico

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reproduzíveis. Conforme a classificação proposta pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2002), os procedimentos de validação podem ser divididos entre (1) validação completa (*full validation*) e (2) validação do método em um único laboratório (*single-laboratory validation*). O procedimento envolvido no presente trabalho teve como foco a validação do método analítico para um laboratório. Os parâmetros analíticos de validação usados para avaliar o método de separação desenvolvido no presente trabalho são: seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

➤ Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método em quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes presentes na amostra. É um parâmetro que deve ser demonstrado e que depende do método analítico empregado. Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (THOMPSON *et al.*, 2002). Assim, uma comparação dos cromatogramas obtidos a partir de uma amostra branco de plasma e uma amostra branco de plasma fortificada com omeprazol a 5 ng mL⁻¹ (**Figura II.13**), comprovam a seletividade do método frente à ausência de interferentes presentes no plasma.

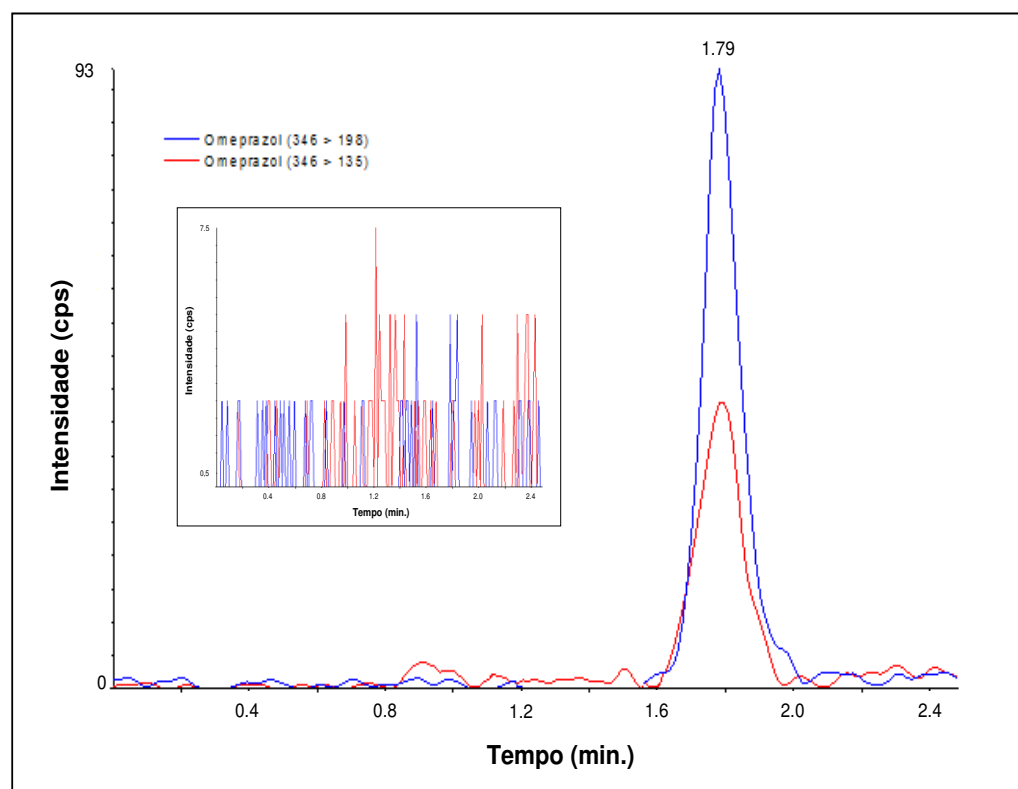


Figura II.13 – Cromatogramas de HPLC-MS/MS correspondente a extração de amostra branco de plasma (em detalhe) e amostra branco de plasma fortificada com omeprazol a 5 ng mL⁻¹, utilizando o MISPE no preparo de amostra.

➤ **Curva Analítica, Linearidade e Sensibilidade**

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito no qual o método pode ser aplicado. Segundo a ANVISA (2003), a curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Desta forma, as curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de amostras branco de plasma em seis níveis de fortificação (5, 50, 100, 500, 1000 e 2500 ng mL⁻¹). Após a fortificação, as amostras foram submetidas ao processo de extração utilizando MISPE como preparo de amostra. Um esquema geral, com apontamentos das principais etapas envolvidas neste preparo de amostra é ilustrado pela **Figura II.14**.

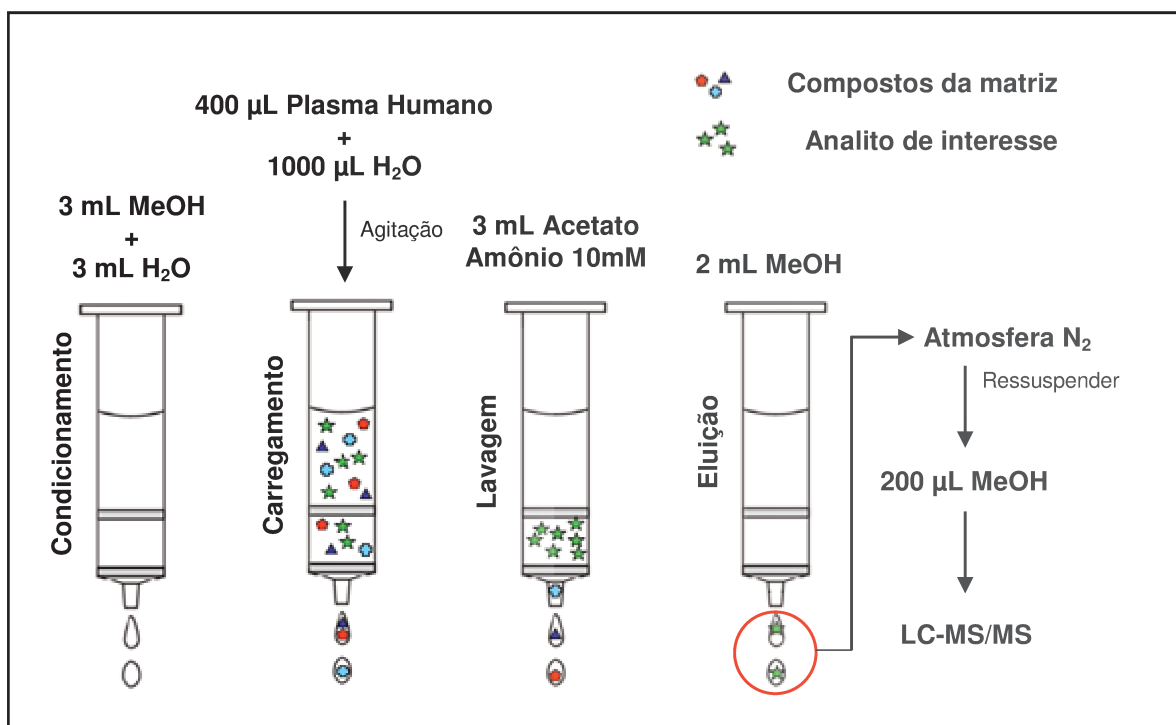


Figura II.14 – Esquema geral da etapa de preparo de amostra utilizando MISPE para extração de omeprazol de plasma humano.

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro

da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear. A ANVISA (2003) preconiza que o coeficiente de correlação linear deva ser igual ou superior a 0,98. Os resultados obtidos foram superiores a 0,99.

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta do detector varia em função da concentração do analito, e foram expressas pelos coeficientes angulares das retas (inclinações) obtidas das regressões lineares das curvas analíticas.

As curvas analíticas obtidas para a quantificação de omeprazol em plasma humano usando o método MISPE-LC-MS/MS em três dias diferentes estão apresentadas na **Figura II.15**. Considerando a linearidade e a dispersão dos resultados, fica comprovada a adequação do método desenvolvido para a faixa linear de trabalho de concentrações de omeprazol em plasma humano de 5 a 2500 ng mL⁻¹.

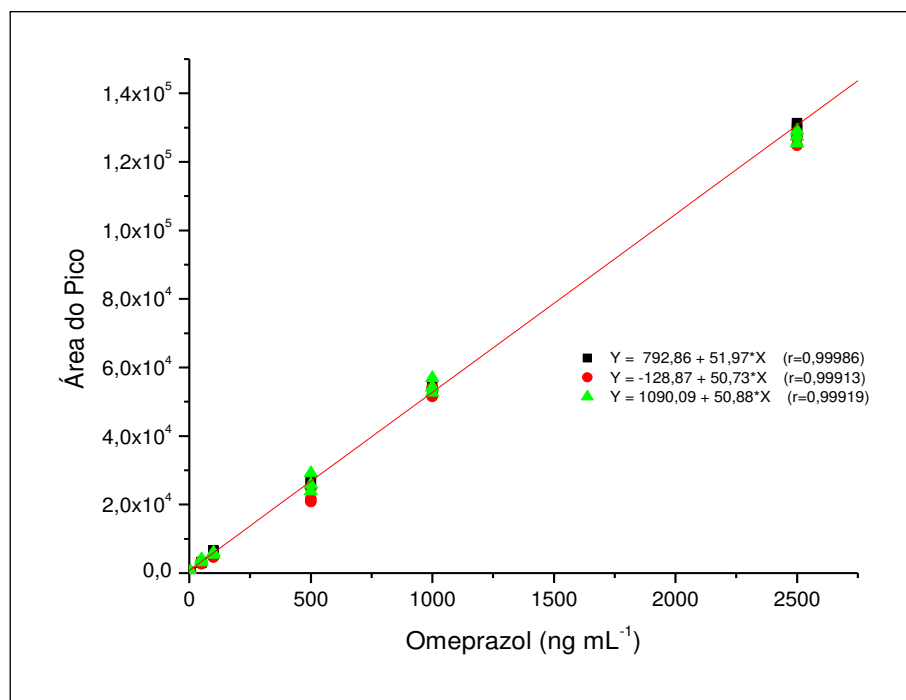


Figura II.15 – Curvas analíticas obtidas para a determinação de omeprazol em plasma humano utilizando o método MISPE-LC-MS/MS em três dias diferentes.

➤ **Limite de Detecção (LD)**

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do zero (THOMPSON *et al.*, 2002) ou do ruído de fundo (ANVISA, 2003). De modo geral, o LD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas.

O limite de detecção foi determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 3, no tempo de retenção do omeprazol, em amostras branco de plasma humano ($n = 3$). O resultado obtido, apresentado como valor médio das replicatas, foi de 1 ng mL^{-1} .

➤ **Limite de Quantificação (LQ)**

A definição segundo a IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2002) para o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A ANVISA (2003) cita que o LQ pode ser obtido por meio da análise da amostra branco adicionada de concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Propõe, ainda, para o estabelecimento do LQ o emprego da razão de 5:1 para o sinal e ruído da linha de base.

Desta forma, o limite de quantificação (LQ) foi determinado nos tempos de retenção do omeprazol, em amostras branco de plasma humano ($n = 3$). O limite de quantificação selecionado foi de 5 ng mL^{-1} , o qual apresentou razão sinal/ruído de ≈ 25 .

➤ **Precisão**

Segundo a IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2002), a precisão corresponde ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas e é expressa pela estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Para a validação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque proposto neste trabalho, duas etapas são relevantes para esse parâmetro: (i) precisão intra-ensaio: sob condições de repetibilidade, descreve as variações observadas durante análises em um curto espaço de tempo; e (ii) precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes condições (geralmente em dias diferentes).

Assim, como a IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2002), a ANVISA (2003) também subdivide o parâmetro precisão em intra- e inter-ensaios. Recomenda para a composição dos ensaios, a seleção de pelo menos três diferentes concentrações; um mínimo de cinco determinações para cada concentração analisada ($n = 5$). Expressando em termos de coeficientes de variação (CV), a ANVISA (2003) recomenda que os resultados não excedam 15 % de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20 % do CV).

A precisão obtida foi avaliada em situação de intra- e inter-ensaios. A precisão intra-ensaios foi obtida para quatro níveis de concentração, mediante fortificação de plasma branco, analisadas em quintuplicatas ($n = 5$), em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e os resultados obtidos, expressos como a estimativa dos desvios padrão relativos (RSD), são apresentados na **Tabela II.3**.

A precisão inter-ensaios foi obtida para quatro níveis de concentração, mediante fortificação de plasma branco, analisadas em quintuplicatas ($n = 5$) e realizadas em três dias diferentes ($n = 3$). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e os resultados obtidos, são apresentados na **Tabela II.3**.

Os níveis de concentração utilizados nos ensaios de precisão foram: limite de quantificação (5 ng mL^{-1}), controle de qualidade baixo – CQB (10 ng mL^{-1}), controle de qualidade médio – CQM (800 ng mL^{-1}) e controle de qualidade alto – CQA (2000 ng mL^{-1}).

Como pode ser visto na **Tabela II.3**, os resultados de precisão intra- e inter-ensaios foram inferiores a 15 %, conforme recomendado pela ANVISA (2003).

➤ **Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON *et al.*, 2002). Pode ser obtida mediante: (i) uso de material de referência certificado (MRC), (ii) comparação de métodos ou (iii) ensaios de recuperação (MILLER & MILLER, 1993).

A exatidão do método desenvolvido no presente trabalho foi avaliada mediante testes de recuperação, com amostras branco de plasma humano fortificadas com omeprazol em concentrações correspondentes ao limite de quantificação - LQ (5 ng mL^{-1}), controle de qualidade baixo – CQB (10 ng mL^{-1}), controle de qualidade médio – CQM (800 ng mL^{-1}) e controle de qualidade alto - CQA (2000 ng mL^{-1}), repetidos em cinco vezes ($n = 5$). Os resultados obtidos, transformados em porcentagem da quantidade conhecida de omeprazol após desenvolvimento do procedimento de extração, são apresentados na **Tabela II.3**.

