



**UNICAMP**

Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Química - Departamento de Química Analítica

**TESE DE DOUTORADO**

**EMPREGO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO  
MOLECULAR (MIP) NA EXTRAÇÃO E PRÉ-  
CONCENTRAÇÃO DE ANALITOS  
ORGÂNICOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS  
SEGUIDO DE DETERMINAÇÃO  
ESPECTROFOTOMÉTRICA**

**Eduardo Costa de Figueiredo**  
Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Campinas - 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

F469e Figueiredo, Eduardo Costa de.  
Emprego de polímeros de impressão molecular (MIP) na extração e pré-concentração de analitos orgânicos em amostras biológicas seguido de determinação espectrofotométrica / Eduardo Costa de Figueiredo. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Polímeros de impressão molecular. 2. Catecol.  
3. Nicotina. 4. Fenotiazinas. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Use of molecularly imprinted polymers (MIP) for extraction and pre-concentration of organic analytes in biological samples and spectrophotometric determination

**Palavras-chaves em inglês:** Molecularly imprinted polymers, Catechol, Nicotine, Phenothiazines

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Marco Aurelio Zezzi Arruda (orientador), Anne Hélène Fostier (IQ-UNICAMP), Dosil Pereira de Jesus (IQ-UNICAMP), Pedro Orival Luccas (CIÊNCIAS EXATAS-UNIFAL), Ricardo Erthal Santelli (GEOQUÍMICA-UFF)

**Data de defesa:** 30/01/2009

*A vontade incessante de vencer torna pequenas as limitações do homem.*

*Sete anos de pastor Jacob servia  
Labão, pai de Raquel, serrana bela;  
Mas não servia ao pai, servia a ela,  
E a ela só por prémio pretendia.*

*Os dias, na esperança de um só dia,  
Passava, contentando-se com vê-la;  
Porém o pai, usando de cautela,  
Em lugar de Raquel lhe dava Lia.*

*Vendo o triste pastor que com enganos  
Lhe fora assi negada a sua pastora,  
Como se a não tivera merecida;*

*Começa de servir outros sete anos,  
Dizendo: – Mais servira, se não fora  
Para tão longo amor tão curta a vida!*

Luís de Camões (1524-1580)

A Deus criador de tudo e de todos,  
À minha noiva Daniela por sempre  
partilhar comigo as tristezas, alegrias,  
dificuldades e vitórias dessa vida.  
A meus queridos pais, José Carlos e  
Maria Helena, pelo amor incessante, luta  
diária e confiança no meu sucesso.  
A meu irmão Edson pela grande amizade  
e cumplicidade.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela grande amizade, orientação segura e irrefutável participação em minha formação científica;
- ◆ Ao Prof. Dr. Pedro Orival Luccas, pelo incentivo e grande amizade;
- ◆ À Professora Dra. Anne Hélienè Fostier pela convivência e amizade;
- ◆ Os meus queridos avós Pedro e Maria Aparecida pelo apoio e confiança no meu sucesso;
- ◆ À Silvia, Rafaela, Eliane e José Benedito pelo acolhimento e amizade;
- ◆ Aos todos os amigos do grupo GEPAM: Adilson, Geraldo, Aline Klassen, Aline Lopes, Alessandra Lustosa, Alessandra Sussulini, Ana Cristi, Cristiana, Elidiane, Eraldo, Gustavo, Herbert, Hugo, Jerusa, Kely, Lidiane, Marcel, Marcelo e Márcia, Renata pela amizade e convivência;
- ◆ Aos Profs. Drs. César Ricardo Teixeira Tarley, Lauro Tatsuo Kubota, Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira e Susanne Rath pela participação em alguns trabalhos,
- ◆ Ao Mário do setor de mecânica fina do IQ-Unicamp pela construção de peças fundamentais à realização deste trabalho;
- ◆ Aos professores e funcionários do IQ-Unicamp;
- ◆ À Unicamp;
- ◆ À FAPESP, pelo auxílio financeiro;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,

**Muito Obrigado.**

# SÚMULA CURRICULAR

## FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2005 – 2009 Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, Brasil.

2004 - 2005 Mestrado em Química na área de Química Analítica.

Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, Brasil.

2000 - 2003 Graduação em Farmácia.

Universidade Federal de Alfenas, Unifal/MG, Alfenas, Brasil

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Artigos completos em periódicos

1. A. Sussulini, A. G. Lima, E. C. Figueiredo, H. L. Fernandes, S. C. L. Pinheiro, M. I. M. S. Bueno, F. M. V. Pereira, X-ray scattering information for powdered fruit juice mixes. *X-Ray Spectrometry*, doi 10.1002/xrs.1158
2. M. A. Z. Arruda, E. C. Figueiredo, Atomic spectrometry based on metallic tube atomizers heated by flame: innovative strategies from fundamentals to analysis, *Spectrochim. Acta*, doi:10.1016/j.sab.2009.01.007
3. E. C. Figueiredo, D. M. de Oliveira, M. E. P. B. de Siqueira, M. A. Z. Arruda, On-line molecularly imprinted solid phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in smokers' urine, *Anal. Chim. Acta*, 635 (2009) 102.
4. A. C. B. Dias, E. C. Figueiredo, M. A. Z. Arruda, V. Grassi, E. A. G. Zagatto, Molecularly imprinted polymer as a new solid phase extractor in flow analysis, *Talanta*, 76 (2008) 988.
5. E. C. Figueiredo, A. C. B. Dias, M. A. Z. Arruda, Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Rev. Bras. Cien. Farm.* 44 (2008) 361.
6. E. C. Figueiredo, C. R. T. Tarley, L. T. Kubota, S. Rath, M. A. Z. Arruda, On-line molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) for the selective spectrophotometric determination of catechol, *Microchem. J.* 85 (2007) 290.
7. E. C. Figueiredo, J. Dědina, M. A. Z. Arruda, Metal furnace heated by flame as a hydride atomizer for atomic absorption spectrometry: Sb determination in environmental and pharmaceutical samples. *Talanta*, 73 (2007) 621.

8. C. R. T. Tarley, A. F. Barbosa, M. G. Sagatelli, E. C. Figueiredo, P. O. Lucas, Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd (II) determination at ng l-1 levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (2006) 1305.
9. E. C. Figueiredo, L. R. Souza, C. S. Magalhães, C. Wisniewski, P. O. Lucas, A home-made auto-sampler/injector commutator for flow analysis. *Journal of automated methods & management in chemistry (Print)*, 2006 (2006) 1.
10. E. C. Figueiredo, P. O. Lucas, M. A. Z. Arruda, Determination of Sb(III) and total Sb in antileishmanial drugs by spectrophotometric flow-injection hydride generation. *Analytical Letters*, 39 (2006) 543.
11. E. C. Figueiredo, P. O. Lucas, M. A. Z. Arruda, Off-line speciation Sb(III) and total Sb in pharmaceuticals by spectrophotometric flow-injection hydride generation using the potassium dichromate reaction. *Journal of Flow Injection Analysis*, 22 (2005) 134.
12. C. R. T. Tarley, E. C. Figueiredo, G. D. Matos, Thermospray flame furnace-AAS determination of copper after on-line sorbent preconcentration system optimized by experimental designs. *Analytical Sciences*, 21 (2005) 1337.

### **Capítulos de livros publicados**

1. C. S. Magalhães, J. S. Garcia, A. S. Lopes, E. C. Figueiredo, M. A. Z. Arruda, Strategies for sample preparation focusing biomolecules determination/characterization In: M. A. Z. Arruda, (Ed), *Trends in sample Preparation*: Nova Science Publishers, 2007, p.245-288.

### **Trabalho premiado em Congressos**

1. E. C. Figueiredo, M. A. Z. Arruda, On-line molecularly imprinted solid phase extraction for selective spectrophotometric determination of nicotine in urine of smokers. In: *Congresso Internacional de Ciências Farmacêutica*, 2007, Ribeirão Preto, 2007. (melhor pôster).

### **Patente**

1. M. A. Z. Arruda, E. C. Figueiredo, A. Klassen, Tubo para atomização, dispositivo compreendendo tubo para atomização e método para determinação de átomos (protocolo 018080048294). 2008.