Tabela II.3 – Parâmetros de validação do método de determinação de omeprazol em plasma humano por MISPE-LC-MS/MS.

	LQ (5 ng mL ⁻¹)		CQB (10 ng mL ⁻¹)		CQM (800 ng mL ⁻¹)		CQA (2000 ng mL ⁻¹)	
	Exatidão (%)	RSD (%)	Exatidão (%)	RSD (%)	Exatidão (%)	RSD (%)	Exatidão (%)	RSD (%)
Dia 01 (n = 5)	119	11,2	107	6,8	104	2,1	102	1,6
Dia 02 (n = 5)	101	11,1	109	3,2	101	1,5	102	1,1
Dia 03 (n = 5)	105	10,4	105	4,9	101	0,9	100	1,9
Média 3 dias (n = 15)	108	12,5	107	5,1	102	2,0	102	1,7

II.5.6 Aplicação do Método

O método MISPE-LC-MS/MS foi aplicado na determinação de omeprazol em plasma de 3 voluntários de estudo farmacocinético. As amostras foram cedidas pela UNIFAG – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia e o acesso a quaisquer informações acerca do nome comercial e dose do medicamento utilizado, ou dos voluntários envolvidos no estudo foram mantidos em segredo devido à propriedade de informação da empresa acima citada.

Com acesso apenas a informação do tempo de amostragem, foi possível a construção de curvas da concentração plasmática *versus* tempo. (**Figura II.16**).

A concentração plasmática máxima observada (C_{max}) e o tempo para atingir este nível máximo (T_{max}), foram obtidos diretamente das curvas de concentração *versus* tempo. Estes valores estão apresentados na **Tabela II.4**.

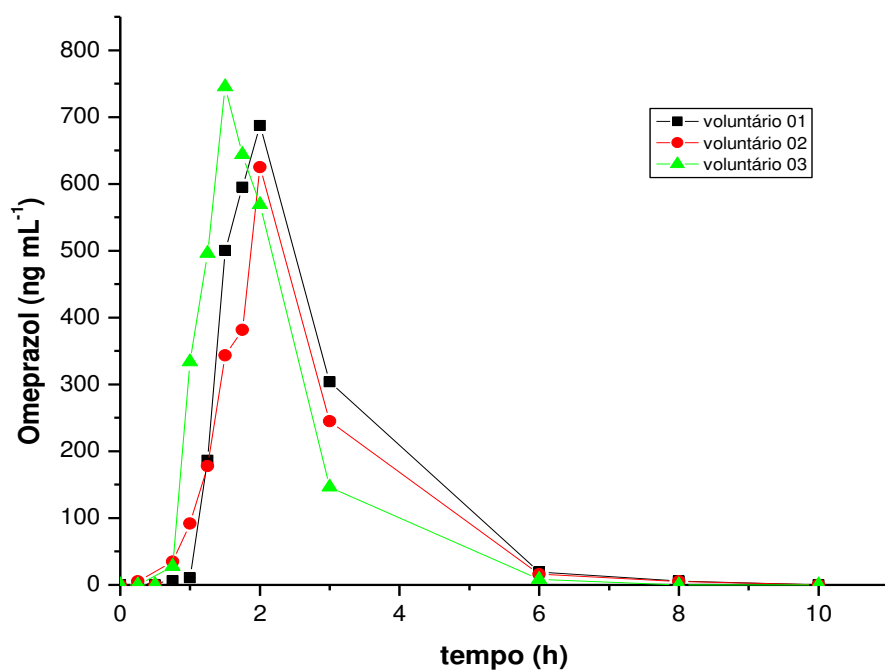


Figura II.16 – Curva de concentração plasmática *versus* tempo de três voluntários de um estudo farmacocinético.

Tabela II.4 –Parâmetros farmacocinéticos obtidos através da curva de concentração plasmática *versus* tempo.

Parâmetros Farmacocinéticos		
	C_{max} (ng mL ⁻¹)	Tmax (h)
Voluntário 01	687,4	2,00
Voluntário 02	625,0	2,00
Voluntário 03	643,8	1,75
Média	652,1 ± 32,0	1,92 ± 0,14

II.6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste capítulo é possível concluir que:

- O polímero de impressão molecular, sintetizado a partir do omeprazol como molécula molde, 4-vinilpiridina como monômero funcional, etileno glicol dimetacrilato como reagente de ligação cruzada, 2'2'azo-bis-isobutironitrila como iniciador radicalar e como solvente porogênico a mistura de tolueno:MeOH (50:50), foi capaz de reconhecer molecularmente o omeprazol presente em soluções de diferentes concentrações em metanol.
- A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) apresentou-se com excelência na determinação de omeprazol em todas as etapas deste trabalho.
- Os polímeros MIP e NIP apresentaram características químicas semelhantes (FT-IR e RMN) e características morfológicas distintas, onde o polímero impresso apresentou área superficial e volume de poro maior que o NIP. Porém, o MIP apresentou um diâmetro de poro maior que o NIP.
- O preparo de amostras utilizando MISPE apresentou-se de forma satisfatória para extração do omeprazol em plasma humano, onde em alguns procedimentos testados foi obtida uma eficiência de extração em torno de 100 %.
- O polímero MIP foi seletivo apenas para o omeprazol, quando testada sua seletividade frente aos análogos estruturais pantoprazol e lansoprazol.
- O método MISPE-LC-MS/MS desenvolvido é adequado para a quantificação de omeprazol em plasma humano, apresentando os parâmetros de validação conforme preconizados pela ANVISA.

CAPÍTULO III

MISPE-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA EM URINA HUMANO

III.1 Introdução

A Química Forense é o ramo das ciências forenses voltado para análise de substâncias diversas em matrizes tais como drogas lícitas e ilícitas, venenos, acelerantes e resíduos de incêndio, explosivos, resíduos de disparo de arma de fogo, combustíveis, tintas, fibras, dentre outros (PASSAGLI, 2009).

As substâncias psicotrópicas, normalmente derivadas de plantas, são usadas pela humanidade na busca de experiências religiosas ou mesmo de prazer e bem estar desde suas origens. Tais drogas atuam no sistema nervoso central (SNC), modificando o humor, a consciência, os sentimentos, as sensações, o estado de vigília. Porém, o uso abusivo, inconsequente e indiscriminado é um fenômeno mais recente e cada vez mais disseminado nas sociedades contemporâneas (GOWING *et al.*, 2002).

As substâncias químicas comumente usadas como drogas de abuso e que determinam drogadição, isto é, que causam dependência psíquica e física, podem ser classificadas em três grandes classes de acordo com a sua principal ação no SNC: depressores do SNC, onde estão incluídos os barbitúricos, opióides e o etanol; perturbadores do SNC, onde encontram-se as drogas alucinógenas como o LSD, psilocibina, mescalina e canabinóides; e estimulantes do SNC, incluindo a cocaína, crack, anfetaminas e anorexígenos (PASSAGLI, 2009).

Uma das drogas de abuso mais abordada na toxicologia forense, quer seja no monitoramento do uso de drogas ilícitas no tratamento da toxicodependência, quer seja na justiça criminal ou nos programas de testes de drogas no local de trabalho, é a cocaína, objeto de estudo deste capítulo.

III.2 Cocaína

A cocaína (**Figura III.1**) é um alcalóide utilizado como droga, encontrado nas folhas do arbusto *Erythroxylum coca*, com efeitos anestésicos e cujo uso continuado pode causar outros efeitos indesejados como dependência, hipertensão arterial e distúrbios psiquiátricos (JANICKA *et al.*, 2010).

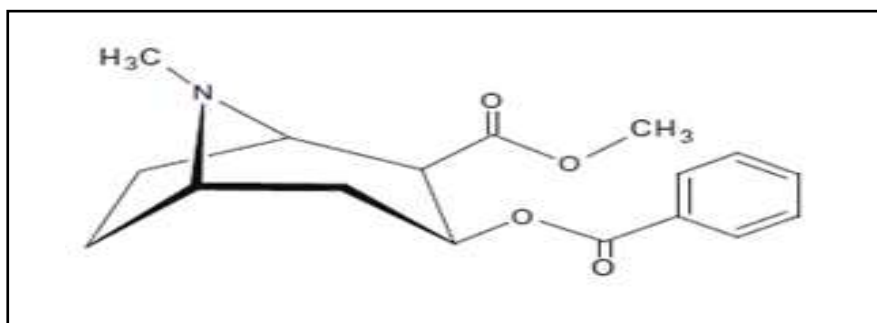


Figura III.1—Estrutura química da cocaína.

A cocaína vendida como pó hidrossolúvel (cloridrato de cocaína) tem sua composição variável, pois geralmente encontra-se modificada com aditivos como açúcares (glicose, lactose) e sais de baixo custo (bicarbonato de sódio, carbonato) e com aditivos adulterantes como anestésicos locais (lidocaína, benzocaína e procaína) e estimulantes como a cafeína. As vias de administração mais comuns do cloridrato de cocaína são a via intravenosa e intranasal e mais raramente por via oral que, quando utilizada, se dá geralmente coma ingestão de bebidas alcoólicas destiladas. Na forma de cloridrato, não é possível fumar a cocaína, pois, além de não volatilizar, decompõe-se em altas temperaturas (PASSAGLI, 2009).

A cocaína na forma de base livre, conhecida como *crack*, pode ser fumada, tendo em vista que esta forma volatiliza-se a 90 °C. Quando aquecida permite que seus vapores sejam inalados no ato de fumar, proporcionando assim uma

velocidade de absorção muito alta devido à exposição da superfície pulmonar, que é altamente vascularizada (PASSAGLI, 2009).

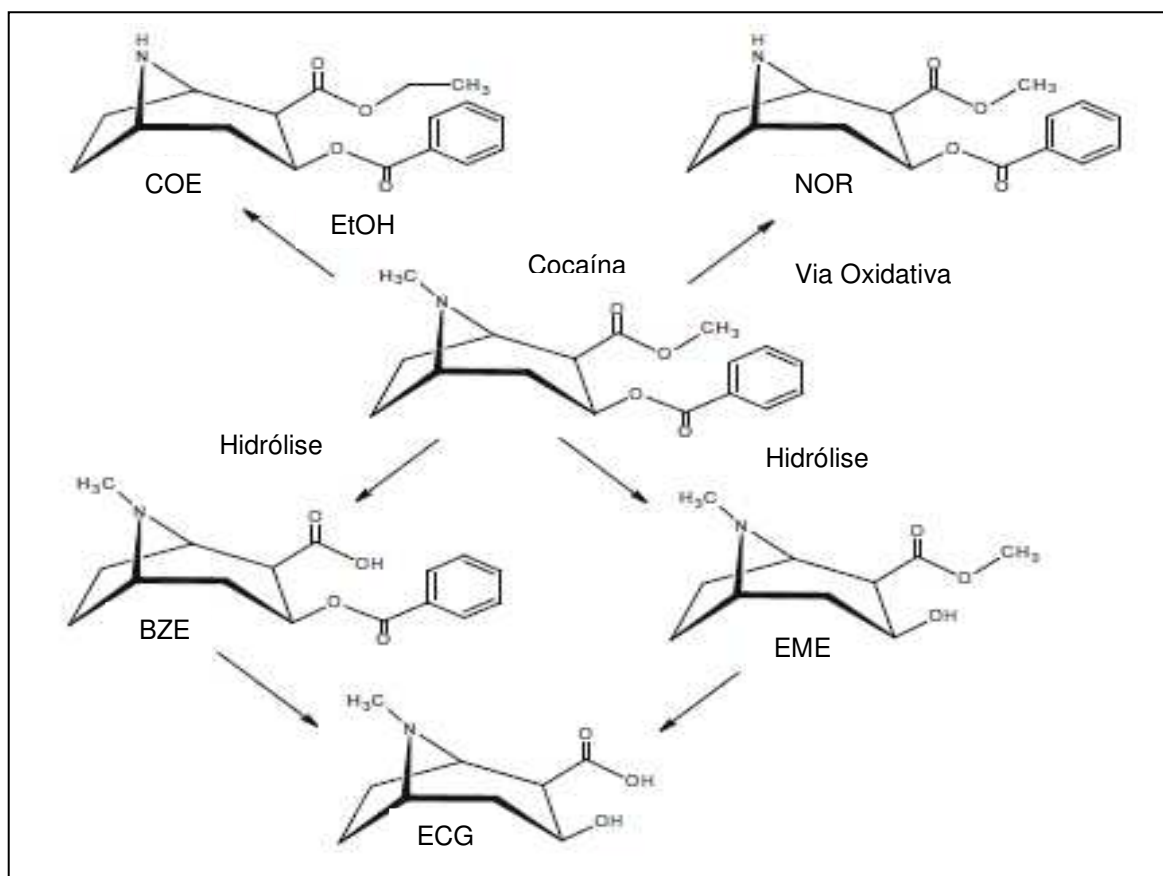


Figura III.2 – Principais metabólitos da cocaína. Cocaetilenos (COE), norcocaína (NOR), benzoilecgonina (BZE), éster metilecgonina (EME) e ecgonina (ECG). Adaptado de JANICKA *et al.*, 2010.

A biotransformação da cocaína ocorre por duas vias metabólicas distintas (**Figura III.2**): hidrólise (não enzimática ou enzimática com esterases) e oxidação com oxidases. A hidrólise ocorre no sangue e tecidos enquanto a oxidação ocorre principalmente no fígado. Os principais metabólitos de hidrólise são éster metilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE). A ecgonina (ECG) é um produto de hidrólise não enzimática de EME e/ou hidrólise enzimática de BZE. A via oxidativa promove a N-desmetilação da cocaína, onde o principal produto é norcocaína

(NOR). A ingestão de álcool combinada com a administração de cocaína resulta na transesterificação hepática da droga na forma de cocaetileno (COE). Quando o *crack* é fumado, além dos produtos de biotransformação da cocaína, outro produto aparece, o éster metilanidroecgonina (AEME), produto que se forma pela pirólise da cocaína no ato de fumar (SHAKLEYA *et al.*, 2010; JANICKA *et al.*, 2010).

Devido à meia-vida biológica da cocaína (0,5 a 1,5 h) ser muito curta, sua detecção como droga de abuso é geralmente baseada na determinação de seu principal metabolito BZE, que apresenta uma meia-vida de 5 a 8 h. A urina é uma matriz biológica que apresenta uma alta janela de detecção, onde se pode encontrar BZE até 3 a 5 dias após o consumo (JAGERDEO *et al.*, 2008).

As técnicas analíticas utilizadas na identificação e quantificação de cocaína em matrizes biológicas são divididas em dois grupos: técnicas de triagem, onde as mais comuns são a cromatografia de camada delgada (CCD) e radioimunoensaio (RIA); e técnicas confirmatórias, as quais são baseadas nas cromatografias gasosa e líquida acopladas a espectrometria de massas (MOODY *et al.*, 2004; SERGI *et al.*, 2009; BJØRK *et al.*, 2010; CHIUMINATTO *et al.*, 2010; COGNARD *et al.*, 2005).

O pré-tratamento da amostra de urina é estritamente necessário para eliminar espécies interferentes de matriz (substâncias endógenas como proteínas e espécies não voláteis), as quais podem gerar resultados falso-positivos, bem como para pré-concentrar os analitos de interesse e reduzir o efeito de matriz (supressão/superestimativa do sinal iônico quando técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas são usadas). A extração líquido-líquido, extração em fase sólida off-line e online são as técnicas mais utilizadas (KWORK *et al.*, 2010; MAQUILLE *et al.*, 2009; ROBANDT *et al.*, 2008). A SPE online é a estratégia de escolha para melhorar a detectabilidade do método, diminuir o tempo de análise e pré-tratamento, e para aumentar o número de amostras analisadas no mesmo tempo.

Em vista destes fatos, propõe-se sintetizar um polímero de impressão molecular adotando a cocaína como molécula molde e avaliar a potencialidade deste material como fase estacionária em SPE online. O MISPE será empregado no preparo de amostras na determinação de cocaína e metabólitos em urina humana. Uma busca na literatura mostrou que ainda não foram publicados trabalhos utilizando polímeros de impressão molecular no preparo de amostras contendo cocaína.

III.3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente capítulo foi sintetizar polímeros de impressão molecular para serem utilizados no preparo de amostra para a determinação de cocaína em urina humana por MS/MS.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Sintetizar e caracterizar polímeros de impressão molecular, através da técnica de polimerização “*in bulk*” utilizando a molécula de cocaína como molde.
- Desenvolver um método de determinação de cocaína e seus metabólitos em urina humana por MS/MS utilizando MISPE *online* como preparo de amostra.
- Avaliar o reconhecimento molecular dos metabólitos de cocaína presentes na urina pelo polímero sintetizado.
- Aplicar o método MISPE-MS/MS na determinação de cocaína e metabólitos em urina de usuários.

III.4 PARTE EXPERIMENTAL

III.4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada. Os reagentes, soluções e ácidos empregados estão descritos a seguir: Cocaína e soluções de benzoilecgonina e cocaetileno foram gentilmente cedidas pela Polícia Civil do estado de São Paulo. Lidocaína, ácido metacrílico (MAA), etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Metanol e acetonitrila, ambos grau HPLC, foram adquiridos da J.T. Baker (EUA). Ácido acético ($C_2H_4O_2$) e ácido fórmico (CH_2O_2) foram adquiridos da Synth (Brasil).

III.4.2 Amostras

O Laboratório de Toxicologia do Centro de Controle de Intoxicações da UNICAMP gentilmente cedeu 10 amostras de urina de pacientes que apresentaram resultado positivo no teste de triagem para cocaína. As amostras foram armazenadas a - 20 °C até sua análise.

III.4.3 Síntese do Polímero de Impressão Molecular

O MIP foi sintetizado a partir de cocaína (0,25 mmol) como molécula molde, ácido metacrílico (MAA) (1,25 mmol) como monômero funcional, etileno glicoldimetacrilato (EGDMA) (6,25 mmol) como reagente de ligação cruzada e ACN (2,0 mL) como solvente porogênico. O iniciador radicalar utilizado foi 2,2 azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) (0,25 mmol). A polimerização foi “*in bulk*”, onde após a adição dos reagentes numa ampola de vidro, a mesma foi sonicada por aproximadamente 10 minutos, seguida pela remoção do O₂ mediante atmosfera de N₂ por 5 minutos e posterior aquecimento através de um banho de silicone a 60 °C por 24 h. Ao término deste período, foi obtido um sólido, o qual foi triturado e peneirado (malha de 100 µm). O material foi então transferido para cartuchos de SPE (vazios) contendo *frit* e então lavado com MeOH:H₃CCOOH (7:3v/v) até que as alíquotas recolhidas estivessem livres da molécula molde (cocaína). Por fim, os polímeros foram secos em uma estufa a 100 °C por um período de aproximadamente 12 h, e guardados em dessecador.

Polímeros de controle (NIP) também foram sintetizados, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, exceto pela não adição da molécula molde no meio reacional.

III.4.4 Medidas de Infravermelho

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em pastilhas de KBr 1% no intervalo espectral de 4000 a 500 cm⁻¹, utilizando espectrofotômetro FIT-IR Bomem MB Series (Canadá), modelo B100, em resolução de 4 cm⁻¹ e uma taxa de 20 varreduras por minuto.

III.4.5 Medidas de Ressonância Magnética

As medidas de ressonância magnética nuclear de ^{13}C empregando as técnicas de polarização cruzada e ângulo mágico de rotação (C^{13} CP-MAS NMR) foram feitas em um equipamento Bruker Avance II (Alemanha) de 400 MHz com tempo de contato de 3 μs e intervalo de acumulações de 3 s. No caso do MIP, o número de acumulações foi de 985 e para o NIP, 1784.

III.4.6 Medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras foram dispersas sobre uma fita de carbono condutora com dupla face (3MTM) previamente fixada sobre um porta amostra de latão. Em seguida foram recobertos com um filme condutor de ouro até a espessura de 12 nm utilizando-se um metalizador Balzers, modelo MED 020 da Bal-Tec. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um JEOL LV-JSM 6360 (Japão) operando em voltagem de 15 keV.

III.4.7 Medidas de Área Superficial Específica (S_{BET})

Para obter a extensão da superfície dos MIPs sintetizados, foram medidas as áreas superficiais. Para tanto, utilizou-se o método de BET (Brunauer-Emmett-Teller), que baseia-se na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diversas pressões na temperatura do nitrogênio líquido (IIER, 1979).

As medidas de porosimetria de sorção de nitrogênio foram realizadas em um ASAP 2010 da Micromeritics (EUA) adotando-se temperatura máxima de até 200 °C.

III.4.8 Medidas de Volume Específico e Diâmetro Médio dos Poros

As medidas de volume específico e diâmetro médio dos poros foram realizadas em um ASAP 2010 da Micromeritics (EUA) adotando-se temperatura máxima de até 200 °C.

III.4.9 Sistema MISPE *online*

Uma suspensão de polímero MIP (25mg) em MeOH foi transferida para um corpo de coluna cromatográfica (10 x 4,6 mm) com auxílio de uma seringa. Após o preenchimento completo da coluna, o sistema foi fechado. Esta “coluna” contendo o polímero MIP acoplada a um sistema de injeção de amostra e a um sistema de detecção, onde no caso deste trabalho foi a espectrometria de massas, é denominada MISPE *online*.

III.4.10 Determinação de Cocaína por MS/MS

A determinação da cocaína foi realizada utilizando um sistema HPLC Alliance Waters, modelo 2695 (EUA) constituído de um sistema de bombeamento quaternário e um sistema de injeção de amostra. O sistema HPLC foi acoplado a

um QTrap LC-MS/MS System AB Sciex (Canadá) com fonte de ionização por *electrospray*.

A ionização por *electrospray* foi obtida trabalhando no modo positivo. Os parâmetros instrumentais utilizados foram: *curtain* gás (N₂) a 25 psig; gás nebulizador GS1 e GS2 a 15 e 10 psig respectivamente; temperatura de dessolvatação (TEM) a 400 °C; gás de dissociação (CAD) a 6 unidades de uma escala arbitrária do equipamento; e voltagem do *ionspray* (IS) a 5500 V. O QTrap foi utilizado no modo MRM (monitorização de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) considerando as transições da cocaína pré-estabelecidas.

A fase móvel empregada foi composta de H₂O (A) e 30 % HCOOH em MeOH (B) sob as condições de gradiente reportadas na **Tabela III.1**. A velocidade do fluxo foi 2,0 mL min⁻¹. O volume de injeção foi 10 µL. O tempo total de corrida foi de 4 minutos.

Todos os resultados foram processados e analisados pelo software Analyst[®], versão 1.5 (AB Sciex, Canadá).

Tabela III.1 – Programação dos eluentes utilizados no MISPE_{online}-MS/MS.

Tempo (min.)	A (%)	B (%)	válvula	etapa envolvida
0,00	100	0	QTrap MS/MS	condicionamento
0,01 – 1,00	100	0	descarte	extração
1,01 – 3,00	0	100	QTrap MS/MS	eluição
3,01 – 4,00	100	0	QTrap MS/MS	condicionamento

* **A (%)** – H₂O e **B (%)** – 30 % HCOOH em MeOH.

III.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.5.1 Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FT-IR, obtidos em pastilhas de KBr, para os polímeros MIP e NIP são mostrados na **Figura III.3**. Novamente não são observadas diferenças no que diz respeito à composição química.

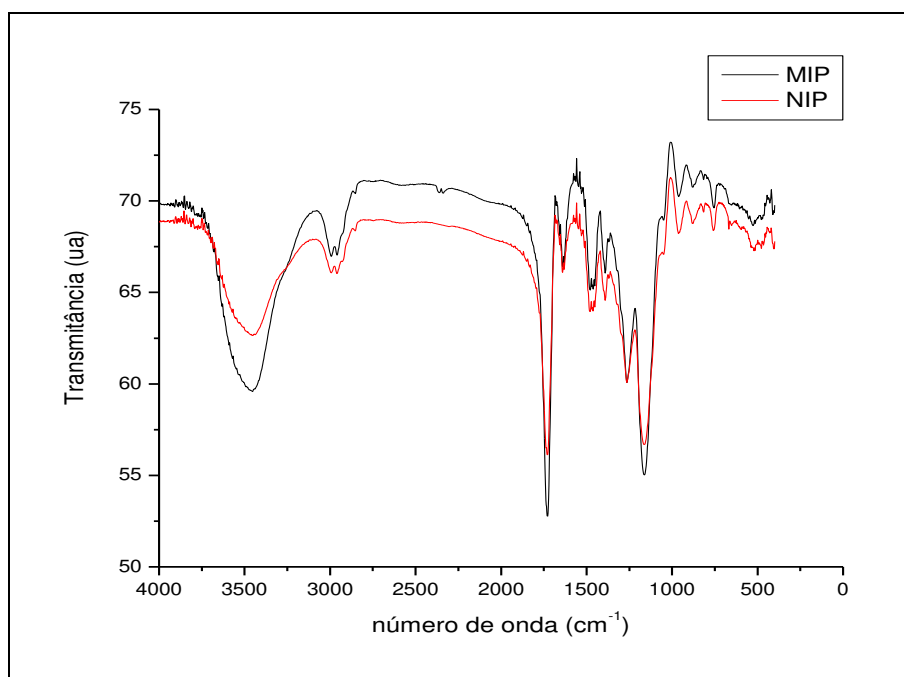


Figura III.3 – Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP.

As bandas encontradas nos espectros da **Figura III.3** são as seguintes:

- ✓ 3448 cm⁻¹ – deformação axial de O-H em ligação hidrogênio intermolecular.

- ✓ 2956/1995 cm^{-1} – deformação axial de C–H dos grupos metila e metileno.
- ✓ 1727 cm^{-1} – deformação axial de C=O dos grupos carboxílicos.
- ✓ 1635 cm^{-1} – deformação axial de C=C dos grupos vinila.
- ✓ 1449/1480 cm^{-1} – deformação angular de C–H do grupamento metileno.
- ✓ 1393 cm^{-1} – deformação angular de C–H devido o grupamento t-butila.
- ✓ 1264/1156 cm^{-1} – deformação axial de ésteres (COO).
- ✓ 955 cm^{-1} – deformação angular fora do plano de O–H.
- ✓ 749 cm^{-1} – deformação angular fora do plano de C–H.

III.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Como pode ser visto na **Figura III.4**, ambos os espectros apresentaram o mesmo perfil, reafirmando assim a igualdade química dos dois materiais.

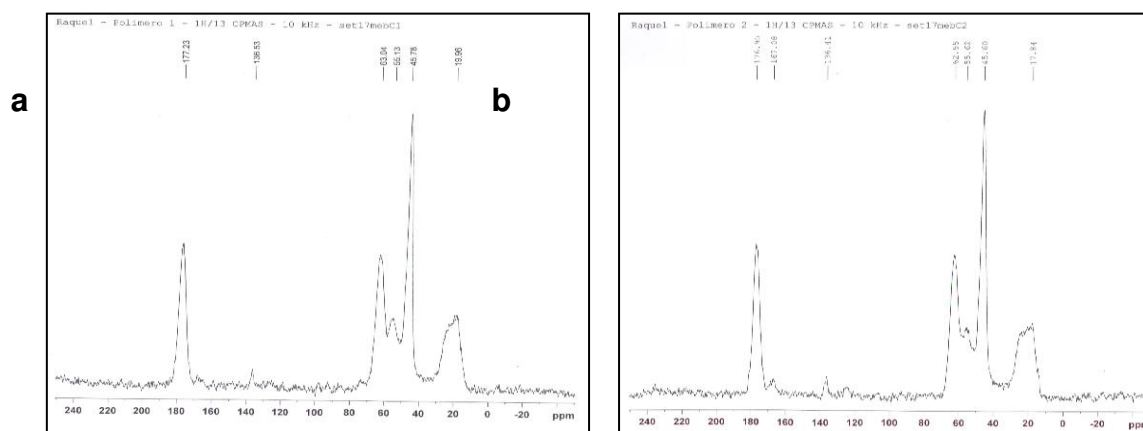


Figura III.4 – ^{13}C CP-MAS NMR do MIP (a) e NIP (b).