## RESUMO

### EMPREGO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP) NA EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ANALITOS ORGÂNICOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS SEGUIDO DE DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

**Autor:** Eduardo Costa de Figueiredo

**Orientador:** Marco Aurélio Zezzi Arruda

Essa Tese de Doutorado teve como objetivo promover a associação entre polímeros de impressão molecular (MIP) e espectrofotometria, sendo a seletividade conseguida pela ligação específica dos analitos com os sítios de reconhecimento molecular impresso no MIP. No capítulo 1 foi sintetizado e caracterizado um MIP seletivo a catecol, sendo o mesmo empregado na extração de catecol em amostras de guaraná (*Paullinia cupana*) e mate (*Ilex paraguariensis*), seguido de determinação espectrofotométrica (reação não específica de redução de Mn(VII) para Mn(II) pelo catecol). Obteve-se um limite de quantificação, um desvio padrão relativo (20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , n=10) e uma frequência analítica de 2,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , <5% e 15h<sup>-1</sup>, respectivamente. A exatidão foi comprovada por comparação dos resultados obtidos pelo método proposto e por HPLC. No Capítulo 2 um MIP foi empregado na extração de nicotina em amostras de urina de fumantes, seguido da quantificação por espectrofotometria (reação de redução do Mn(VII) a Mn(VI)). O limite de quantificação e a frequência analítica foram de 1,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 11 h<sup>-1</sup>, respectivamente. As precisões intra-ensaio (10, 13 e 4%) e inter-ensaio (12, 10 e 5%) foram obtidas empregando-se padrões de

3, 10 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente e a exatidão foi comprovada por meio da técnica de HPLC. No capítulo 3 foi reportado o emprego do MIP na extração de fármacos fenotiazínicos (clorpromazina e perfenazina) em amostras de urina de pacientes. Após a extração, os fármacos foram eluidos e separados, à baixa pressão e alta velocidade, em uma coluna de C18 com tamanho de partícula entre 35 e 50  $\mu\text{m}$ . Os limites de quantificação foram de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para ambos os fármacos, e a exatidão foi comprovada por adição de analitos e pela técnica de HPLC.

# ABSTRACT

## USE OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS (MIP) FOR EXTRACTION AND PRE-CONCENTRATION OF ORGANIC ANALYTES IN BIOLOGICAL SAMPLES AND SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION

**Author:** Eduardo Costa de Figueiredo

**Adviser:** Marco Aurélio Zezzi Arruda

The objective of this Thesis was the association between molecularly imprinted polymers and spectrophotometry, with the selectivity obtained through specific binding between analytes and imprinted binding sites of the polymer. In the Chapter 1, a selective MIP for catechol was synthesized, characterized, and employed for the extraction of catechol from guarana (*Paullinia cupana*) and mate (*Ilex paraguariensis*) samples, followed by indirect spectrophotometric determination of catechol by reduction of Mn(VII) for Mn(II). A limit of quantification, a relative standard deviation ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $n = 10$ ) and an analytical frequency of  $2.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $<5\%$  and  $15\text{h}^{-1}$ , were obtained, respectively. Accuracy was validated using HPLC. In the Chapter 2, a MIP for nicotine was used for its extraction in urine samples of smokers, followed by its indirect quantification by spectrophotometry (reduction of Mn(VII) to Mn(VI) by nicotine). The limit of quantification and analytic frequency were of  $1.1 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $11 \text{ h}^{-1}$ , respectively. Intra (10, 13 and 4%) and inter-day (12, 10 and 5%) precisions were obtained using 3, 10 and 30  $\text{mmol L}^{-1}$  nicotine standard solutions, respectively, and accuracy was validated

through HPLC. Finally, in the Chapter 3, a MIP was employed for phenothiazinics (chlorpromazine and perphenazine) extraction in urine samples. Soon after, the drugs were eluted and separated using a low pressure and high-speed system, comprising a C18 column with particle size between 35 and 50  $\mu\text{m}$ . The quantification limits were 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for chlorpromazine and perphenazine, and the accuracy was validated using HPLC.