III.5.3 Microscopia de Varredura Eletrônica

As micrografias mostram nitidamente que os dois materiais apresentaram morfologias diferentes, uma vez que o polímero MIP apresentou-se mais granulado e poroso do que o polímero de controle (**Figura III.5**).

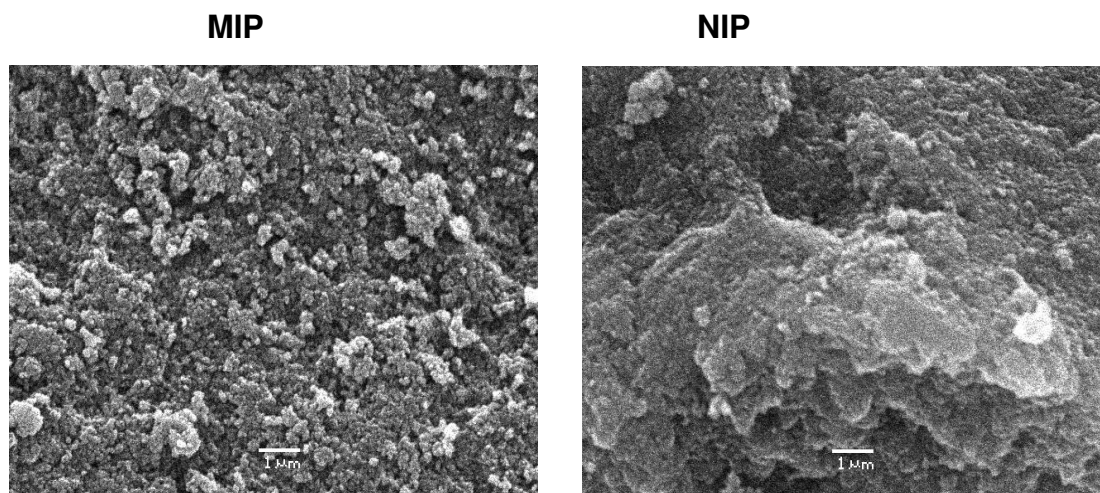


Figura III.5 – Imagem de microscopia de varredura eletrônica dos polímeros MIP e NIP. Aumento de 40000 x.

III.5.4 Porosimetria de Sorção de Nitrogênio

A diferença na porosidade dos materiais foi confirmada através dos ensaios de porosimetria de sorção de nitrogênio, empregando o método de BET. Na **Tabela III.2**, pode ser observado que o polímero MIP apresentou uma maior área superficial se comparado ao NIP.

A alta porosidade exibida pelo polímero MIP pode ser atribuída à presença de mesoporos (SPIVAK, 2005), o que contribui não só para o reconhecimento molecular, mas também, para processos adsortivos.

Tabela III.2 – Porosimetria dos polímeros MIP e NIP.

Polímero	Área Superficial (m ² /g)	Volume do Poro (cm ³ /g)	Diâmetro médio do Poro (Å)
MIP	364,6	0,6	64,4
NIP	213,6	0,6	75,6

III.5.5 Determinação de cocaína por MS/MS

Inicialmente, com o objetivo de se confirmar a massa nominal do analito, foi realizada a injeção de uma solução de cocaína (50 ng mL⁻¹ em MeOH) através de uma bomba de seringa no espectrômetro de massas. Utilizando a função *Scan MS* e operando o equipamento em modo positivo, foi obtido o espectro de massas da solução de cocaína em questão. Após esta etapa, foi realizada a fragmentação da molécula, a fim de escolherem-se as transições que seriam utilizadas na identificação e quantificação da cocaína nas análises em urina humana, utilizando o modo MRM. A **Figura III.6** apresenta a rota de fragmentação proposta **Figura III.7** ilustra a fragmentação da cocaína.

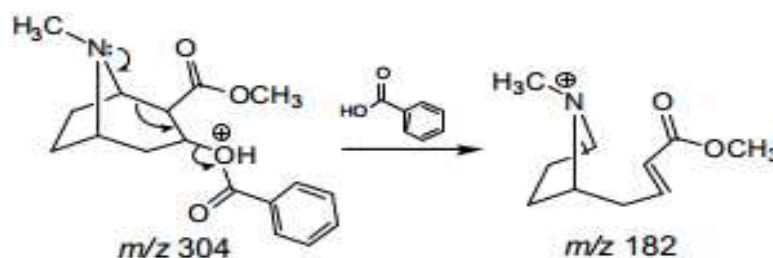


Figura III.6 - Proposta de rota de fragmentação da cocaína.

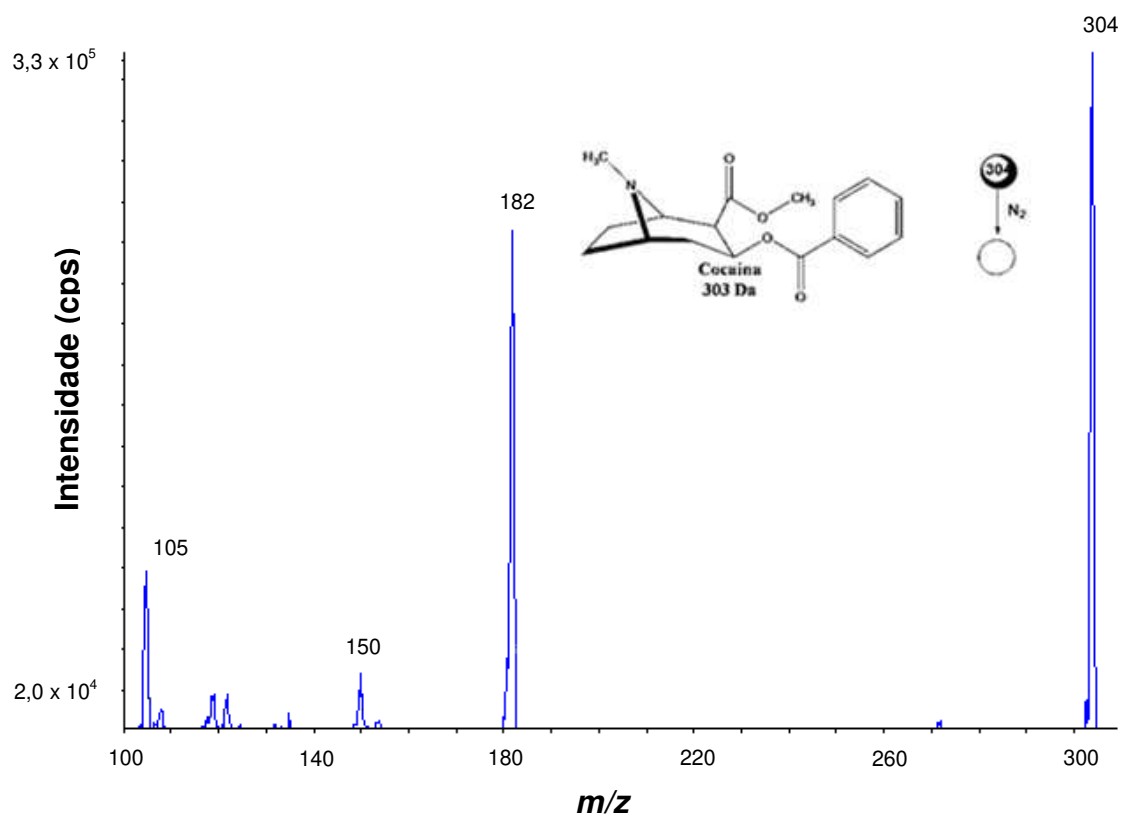


Figura III.7 – Espectro de fragmentação da cocaína.

A partir destes resultados, foram selecionadas as transições de identificação e confirmação da cocaína nas análises quantitativas utilizando o modo MRM. As transições selecionadas foram 304>182 e 304>105, respectivamente.

Utilizando-se os parâmetros citados no item **III.4.10**, foi possível realizar a quantificação da cocaína nas próximas etapas do estudo.

III.5.6 Aplicação do Método MISPEonline-MS/MS

Após a etapa de otimização dos parâmetros para a utilização do MISPEonline-MS/MS na determinação de cocaína, curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de amostras branco de urina no intervalo de concentração de 10,0 a 1000,0 ng mL⁻¹.

As curvas analíticas obtidas para a quantificação de cocaína em urina humana usando o método MISPEonline-MS/MS em três dias diferentes estão apresentadas na **Figura III.8**. Considerando a linearidade e a dispersão dos resultados, fica comprovada a adequação do método desenvolvido para a faixa linear de trabalho de concentrações de cocaína em urina humana de 10 a 1000 ng mL⁻¹.

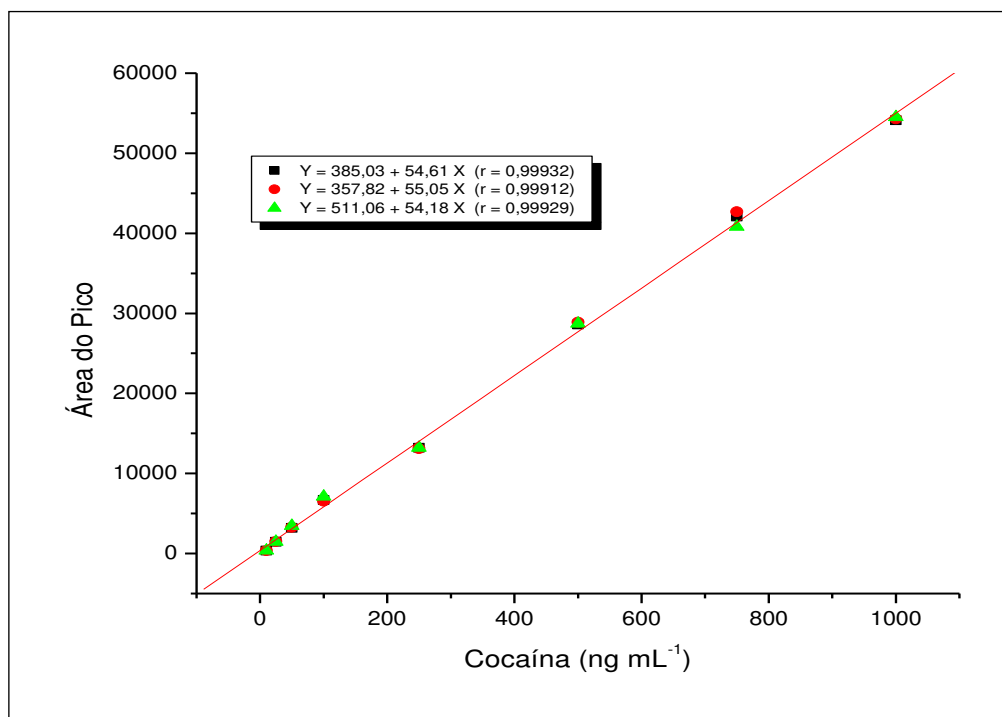


Figura III.8 – Curvas analíticas obtidas para a determinação de cocaína em urina humana utilizando o método MISPEonline-MS/MS em três dias diferentes.

Foram analisadas 10 amostras de urina de pacientes que apresentaram resultado positivo no teste de triagem. Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo departamento de toxicologia do Centro de Controle de Intoxicações da UNICAMP.

Utilizando a função *Scan MS* e operando o equipamento em modo positivo, foi obtido o espectro de massas de uma das amostras de urina de paciente, a qual foi diluída na proporção 1:100 em MeOH. Na **Figura III.9** podemos visualizar todos os principais metabólitos da cocaína, benzoilecgonina - BZE (m/z 290) e cocaetilenó – COE (m/z 318) presentes na amostra em questão, além da presença do interferente lidocaína (m/z 235) e da própria cocaína (m/z 304).