# SUMÁRIO

<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>xxv</b>
<b>Lista de abreviatura acrônimos .....</b>	<b>xxvii</b>
<b>Introdução Geral.....</b>	<b>1</b>
Referências Bibliográficas.....	4
<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>7</b>
1. Polímeros de Impressão Molecular (MIP).....	9
2. Aplicações de MIP em Química Analítica.....	19
2.1. Sensores.....	19
2.2. Separações.....	21
2.2.1. Cromatografia.....	21
2.2.2. Eletrocromatografia capilar (CEC).....	24
2.2.3. Extração em fase sólida.....	25
Referências Bibliográficas.....	28
<b>Capítulo 1: Extração e determinação de catecol em amostras vegetais empregando polímeros de impressão molecular (MIP) e espectrofotometria.....</b>	<b>35</b>
1. Introdução.....	37
2. Experimental.....	38
2.1. Instrumentação.....	38
2.2. Reagentes e soluções.....	39
2.3. Síntese do MIP.....	40
2.4. Amostras.....	41
2.5. Sistema de extração e determinação espectrofotométrica usando MIP.....	42
2.6. Sistema cromatográfico.....	44
3. Resultados e discussões.....	45
3.1. Caracterização do MIP.....	45
3.2. Otimização das variáveis.....	46
3.2.1. Vazões de extração.....	47
3.2.2. Vazão de eluição.....	49

3.2.3. Comprimento do reator.....	49
3.2.4. Natureza e concentração do eluente.....	49
3.2.5. Concentração de $\text{KMnO}_4$ .....	51
3.2.6. Coluna de limpeza (CL).....	52
3.2.7. Solução de lavagem.....	53
3.3. Estudo dos concomitantes .....	55
3.4. Figuras de mérito.....	59
3.5. Aplicações.....	60
4. Conclusões.....	61
Referências Bibliográficas.....	61

<b>Capítulo 2: Extração e determinação de nicotina em urina empregando polímeros de impressão molecular (MIP) e espectrofotometria.....</b>	<b>65</b>
1. Introdução.....	67
2. Experimental.....	69
2.1. Instrumentação.....	69
2.2. Reagentes e soluções.....	70
2.3. Síntese do MIP.....	71
2.4. Preparo das amostras.....	72
2.5. Sistema de extração e determinação espectrofotométrica usando MIP.....	73
2.6. Sistema cromatográfico.....	76
3. Resultados e discussões.....	77
3.1. Caracterização do MIP.....	77
3.2 Otimização das variáveis do sistema.....	78
3.2.1. Vazão de extração e de eluição.....	78
3.2.2. Comprimento do reator.....	80
3.2.3. pH de extração.....	80
3.2.4. Concentração do tampão.....	81
3.2.5. Concentração do eluente.....	83
3.2.6. Concentração de NaOH.....	83
3.2.7. Concentração de $\text{KMnO}_4$ .....	85
3.2.8. Temperatura do reator.....	85
3.3. Adaptação do método por HPLC.....	86
3.4. Soluções de condicionamento e lavagem .....	87
3.4.1. Solução de condicionamento (SC).....	87
3.4.2. Solução de lavagem 1 (SL1).....	88
3.4.3. Solução de lavagem 2 (SL1).....	89