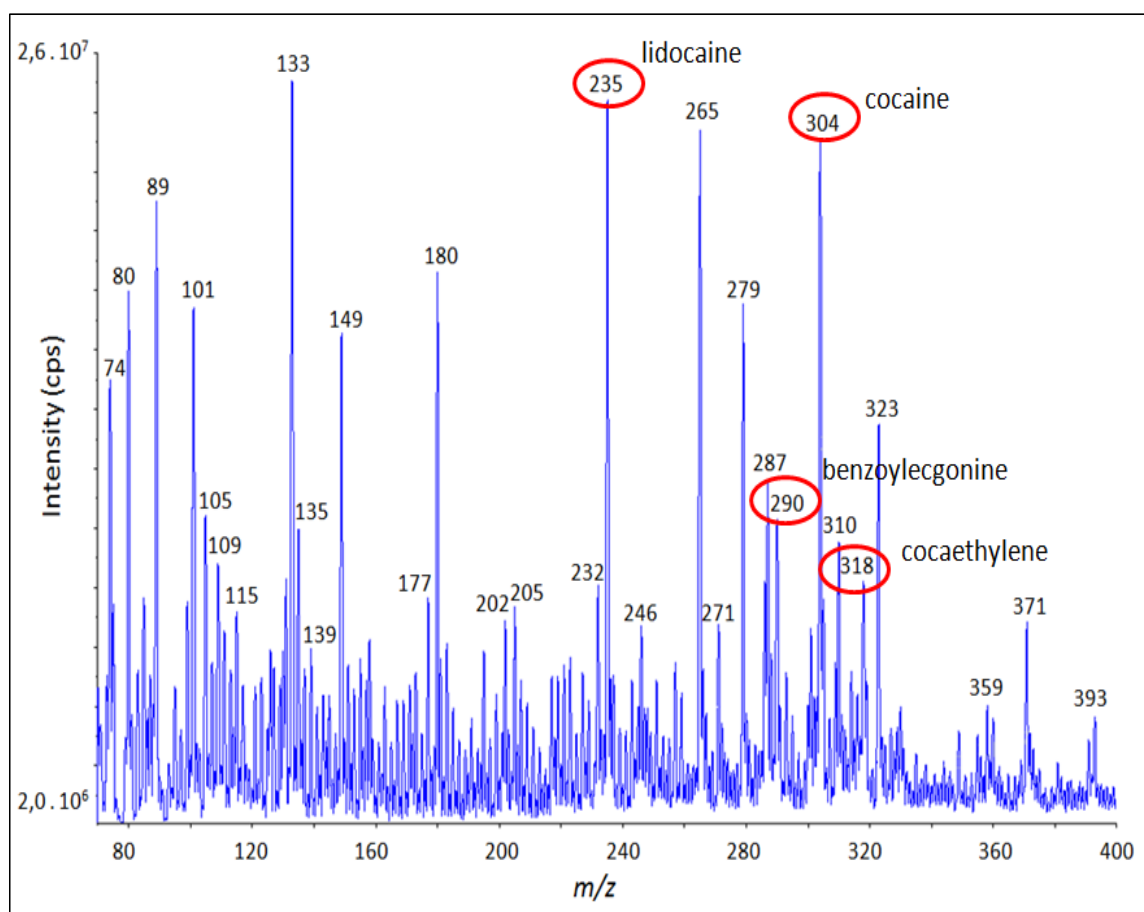


Figura III.9 – Espectro de amostra de urina analisada por *Scan MS*. Amostra diluída 1:100 (MeOH).

Esta mesma amostra foi analisada utilizando-se o método MISPE*online*-MS/MS. A **Figura III.10** apresenta o espectro obtido após a amostra de urina passar pelo MISPE*online*, onde pode-se visualizar a presença da cocaína juntamente com seus metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno. Porém, o interferente lidocaína não pode ser visualizado. Nota-se também que o espectro apresenta menos interferentes de matriz, fazendo com que a intensidade do sinal obtido seja maior.

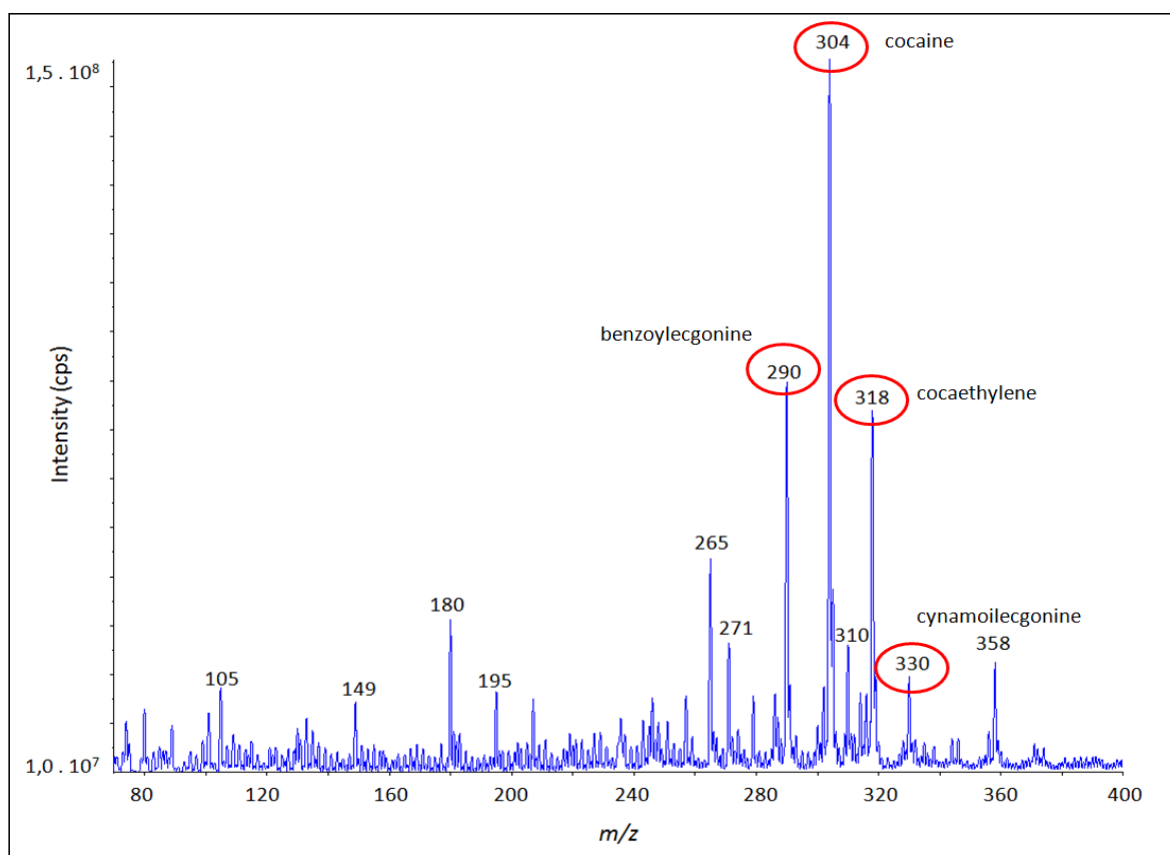


Figura III.10 – Espectro de amostra de urina analisada pelo método MISPE*online*-MS/MS.

Este resultado sugere que o polímero MIP sintetizado seja capaz de reconhecer molecularmente a molécula de cocaína e também seus metabólitos. Desta foram, testes de seletividades foram efetuados.

✓ Seletividade

A seletividade do MIP foi avaliada analisando-se amostras de urina humana fortificadas com cocaína, seus metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno, a partir de soluções em MeOH. A seletividade da lidocaína também foi analisada, pois apesar desta não ser um análogo estrutural, é uma das principais estruturas responsáveis pelo resultado “falso-positivo” dos testes colorimétricos para identificação de cocaína. Os testes de seletividade foram conduzidos para os polímeros MIP e NIP utilizando-se as condições citadas no item III.4.10. A **Figura III.11 e III.12** apresenta as fragmentações dos metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno, respectivamente e a **Figura III.13** apresenta a fragmentação do interferente lidocaína.

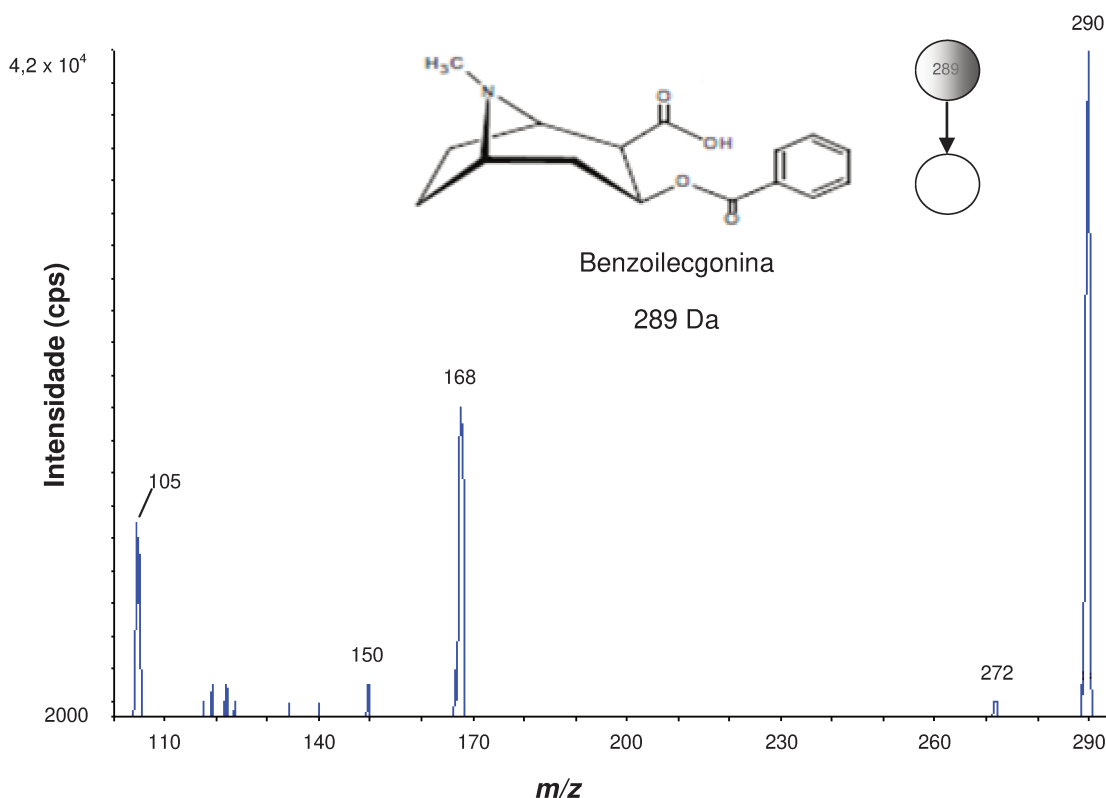


Figura III.11 – Espectro de fragmentação da benzoilecgonina.

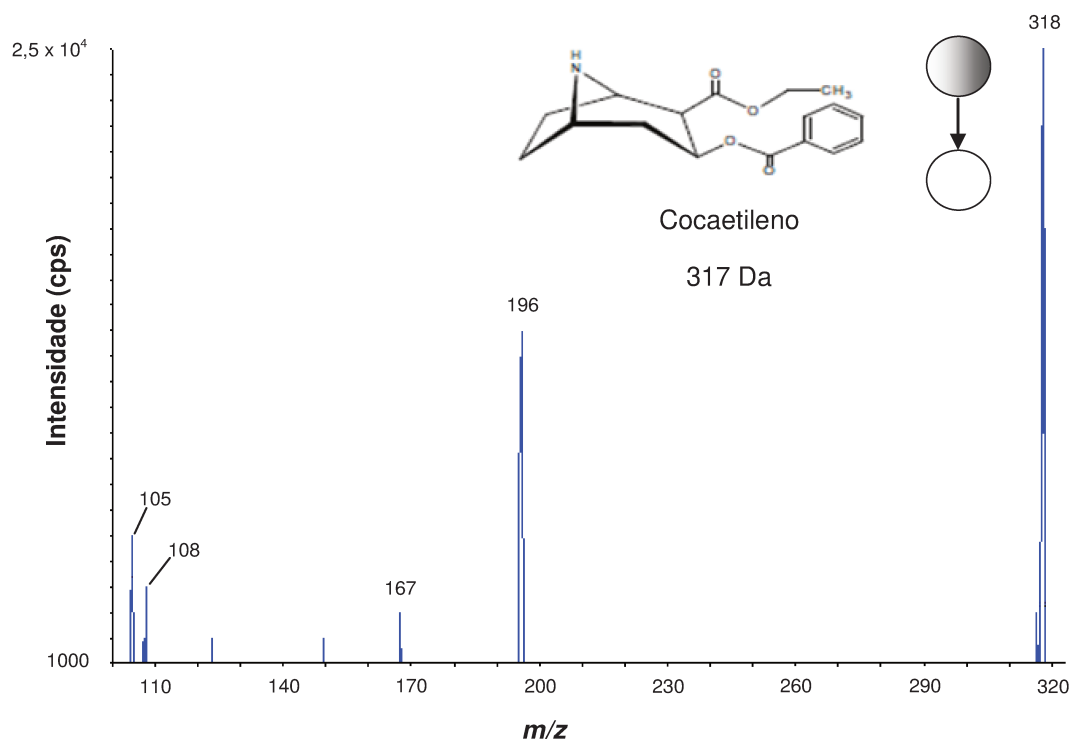


Figura III.12 – Espectro de fragmentação do cocaetileno.

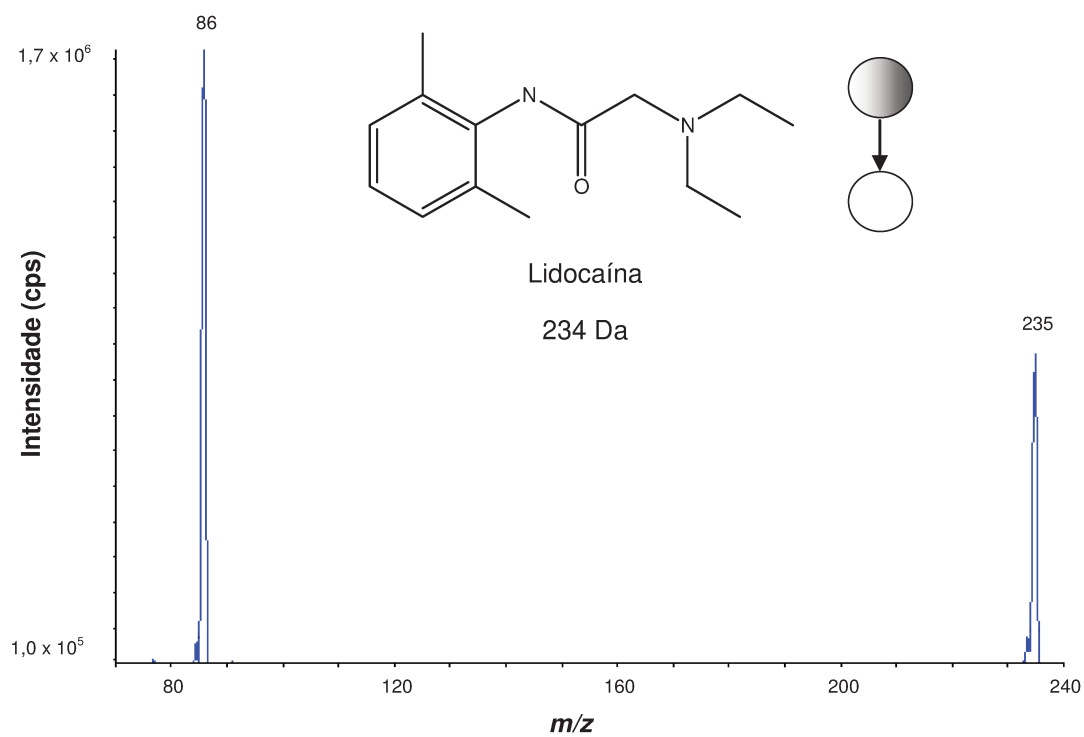


Figura III.13 – Espectro de fragmentação da lidocaína.

A partir destes resultados, foram selecionadas as transições de identificação destas moléculas utilizando o modo MRM. As transições selecionadas foram 290>168 para o metabólito benzoilecgonina, 318>196, para o metabólito cocaetileno e 235>86 para o interferente lidocaína. As análises foram efetuadas utilizando-se os parâmetros citados no item **III.4.10**.

A **Figura III.14** compara os resultados obtidos após a extração das amostras de urina contendo cocaína, os metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno, pelos polímeros MIP e NIP.

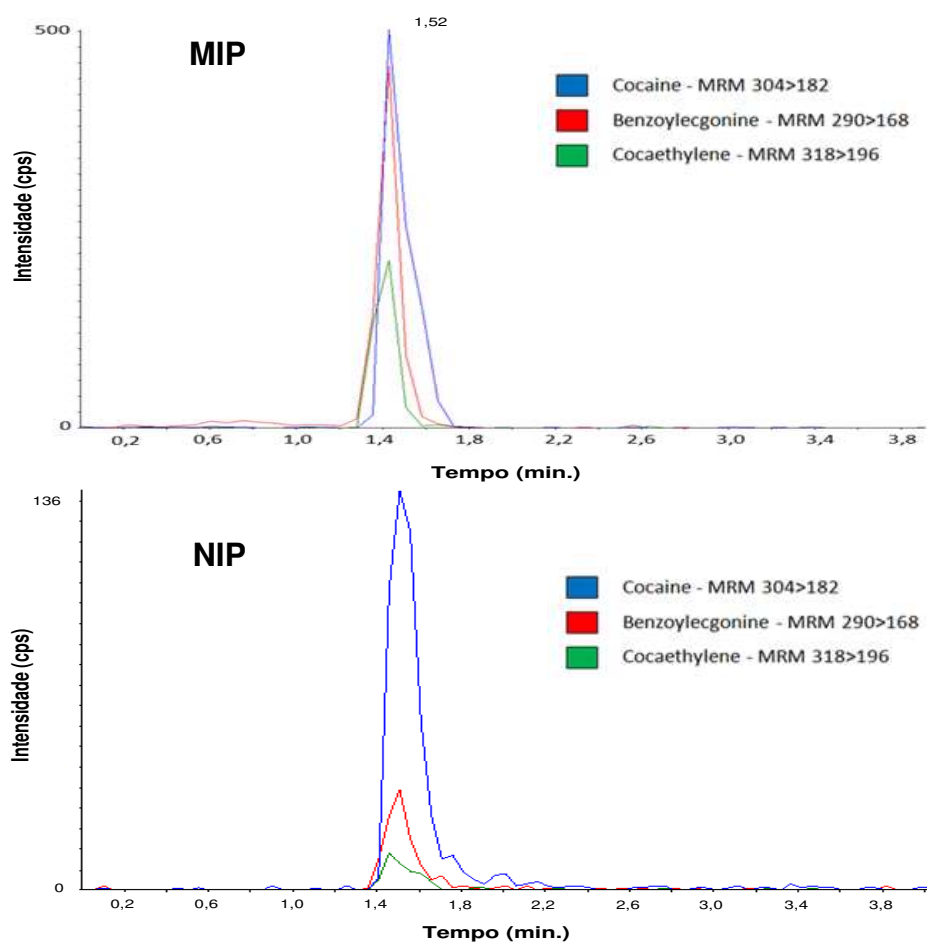


Figura III.14 – Espectro no modo MRM correspondente a extração de amostra de urina contendo cocaína, os metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno, utilizando os polímeros MIP e NIP.

A comparação entre os espectros mostra o sucesso da impressão molecular pelo polímero impresso sintetizado. O sinal obtido para a cocaína após a extração utilizando o polímero de controle é menos intenso, se comparado ao sinal obtido após extração com o MIP, confirmando assim que ocorreu a impressão molecular. Nota-se também que houve o reconhecimento molecular dos metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno pelo polímero MIP, enquanto o polímero de controle apresentou mínima retenção para os metabólitos, sugerindo assim que esta ocorreu por interações não-específicas. Desta forma, pode-se concluir que o polímero impresso sintetizado é seletivo para a molécula de cocaína e seus metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno.

A **Figura III.15** apresenta o comportamento das moléculas lidocaína e cocaína durante o método MISPE*online*-MS/MS.

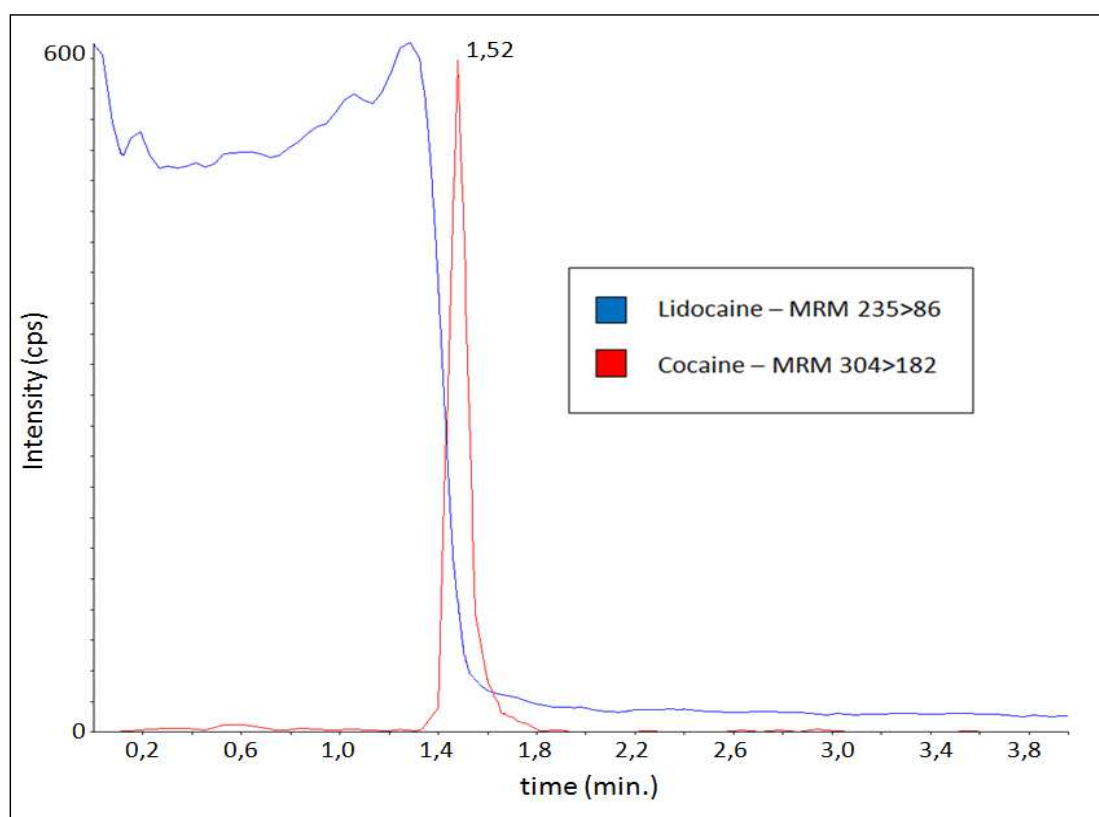


Figura III.15 – Monitoramento das moléculas cocaína e lidocaína durante o método MISPE*online*-MS/MS.

Observa-se que após a injeção da amostra o sinal da lidocaína é constante e logo após este sinal apresenta um decaimento, o que coincide com a etapa de lavagem do MISPE. Nota-se que enquanto o sinal da lidocaína vai decaindo, outro sinal vai surgindo. Este sinal nada mais é do que a cocaína que estava retida no polímero de impressão durante a etapa de lavagem sendo detectada na etapa de eluição. Desta forma, pode-se afirmar que o interferente lidocaína é eliminado da análise durante a etapa de lavagem do MISPE.

✓ ***Repetibilidade***

A fim de comprovar a capacidade do polímero MIP de fornecer um resultado confiável após várias etapas de utilização, foram efetuadas várias injeções do limite de quantificação (10 ng mL^{-1}) do método MISPE*online*-MS/MS para determinação de cocaína em urina humana (**Figura III.16**) utilizando-se os parâmetros citados no item **III.4.10**.

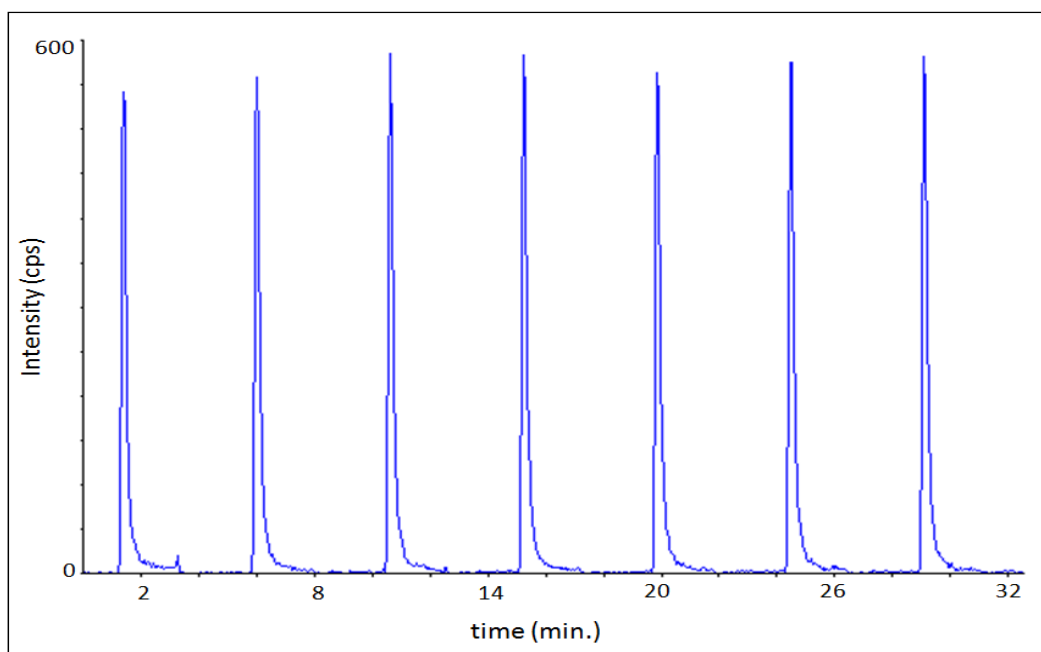


Figura III.16 – Sinais MRM de multi-injeções do limite de quantificação em matriz (10 ng mL^{-1}) pelo método MISPE*online*-MS/MS.

✓ *Análise de Amostras de Pacientes*

As amostras de urina de pacientes provenientes do Centro de Controle de Intoxicação da UNICAMP foram então avaliadas quanto a presença de cocaína e metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno; e quando da presença de cocaína, foi efetuada sua quantificação.

A **Tabela III.3** apresenta os resultados obtidos para a concentração de cocaína encontrada nas amostras de urina, bem como os metabólitos detectados.

Tabela III.3 – Resultados obtidos pelo método MISPE*online*-MS/MS para cocaína e metabólitos em urina de usuários.

Amostra	Cocaína (ng mL ⁻¹)	Metabólitos detectados
A1	17,0 ± 1,2	BZE
A2 ^{*a}	1555,2 ± 2,9	BZE
A3 ^{*b}	4895,0 ± 27,5	BZE
A4 ^{*a}	1217,7 ± 6,1	BZE, COE
A5	ND	BZE, COE
A6	15,9 ± 1,2	BZE, COE
A7	31,5 ± 1,9	BZE, COE
A8	ND	ND
A9	ND	ND
A10 ^{*c}	32312,7 ± 57,8	BZE, COE

BZE – benzoilecgonina, COE – cocaetileno, ^{*a} – diluição 1:5, ^{*b} – diluição 1:10, ^{*c} – diluição 1:100, ND – não detectado.

De acordo com dados apresentados na **Tabela III.3**, observa-se que em algumas amostras não foi possível quantificar a cocaína, pois a mesma encontrava-se numa concentração abaixo do limite de quantificação do método, porém seu metabólito majoritário, a benzoilecgonina, estava presente, confirmando assim o resultado positivo dos testes de triagem. Porém, duas amostras não apresentaram sinais de cocaína e seus metabólitos, sugerindo assim serem amostras “falso-positivo” devido à presença do interferente lidocaína nestas amostras. A **Figura III.17** apresenta o espectro da amostra A8 antes da análise pelo método MISPE*online*-MS/MS, confirmando a presença de lidocaína e assim justificando o resultado positivo no teste de triagem.