3.5. Extração líquido-líquido.....	90
3.6. Estudo da seletividade.....	90
3.7. Figuras de mérito e aplicações em amostras e urina de fumantes.....	94
4. Conclusões.....	97
Referências Bibliográficas.....	98
<b>Capítulo 3: Extração de clorpromazina e perfenazina em urina empregando polímeros de impressão molecular (MIP) e separação a baixa pressão em coluna C18.....</b>	<b>101</b>
1. Introdução.....	103
2. Experimental.....	104
2.1. Instrumentação.....	104
2.2. Reagentes e soluções.....	105
2.3. Síntese do MIP.....	106
2.4. Amostras.....	107
2.5. Sistema de extração empregando MIP e separação a baixa pressão.....	108
2.6. Sistema cromatográfico convencional.....	111
3. Resultados e discussões.....	111
3.1. Otimização das variáveis do sistema.....	111
3.1.1. Natureza da coluna analítica.....	111
3.1.2. Composição da fase móvel.....	112
3.1.3. Vazão da fase móvel.....	112
3.1.4. pH do tampão.....	113
3.1.5. Solução de lavagem.....	115
3.2. Extração líquido-líquido.....	117
3.4. Figuras de mérito e aplicações.....	117
4. Conclusões.....	121
Referências bibliográficas.....	122
<b>Conclusões Gerais.....</b>	<b>125</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura RB-1:</b> Esquema genérico da síntese do MIP.....	10
<b>Figura RB-2:</b> Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada usualmente empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.....	15
<b>Figura RB-3:</b> Estrutura química dos iniciadores radicalares mais empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.....	17
<b>Figura RB-4:</b> Pesquisa do número de trabalhos científicos sobre MIP e SPE, publicados de 1994 a 2007. Fonte: “ <i>Web of Science</i> ”. Dia da pesquisa: 08-12-2008. Palavras chave: “ <i>molecular* imprint* polymer* and solid phase extraction</i> ” .....	26
<b>Figura C1-1:</b> Sistema de extração e determinação espectrofotométrico empregando MIP, na etapa de eluição (todas as válvulas estão desligadas como visto no estágio 5 da Tabela C1-1). O sistema compreende uma bomba peristáltica (BP), sete válvulas solenóides de três vias (V1-7) e um espectrofotômetro visível ajustado em 528 nm. R' = solução de $\text{KMnO}_4$ 0,010 % (m/v) a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , E = solução eluente de $\text{HNO}_3$ $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ a $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ , A = amostra/padrão a $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , SL1 = solução de lavagem 1 ( $\text{HNO}_3$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ + 2,0 % (v/v) de acetonitrila em água) a $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , SL2 = solução de lavagem 2 (acetonitrila 50 % (v/v)) a $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , MIP = coluna com 70 mg de polímero de impressão molecular seletivo a catecol, MP + C18 = coluna com 70 mg de polímero metacrílico (70 % (m/m)) + C18 (30 % (m/m)), R = Reator de 20 cm, x = ponto de confluência, AA = auto-amostrador e D = descarte. As linhas tracejadas indicam a posição alternativa das válvulas...	43
<b>Figura C1-2:</b> Micrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e do NIP (B) com aumento de 10000 vezes.....	46
<b>Figura C1-3:</b> Esquema da possível interação entre o catecol e o MIP por meio de interações de hidrogênio.....	47
<b>Figura C1-4:</b> Influência da vazão de extração e eluição na resposta analítica.....	48
<b>Figura C1-5:</b> Influência do comprimento do reator na resposta analítica.....	50
<b>Figura C1-6:</b> Influência da natureza e concentração dos ácidos do eluente na resposta analítica.....	51
<b>Figura C1-7:</b> Influência da concentração de $\text{KMnO}_4$ na resposta analítica.....	52