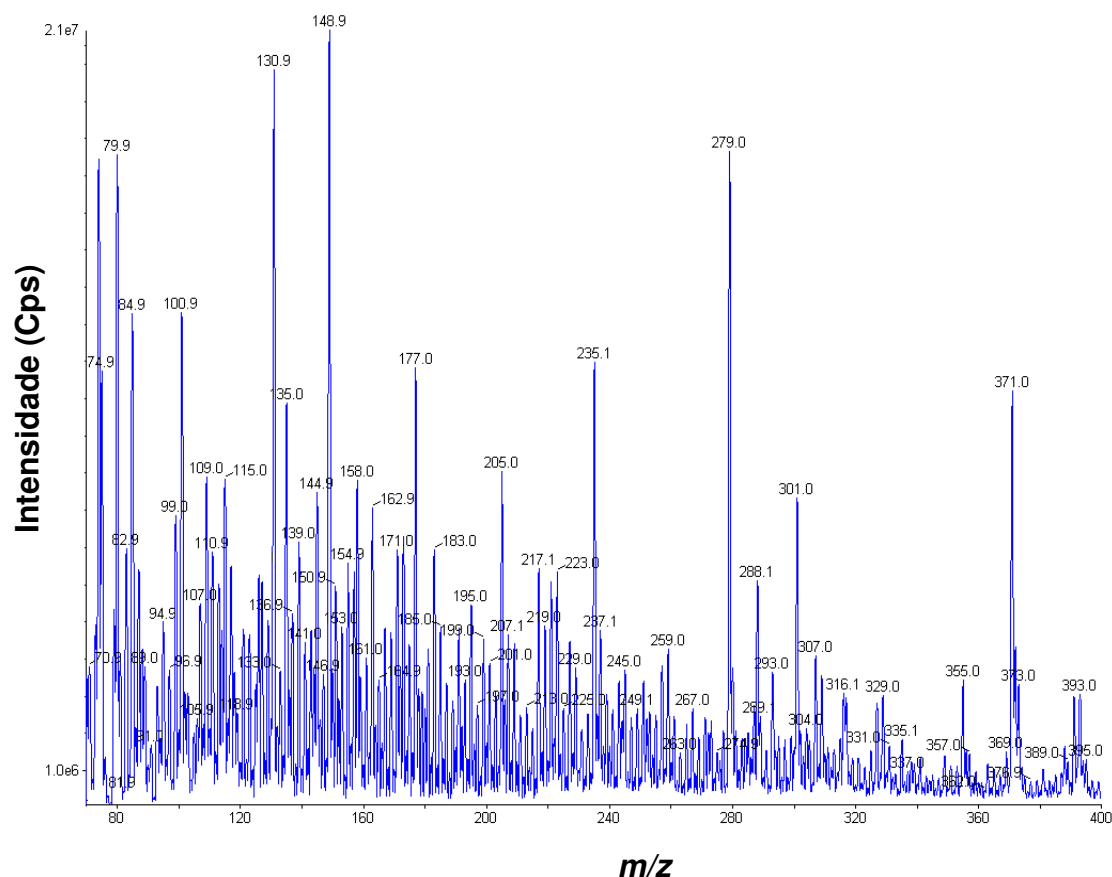


Figura III.17 - Espectro da amostra A8 antes da análise pelo método MISPE*online*-MS/MS

III.6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- O polímero de impressão molecular, sintetizado a partir do ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, 2'2'azo-bis-isobutironitrila, cocaína como molécula molde e como solvente porogênico ACN, foi capaz de reconhecer molecularmente a molécula de cocaína presente em amostras de urina.
- Os polímeros MIP e NIP apresentaram características químicas semelhantes (FT-IR e RMN) e características morfológicas distintas, onde o polímero impresso apresentou área superficial maior que o NIP. Em contrapartida, este apresentou diâmetro e volume de poro maior do que o MIP.
- A extração em fase sólida molecularmente impressa acoplada a espectrometria de massas (MISPE *online*-MS/MS) apresentou-se como uma técnica satisfatória para concentração e posterior quantificação de cocaína em urina humana.
- O MIP_{cocaína} apresentou seletividade para a molécula de cocaína e para seus metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno.
- A etapa de lavagem do método MISPE *online*-MS/MS foi suficiente para eliminar o interferente presente na amostra, a lidocaína, uma das principais estruturas responsáveis pelo resultado “falso-positivo” dos testes colorimétricos para identificação de cocaína.
- O método MISPE *online*-MS/MS desenvolvido foi adequado para a identificação e quantificação de cocaína e na identificação dos metabólitos benzoilecgonina e cocaetileno em urina humana.

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KINDY, S.; BADÍA, R.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, J.L.; DÍAZ-GARCÍA, M.E.; **Molecularly imprinted polymers and optical applications**, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2000**, 30, 291-309.

ANDERSSON, L.; SELLERGREN, B.; MOSBACH, K.; **Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers**, *Tetrahedron Letters*, **1984**, 25, 5211-5214.

ANDERSSON, T.; **Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors: focus on omeprazole, lansoprazole and pantoprazole**, *Clinical Pharmacokinetics*, **1996**, 31, 9-28.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, *RE n° 899*, **29/05/2003**.

ARSHADY, R.; MOSBACH, M.; **Synthesis of substrate selective polymers by host-guest polymerization**, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **1981**, 182, 687-692.

ASHCROFT, A.E.; **Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry**, *The Royal Society of Chemistry*, **1997**, Cambridge, United Kingdom.

Basic theory of mass spectrometry, *Clinica Chimica Acta*, **1995**, 241-242, 15-71.

BJØRK, M.K.; NIELSEN, M.K.K.; MARKUSSEN, L.Ø.; KLINKE, H.B.; LINNET, K.; **Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 396, 2393-2401.

CARO, E.; MARCÉ, R.M.; CORMACK, P.A.G.; SHERRINGTON, D.C.; BORRUL, F.; **Synthesis and application of an oxytetracycline imprinted polymer for the solid-phase extraction of tetracycline antibiotics**, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 552, 81-86.

- CARO, E.; MARCÉ, R.M.; BORRUL, F.; CORMACK, P.A.G.; SHERRINGTON, D.C.; **Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples**, *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, 25, 143-153.
- CHIUMINATTO, U.; GOSETTI, F.; DOSSETTO, P.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; ROBOTTI, E.; GENNARO, M.C.; MARENGO, E.; **Automated online solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs of abuse in human urine**, *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, 5636-5645.
- CHOI, B.K.; HERCULES, D.M.; ZHANG, T.L.; GUSEU, A.I.; **Comparison of quadrupole, time-of-flight and Fourier transform mass analyzers for LC-MS applications**, *Spectroscopy*, **2003**, 18, 524-531.
- CLISSOLD, S.P.; CAMPOLI-RICHARDS, D.M.; **Omeprazole: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peptic ulcer disease and Zollinger-Ellison syndrome**, *Drugs*, **1986**, 32, 15-47.
- COGNARD, E.; RUDAZ, S.; BOUCHONNET, S.; STAUB, C.; **Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS**, *Journal of Chromatography B*, **2005**, 826, 17-25.
- COOKS, R.G.; HOKE, S.H.; MORAND, K.L.; LAMMERT, S.A.; **Mass spectrometers: instrumentation**, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1992**, 118, 1-36.
- CORMACK, P.A.G.; ELORZA, A.Z.; **Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization**, *Journal of Chromatography B*, **2004**, 804, 173-182.
- COURTOIS, J.; FISHER, G.; SCHAUFF, S.; ALBERT, K.; IRGUM, K.; **Interactions of bupivacaine with a molecularly imprinted polymer in a monolithic format studied by NMR**, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, 580-584.

De SMET, J.; BOUSSERY, K.; De COCK, P.; De PAEPE, P.; REMON, J.P.; Van WINCKEL, M.; Van BOCKLAER, J.; **A bio-analytical hydrophilic interaction LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of omeprazole and lansoprazole in human plasma in support of a pharmacokinetic omeprazole study in children**, *Journal of Separation Science*, **2010**, 33, 939-947.

DICKEY, F.H.; **Specific adsorption**, *Journal of Physical Chemistry*, **1955**, 59, 673-800.

DJOZAN, D.; BAHERI, T.; **Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibers based on monolithic molecularly imprinted polymers for selective extraction of diacetylmorphine analogous compounds**, *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1166, 16-23.

DOLE, M.; MACK, L.L.; HINES, R.L.; MOBLEY, R.C.; FERGUSON, L.D.; ALICE, M.B.; **Molecular beams of macroions**, *Journal of Physical Chemistry*, **1968**, 49, 2240-2249.

DONG, W.; YAN, M.; LIU, Z.; WU, G.; LI, Y.; **Effects of solvents on the adsorption selectivity of molecularly imprinted polymers: Molecular simulation and experimental validation**, *Separation and Purification Technology*, **2007**, 53, 183-188.

FARRINGTON, K.; REGAN, F.; **Investigation of the nature of MIP recognition: The development and characterisation of a MIP for Ibuprofen**, *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, 22, 1138-1146.

FERRER, I.; LANZA, F.; TOLOKAN, A.; HORVATH, V.; SELLERGREN, B.; HORWAI, G.; BARCELÓ, D.; **Selective trace enrichment of chlorotriazine pesticides from natural waters and sediment sample using terbuthylazine molecularly imprinted polymers**, *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 3934-3941.

FIGUEIREDO, E.C.; SANVIDO, G.B.; ARRUDA, M.A.Z.; EBERLIN, M.N.; **Molecularly imprinted polymers as analyte sequesters and selective surfaces for easy ambient sonic-spray ionization**, *Analyst*, **2010**, 135, 726-730.

FIGUEIREDO, E.C.; SPARRAPAN, R.; SANVIDO, G.B.; SANTOS, M.G.; ARRUDA, M.A.Z.; EBERLIN, M.N.; **Quantitation of drugs via molecularly imprinted polymer solid phase extraction and electrospray ionization mass spectrometry: benzodiazepines in human plasma**; *Analyst*, **2011**, 136, 3753-3757.

GAO, N.; XU, Z.; WANG, F.; DONG, S.; **Sensitive biomimetic sensor based on molecular imprinting at functionalized indium tin oxide electrodes**, *Electroanalysis*, **2007**, 19, 1655-1660.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J.B.; RODRÍGUEZ, I.; RODIL, R.; GONZÁLEZ-PEÑAS, J.; CELA, R.; **Comparison of molecularly imprinted, mixed-mode and hydrophilic balance sorbents performance in the solid-phase extraction of amphetamine drugs from wastewater samples for liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination**, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 8435-8441.

GOWING, L.R.; HENRY-EDWARDS, S.M.; IRVINI, R.J.; ALI, R.L.; **The health effects of ecstasy: a literature review**, *Drug and Alcohol Review*, **2002**, 21, 53-63.

HAM, B.M.; **Even electron mass spectrometry with biomolecule applications**, *John Wiley & Sons*, Hoboken, **2008**.

HAUPT, K.; **Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry**, *Analyst*, **2001**, 126, 747-756.

HENNION, M.; **Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, **1999**, 856, 3-54.

HOFMANN, U.; SCHWAB, M.; TREIBER, G.; KLOTZ, U.; **Sensitive quantification of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry**, *Journal of Chromatography B*, **2006**, 831, 85-90.

HOSOYA, K.; YOSHIZAKO, K.; TANAKA, N.; KIMATA, K.; ARAKI, T.; HAGINAKA, J.; **Uniform-size macroporous polymer-based stationary phase for HPLC prepared through molecular imprinting technique**, *Chemistry Letters*, **1994**, 23, 1437-1438.

HU, X.; PAN, J.; HU, Y.; LI, G.; **Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of β -blockers in urine and plasma samples**, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 190-197.

HUCK, C.W.; BONN, G.K.; **Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction**, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 885, 51-72.

IRIBARNE, J.V.; THOMSON, B.A.; **On the evaporation of small ions from charged droplets**, *Journal of Chemical Physics*, **1976**, 64, 2287-2294.

ISHII, M.; SATO, M.; OGAWA, M.; TAKUBO, T.; HARA, K.; ISHII, Y.; **Simultaneous determination of omeprazole and its metabolites (5'-hydroxyomeprazole and omeprazole sulfone) in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2007**, 30, 1797-1810.

IUGA, C.; BOJITÁ, M.; **Stability study of omeprazole**, *Farmacia*, **2010**, 58, 203-210.

JAFARI, M.T.; REZAEI, B.; ZAKER, B.; **Ion mobility spectrometry as a detector for molecular imprinted polymer separation and metronidazole determination in pharmaceutical and human serum samples**, *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, 3585-3591.

JAGERDEO, E.; MONTGOMERY, M.A.; SIBUM, M.; SASAKI, T.A.; LeBEAU, M.A.; **Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using a completely automated solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method**, *Journal of Analytical Toxicology*, **2008**, 32, 570-574.

- JANICKA, M.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J.; **Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples**, *Trends in Analytical Chemistry*, **2010**, 29, 209-224.
- JAVANBAKHT, M.; NAMJUMANESH, M.H.; AKBARI-ADERGANI, B.; **Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of bromhexine in human serum and urine with high performance liquid chromatography**, *Talanta*, **2009**, 80, 133-138.
- KAMEL, A.H.; MOREIRA, F.T.C.; ALMEIDA, S.A.A.; SALES, M.G.F.; **Novel potentiometric sensors of molecular imprinted polymers for specific binding of chlormequat**, *Electroanalysis*, **2008**, 20, 194-202.
- KANAZAWA, H.; OKADA, A.; MATSUSHIMA, Y.; YOKOTA, H.; OKUBO, S.; MASHIGE, F.; NAKAHARA, K.; **Determination of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, **2002**, 949, 1-9.
- KATAOKA, H.; **New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis**, *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 232-244.
- KATZUNG, B.G.; SILVA, P.; **Farmacologia Básica e Clínica**, *Guanabara Koogan*, **2003**, 8 ed., p. 242 e 925.
- KWOK, W.H.; LEUNG, D.K.K.; LEUNG, G.N.W.; WAN, T.S.M.; **Screening of drugs in equine plasma using automated on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 3289-3296.
- LAI, J.; NIESSNER, R.; KNOPP, D.; **Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples**, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 522, 137-144.