<b>Figura C1-8:</b> Influência da concentração de HNO <sub>3</sub> e acetonitrila na resposta analítica.....	55
<b>Figura C1-9:</b> Estrutura química do catecol e de três moléculas estruturalmente semelhantes (4-cloro-3-metilfenol, 2-cresol e 2-metoxifenol).....	56
<b>Figura C1-10:</b> Estudo da seletividade na determinação de catecol empregando os interferentes 4-cloro-3-metilfenol, 2-metoxifenol e 2-cresol.....	57
<b>Figura C1-11:</b> Cromatogramas de duas amostras de chá mate fortificadas com 20 µmol L <sup>-1</sup> de catecol, com (A) e sem (B) a passagem pelo sistema proposto.....	58
<b>Figura C1-12:</b> Sinais analíticos (em triplicata) do branco analítico, de padrões de catecol de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µmol L <sup>-1</sup> , de uma amostra de pó-de-guaraná adicionada de 20 µmol L <sup>-1</sup> de catecol e uma amostra de chá mate (sem adição), respectivamente.....	59
<b>Figura C2-1:</b> Esquema da extração líquido-líquido. PI: padrão intermediário.....	74
<b>Figura C2-2:</b> Sistema espectrofotométrico de extração e determinação empregando MIP, na etapa de eluição (todas as válvulas estão desligadas como visto no estágio 6 da Tabela C2-1). O sistema compreende uma bomba peristáltica (BP), sete válvulas solenóides de três vias (V1-7), um autoamostrador (AA) [16], um banho termostatizado (BT) a 50°C e um espectrofotômetro visível ajustado em 610 nm. R1 = solução de KMnO <sub>4</sub> 0,010 % (m/v) a uma vazão de 0,75 mL min <sup>-1</sup> , R2 = solução de NaOH 3 % (m/v) a uma vazão de 0,75 mL min <sup>-1</sup> E = solução eluente de HNO <sub>3</sub> 0,10 mol L <sup>-1</sup> a 0,75 mL min <sup>-1</sup> , A = amostra/padrão a 4,0 mL min <sup>-1</sup> , SC = solução de condicionamento (50% (v/v) acetonitrila/HNO <sub>3</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> ) a 4,0 mL min <sup>-1</sup> , SL1 = Solução de lavagem 1 (1:4 (v/v) acetonitrila:NaOH pH 11,4) a 4,0 mL min <sup>-1</sup> , SL2 = solução de lavagem 2 (HNO <sub>3</sub> pH 2,5) a 4,0 mL min <sup>-1</sup> , MIP = coluna com 100 mg de polímero impresso molecularmente seletivo a nicotina, R = Reator de 300 cm, x = ponto de confluência, AA = autoamostrador [16] e D = descarte. As linhas tracejadas indicam a posição alternativa das válvulas.....	75
<b>Figura C2-3:</b> Micrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e do NIP (B) com aumento de 10000 vezes.....	78
<b>Figura C2-4:</b> Influência da vazão de extração e da vazão de eluição na resposta analítica.....	79

<b>Figura C2-5:</b> Influência do comprimento do reator na resposta analítica.....	81
<b>Figura C2-6:</b> Influência do pH de extração na resposta analítica.....	82
<b>Figura C2-7:</b> Possível mecanismo de interação entre a nicotina e o MIP em pH maior que 7,0.....	82
<b>Figura C2-8:</b> Influência da concentração do eluente na resposta analítica.....	84
<b>Figura C2-9:</b> Perfil dos sinais mediante o emprego de concentrações de HNO <sub>3</sub> (eluente) de 0,01 (preto), 0,05 (vermelho), 0,10 (verde), 0,15 (azul escuro), 0,20 (azul claro) mol L <sup>-1</sup> .....	84
<b>Figura C2-10:</b> Influência da concentração de NaOH na resposta analítica.....	85
<b>Figura C2-11:</b> Influência da temperatura do reator na resposta analítica.....	86
<b>Figura C2-12:</b> Influência da concentração de acetonitrila na solução de lavagem 1.....	88
<b>Figura C2-13:</b> Influência do pH (ajustado com NaOH) da solução adicionada à acetonitrila para obtenção da solução de lavagem 1.....	89
<b>Figura C2-14:</b> Influência do pH da solução de lavagem 2, na resposta analítica.....	90
<b>Figura C2-15:</b> Influência do pH da urina na extração líquido-líquido.....	91
<b>Figura C2-16:</b> Cromatogramas de uma amostra de urina de fumante injetada no HPLC após uma LLE (A) e após uma LLE seguida da percolação da amostra pelo sistema proposto (B).....	92
<b>Figura C2-17:</b> Estrutura química da nicotina de algumas moléculas estruturalmente selmelhantes.....	93
<b>Figura C2-18:</b> Absorbâncias obtidas na leitura de doze amostras de urina de não fumantes e de três amostras de água Milli-Q. Todas as amostras foram inicialmente submetidas a uma LLE.....	95
<b>Figura C2-19:</b> Sinais analíticos (n = 3) do branco analítico, de 5 padrões de nicotina (4, 10, 20, 40 e 60 μmol L <sup>-1</sup> ) e 3 amostras de urina de fumantes (n =2), respectivamente.....	96
<b>Figura C3-1:</b> Estrutura química da clorpromazina e perfenazina.....	104
<b>Figura C3-2:</b> Micrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e do NIP (B) com aumento de 30000 vezes.....	107

<b>Figura C3-3:</b> Esquema da extração líquido-líquido. PI: padrão intermediário de clorpromazina e perfenazina.....	108
<b>Figura C3-4:</b> O sistema de extração usando MIP e separação a alta velocidade é composto por uma bomba de seringa (BS) de 10 mL, uma bomba peristáltica (BP), um injetor comutador (I), duas válvulas solenóides (V1-2), uma coluna cilíndrica (3 (d.i.) x 15 mm) contendo 25 mg de MIP seletivo a clorpromazina e uma coluna cilíndrica de 3 x 250 mm (d.i. x comprimento) preenchida com C18 entre 35 e 53 $\mu\text{m}$ . A fase móvel (FM) empregada foi metanol grau HPLC e a solução de lavagem (SL) foi HCl (pH 2.0):metanol 1:9 (v/v). O sinal foi monitorado a 250 nm, e o restante das soluções foram conduzidas ao descarte (D). As linhas tracejadas indicam a posição alternativa das válvulas.....	109
<b>Figura C3-5:</b> Separação obtida para vazões de 1,8, 2,4 e 3,0 mL $\text{min}^{-1}$ . Os três primeiros picos (1, 2 e 3) e os três últimos (4, 5 e 6) correspondem a clorpromazina e perfenazina, respectivamente.....	113
<b>Figura C3-6:</b> Separações obtidas empregando-se diferentes pHs do tampão.....	114
<b>Figura C3-7:</b> Esquema da possível interação entre a clorpromazina e o MIP em pH 7,0.....	115
<b>Figura C3-8:</b> Sinais analíticos (área) obtidos para clorpromazina e perfenazina empregando-se soluções de lavagem água (pH 7,0):metanol 1:9 e 2:8 (v/v).....	116
<b>Figura C3-9:</b> Efeito do pH da fração aquosa da SL no sinal analítico.....	117
<b>Figura C3-10:</b> Sinais obtidos na leitura de sete amostras de urina de indivíduos que não utilizam fenotiazínicos. Todas as amostras foram inicialmente submetidas a uma LLE.....	118
<b>Figura C3-11:</b> Separações para o branco, padrões de 5, 10, 20, 30 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de clorpromazina e perfenazina, e uma amostra de urina adicionada de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos fármacos. O branco e os padrões da curva foram preparados em pool de urinas de indivíduos que não tomam os medicamentos.....	119

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela RB-1:</b> Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.....	14
<b>Tabela C1-1:</b> Seqüência de trabalho das válvulas solenóides. L = ligada, D = desligada.....	44
<b>Tabela C1-2:</b> Área superficial, volume dos poros e diâmetro médio dos poros no MIP e NIP.....	46
<b>Tabela C1-3:</b> Determinação de catecol em amostras de guaraná, mate e água de torneira pelo sistema proposto e por HPLC; n = 3.....	60
<b>Tabela C2-1:</b> Seqüência de trabalho das válvulas solenóides. L = ligada, D = desligada.....	76
<b>Tabela C2-2:</b> Área superficial, volume dos poros e diâmetro médio dos poros no MIP e NIP.....	78
<b>Tabela C2-3:</b> Efeito de alguns interferentes na resposta analítica de um padrão de nicotina de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ .....	94
<b>Tabela C2-4:</b> Precisão intra-ensaio e inter-ensaio obtida com amostras de urina de não fumantes fortificadas em três níveis de concentração.....	96
<b>Tabela C2-5:</b> Determinação de nicotina em amostras de urina de fumantes pelo sistema proposto e por HPLC.....	96
<b>Tabela C3-1:</b> Seqüência de trabalho das válvulas solenóides, do injetor e das bombas. L = ligada, D = desligada, Pa = posição de amostragem, Pi = posição de injeção, As = aspirando, Di = dispensando.....	110
<b>Tabela C3-2:</b> Precisão intra-ensaio e inter-ensaio obtida com amostras de urina de indivíduos que fazem uso de fenotiazínicos, fortificadas em três níveis de concentração.....	120
<b>Tabela C2-3:</b> Determinação de clorpromazina em amostras de urina fortificadas, pelo sistema proposto (n = 3) e por HPLC (n = 3).....	120
<b>Tabela C2-4:</b> Determinação de perfenazina em amostras de urina fortificadas, pelo sistema proposto (n = 3) e por HPLC (n = 3).....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AA: Autoamostrador