- LEMIÉRE, F.; **Mass analysers for LC-MS, LC-GC, 2001, 22-28.**
- LIND, T.; CEDERBERG, C.; EKENVED, G.; HAGLUND, U.; OLBE, L.; **Effect of omeprazole: a gastric proton pump inhibitor on pentagastrin stimulated acid secretion in man, *Gut*, 1983, 24, 270-276.**
- LINDON, J.; HOLMES, J.; TRANTER, G.; **Encyclopedia of Spectroscopy and spectrometry, *Academic Press*, 2000, 1, 1241-1248.**
- LUO, W.; ZHU, L.; YU, C.; TANG, H.; YU, H.; LI, X.; ZHANG, X.; **Synthesis of surface molecularly imprinted silica micro-particles in aqueous solution and the usage for selective off-line solid-phase extraction of 2,4-dinitrophenol from water matrixes, *Analytica Chimica Acta*, 2008, 618, 147-156.**
- MAHONY, J.O.; NOLAN, K.; SMYTH, M.R.; MIZAIKOFF, B.; **Molecularly imprinted polymers- potential and challenges in analytical chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 534, 31-39.**
- MAJORS, R.E.; **The role of polymers in solid-phase extraction and sample preparation, *LC-GC*, 1996, 14, 754-766.**
- MAKAROV, A.; **Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis, *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 1156-1162.**
- MAQUILLE, A.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.; **High-throughput screening of drugs of abuse in urine by supported liquid-liquid extraction and UHPLC coupled to tandem MS, *Chromatographia*, 2009, 70, 1373-1380.**
- MASQUÉ, M.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; CORMACK, P.A.G.; SHERRINGTON, D.C.; **Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from Environmental Water, *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 4122-4126.**

- MASQUÉ, M.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; **Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction**, *Trends in Analytical Chemistry*, **2001**, 20, 477-486.
- MATON, P.N.; **Drug therapy: omeprazole**, *New England Journal of Medicine*, **1991**, 324, 965-975.
- MATHEW, M.; DASGUPTA, V.; BAILEY, R.E.; **Stability of omeprazole solutions at various pH values as determined by high-performance liquid-chromatography**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **1995**, 21, 965-971.
- MAYES, A.G.; MOSBACH, K.; **Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase**, *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 3769-3774.
- MEESTERS, R.J.W.; DUISKEN, M.; JÄHNIGEN, H.; HOLLENDER, J.; **Sensitive determination of monoterpene alcohols in urine by HPLC-FLD combined with ESI-MS detection after online-solid phase extraction of the monoterpene-coumarincarbamate derivatives**, *Journal of Chromatography B*, **2008**, 875, 444-450.
- MILLER, J.C.; MILLER, J.N.; **Statistics for Analytical Chemistry**, *Ellis Horwood*; New York, 1993.
- MILLER, P.E.; DENTON, M.B.; **The quadrupole mass filter: basic operating concepts**, *Journal of Chemical Education*, **1986**, 63, 617-623.
- MOODY, D.E.; SPANBAUER, A.C.; TACCOGNO, J.L.; SMITH, E.K.; **Comparative analysis of sweat patches for cocaine (and metabolites) by radioimmunoassay and gas chromatography-positive ion chemical ionization-mass spectrometry**, *Journal of Analytical Toxicology*, **2004**, 28, 86-93.
- MULLETT, W.M.; WALLIS, M.; LEVSEN, K.; BORLAK, J.; PAWLISZYN, J.; **Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by**

a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **2004**, 801, 297-306.

NASI, A.; MORAES-FILHO, J.P.P; CECCONELLO, I.; **Doença do refluxo gastroesofágico: revisão ampliada**, *Arquivos de Gastroenterologia*, **2006**, 43, 334-341.

OGISO, M.; MINOURA, N.; SHINBO, T.; SHIMIZU, T.; **DNA detection system using molecularly imprinted polymer as the gel matrix in electrophoresis**, *Biosensors and Bioelectronics*, **2006**, 22, 1974-1981.

ORLANDO, R.M.; BONATO, P.S.; **Simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma**, *Journal of Chromatography B*, **2003**, 795, 227-235.

PASSAGLI, M.; **Toxicologia Forense: teoria e prática**, **2009**, Brasil.

PAULING, L.J.; **A theory of the structure and process of formation of antibodies**, *Journal of the American Chemical Society*, **1940**, 62, 2643-2657.

PEREIRA, L.A.; RATH, S.; **Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, 393, 1063-1072.

PÉREZ-MORAL, N.; MAYES, A.G.; **Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods**, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 504, 15-21.

PÉREZ-RUIZ, T.; MARTINEZ-LOZANO, C.; SANZ, A.; BRAVO, E.; GALERA, R.; **Determination of omeprazole, hydroxyomeprazole and omeprazole sulfone using automated solid phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 42, 100-106.

- PRADA, A.G.V.; MARTINEZ-RUIZ, P.; REVIEJO, A.J.; PINGARRÓN, J.M.; **Solid-phase molecularly imprinted on-line preconcentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk**, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 539, 125-132.
- PUOCI, F.; CURCIO, M.; CIRILLO, G.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G.; PICCI, N.; **Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products**, *Food Chemistry*, **2008**, 106, 836-842.
- QIAO, F.; SUN, H.; YAN, H.; ROW, K.H.; **Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction**, *Chromatographia*, **2006**, 64, 625-634.
- QIUJIN, Z.; LIPING, W.; SHENGFANG, W.; WASSWA, J.; XIAOLONG, G.; JIAN, T.; **Selective of molecularly imprinted solid phase extraction for sterol compounds**, *Food Chemistry*, **2009**, 113, 608-615.
- REGARDH, C.G.; GABRIELSSON, M.; HOFFMAN, K.J.; LOFBERG, I.; SKANBERG, I.; **Pharmacokinetics and metabolism of omeprazole in animals and man – an overview**, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **1985**, 20, 79-94.
- REZAEI, B.; JAFARI, M.T.; KHADEMI, R.; **Selective separation and determination of primidone in pharmaceutical and human serum samples using molecular imprinted polymer-electrospray ionization ion mobility spectrometry (MIP-ESI-IMS)**, *Talanta*, **2009**, 79, 669-675.
- ROBANDT, P.P.; REDA, L.J.; KLETTE, K.L.; **Complete automation of solid-phase extraction with subsequent liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of benzoylecgonine, *m*-hydroxybenzoylecgonine, *p*-hydroxybenzoylecgonine, and norbenzoylecgonine in urine-application to a high-throughput urine analysis laboratory**, *Journal of Analytical Toxicology*, **2008**, 32, 577-585.
- SAITO, Y.; VETA, I.; KOTERA, K.; OGAWA, M.; WADA, H.; JINNO, K.; **In-needle extraction device designed for gas chromatographic analysis of volatile organic compounds**, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1106, 190-195.

SCHMID, M.G.; KOIDL, J.; WANK, P.; KARGL, G.; ZÖHRER, H.; GÜBITZ, G.; **Enantioseparation by ligand-exchange using particle-loaded monoliths: capillary LC versus capillary electrochromatography**, *Journal of Biochemical and Biophysical*, **2007**, 70, 77-85.

SELLERGREN, B.; **Molecularly Imprinted Polymers: Man-made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry**, **2001**.

SERGI, M.; BAFILE, E.; COMPAGNONE, D.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; ROMOLO, F.S.; **Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, 393, 709-718.

SHAKLEYA, D.M.; DAMS, R.; CHOO, R.E.; JONES, H.; HUESTIS, M.A.; **Simultaneous liquid chromatography-mass spectrometry quantification of urinary opiates, cocaine, and metabolites in opiate-dependent pregnant women in methadone-maintenance treatment**, *Journal of Analytical Toxicology*, **2010**, 34, 17-25.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.; **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, *John Wiley & Sons*, Danvers, **2005**.

SONG, S.; WU, A.; SHI, X.; LI, R.; LIN, Z.; ZHANG, D.; **Development and application of molecularly imprinted polymers as solid-phase sorbents for erythromycin extraction**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 390, 2141-2150.

SPIVAK, D.A.; **Optimization, evaluation, characterization of molecularly imprinted polymers**, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1779-1794.

TAMAYO, F.G.; CASILLAS, J.L.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; **Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecularly imprinted polymers**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2005**, 391, 1234-1240.

TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.P.T.; KUBOTA, L.T.; **Polímeros biominéticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("molecularly imprinted**

polymers”) em técnicas de extração e separação, *Química Nova*, **2005**, 28, 1076-1086.

THEODORIDIS, G.; ZACHARIS, C.K.; TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D.G.; ECONOMOU, A.; **Automated sample preparation based on the sequential injection principle solid-phase extraction on a molecularly imprinted polymer coupled on-line to high-performance liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1030, 69-76.

THOMPSON, M.; STEPHEN, L.R.; WOOD, R.; **Laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)**, *Pure and Applied Chemistry*, **2002**, 74, 835-855.

TÓTH, B.; PAP, T.; HORVATH, V.; HORVAI, G.; **Which molecular imprinted polymer is better?**, *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 591, 17-21.

TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; **Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**, 378, 1876-1886.

VARONA, L.; RUIZ, J.; ZARRANZ, J.J.; **GaitAtaxia during omeprazole therapy**, *Annals of Pharmacotherapy*, **1996**, 30, 192-192.

VEKEY, K.; **Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography**, *Journal of Chromatography A*, **2001**, 921, 227-236.

VITTAL, S.; GANNEBOINA, R.; LAYEK, B.; TRIVEDI, R.K.; HOTH, K.K.; BHARATHI, D.V.; MULLANGI, R.; **Highly sensitive method for the determination of omeprazole in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study**, *Biomedical Chromatography*, **2009**, 23, 390-396.

- WALLMARK, B.; CARLSSON, E.; LARSSON, H.; BRÄNDSTRÖM, A.; LINDBERG, P.; **New Inhibitors of gastric acid secretion: properties and design of H⁺K⁺ATPase blockers**, *SCI-RSC Medical Chemistry Symposium*, **1986**, 293-311.
- WALLMARK, B.; **Omeprazol: mode of action and effects on acid secretion in animals**, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **1989**, 24, 12-18.
- WANG, J.; WANG, Y.; FAWCETT, J.P.; WANG, Y.; GU, J.; **Determination of omeprazole in human plasma by liquid chromatography-electrospray quadrupole linear ion trap mass spectrometry**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, 39, 631-635.
- WANG, S.M.; WANG, T.C.; GIANG, Y.S.; **Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers in urine by simultaneous liquid-liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry**, *Journal of Chromatography B*, **2005**, 816, 131-143.
- WHITCOMBE, M.J.; RODRIGUEZ, M.E.; VILLAR, P.; VULFSON, E.N.; **A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting-syntheses and characterization of polymeric receptors for cholesterol**, *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 7105-7111.
- WONG, S.F.; MENG, C.K.; FENN, J.B.; **Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethyleneglycols)**, *Journal of Physical Chemistry*, **1988**, 92, 546-550.
- WULF, G.; SARHAN, A.; **Use of polymers with enzyme analogous structures for the resolution of racemates**, *Angewandte Chemie*, **1972**, 11, 341-344.
- XU, X.; ZHU, L.; CHEN, L.; **Separation and screening of compounds of biological origin using molecularly imprinted polymers**, *Journal of Chromatography B*, **2004**, 804, 61-64.

YAMASHITA, M.; FENN, J.B.; **Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme**, *Journal of Physical Chemistry*, **1984**, 88, 4451-4459.

YAN, H.; ROW, K.H.; **Novel molecularly imprinted monolithic column for selective on-line extraction of ciprofloxacin from human urine**, *Biomedical Chromatography*, **2008**, 22, 487-493.

YAN, M.; RAMSTRÖM, O.; **Molecularly Imprinted Materials-Science and Technology**, **Marcel Dekker**, New York, **2005**, EUA.

YANG, J.; HU, Y.; CAI, J. B.; ZHU, X.L.; SU, Q.D.; **A new molecularly imprinted polymer for selective extraction of cotinine from urine by solid-phase extraction**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 384, 761-768.

YE, L.; CORMACK, A.G.; MOSBACH, K.; **Molecularly imprinted monodisperse microsphere for competitive radioassay**, *Analytical Communications*, **1999**, 36, 35-38.

YILMAZ, E.; HAUPT, K.; MOSBACH, K.; **The use of immobilized templates – a new approach in molecular imprinting**, *Angewandte Chemie*, **2000**, 39, 2115-2118.

YILMAZ, E.; RAMSTRÖM, O.; MÖLLER, P.; SANCHEZ, D.; MOSBACH, K.; **A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates**, *Journal of Materials Chemistry*, **2002**, 12, 1577-1581.

YOSHIMATSU, K.; REIMHULT, K.; KROZER, A.; MOSBACH, K.; SODE, K.; YE, L.; **Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: The control of particle size suitable for different analytical applications**, *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 584, 112-121.

ZAMORA, O.; PANIAGUA, E.E.; CACHO, C.; VERA-AVILA, L.E.; PEREZ-CONDE, C.; **Determination of benzimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE-HPLC**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, 393, 1745-1753.

ZHANG, W.; HAN, F.; GUO, P.; ZHAO, H.; LIN, Z.; HUANG, M.Q.; BERTELSEN, K.; WENG, N.; **Simultaneous determination of tolbutamide, omeprazole, midazolam and dextromethorphan in human plasma by LC-MS/MS – a high throughput approach to evaluate drug-drug interactions**, *Journal of Chromatography B*, 2010, 878, 1169-1177.

ZHU, X.; YANG, J.; SU, Q.; CAI, J.; GAO, Y.; **Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples**, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092, 161-169.