ALC: agente de ligação cruzada

BET: Brunauer Emmett and Teller

BJH: Barret, Joyner and Halenda

CEC: eletrocromatografia capilar (do inglês *capillary electrochromatography*)

CL: coluna de limpeza

HPLC: high performance liquid chromatography

IR: iniciador radicalar

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LLE: extração líquido líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*)

MF: monômero funcional

MIP: polímeros de impressão molecular (do inglês *molecularly imprinted polymer*)

MM: molécula modelo

MP: polímero metacrílico (do inglês *methacrylic polymer*)

NIP: polímero controle (do inglês *non-imprinted polymer*)

PI: padrão intermediário

SC: solução de condicionamento

SL: solução de lavagem

SPE: extração em fase sólida (do inglês *solid phase extraction*)

UV: ultravioleta

# INTRODUÇÃO GERAL

Desde os tempos mais remotos, o homem faz uso de substâncias químicas com a finalidade de curar seus males ou gerar, momentaneamente, sensações agradáveis. O Papiro de *Ebers* datado do ano 1500 a.C, já apresentava uma lista com cerca de 800 substâncias ativas, tais como metais, venenos de animais e vegetais tóxicos com finalidades terapêuticas ou nocivas [1].

Com o constante desenvolvimento da ciência, a quantidade de substâncias usadas pela população vem crescendo constantemente, com destaque para fármacos e toxicantes. Tal crescimento tem despertado grande interesse, por parte da toxicologia, na dosagem de substâncias principalmente em amostras biológicas e alimentares, correlacionando os resultados com os efeitos benéficos ou prejudiciais acarretados por elas. Dessa forma, a química analítica tem um papel importante por permitir essas dosagens por meio das mais variadas técnicas de separação e determinação.

Ressalta-se, porém, que o trabalho com essas amostras nem sempre é tarefa fácil, principalmente devido à grande complexidade das mesmas. Na maioria dos casos, são necessários tratamentos prévios com a finalidade de minimizar interferências. Nesse contexto, métodos de extração como extração em fase sólida [2], extração líquido-líquido [3], extração por headspace [4], microextração em fase sólida [5], dentre outros, são rotineiramente utilizados.

Após a extração, normalmente se emprega cromatografia (a líquido e a gás) para a separação dos analitos, devido a características como seletividade e sensibilidade desta técnica. Isso pode ser comprovado pela vasta quantidade de trabalhos presentes na literatura que usam a cromatografia na análise de amostras biológicas [6-10].

Sendo uma técnica mais sujeita a interferentes, a espectrofotometria requer um preparo da amostra mais rigoroso, com a finalidade de melhorar a seletividade.

Porém, destacam-se, nessa técnica, características importantes como versatilidade, ampla faixa de trabalho, fácil implementação e baixo custo [11]. Quando associada a sistemas em fluxo, tais características são reforçadas, permitindo, assim, melhores condições de mistura, maiores taxas de amostragem e possibilidade de trabalho com produtos instáveis [12,13]. Sendo assim, o emprego da espectrofotometria na determinação de fármacos em amostras biológicas, torna-se uma alternativa elegante, principalmente devido à simplicidade dessa técnica quando comparada às demais.

Recentemente, os polímeros de impressão molecular (MIP) têm se destacando como sorventes seletivos na extração de analitos em amostras complexas. Esses polímeros são sintetizados seguindo a conformação de uma molécula modelo (MM), e guardam, em sua estrutura, um sítio de ligação seletivo a essa molécula [14-16]. O domínio dessa tecnologia vem permitindo uma melhor separação das substâncias (com grande potencial para enantioseletividade), garantindo, assim, detecções mais fidedignas das espécies de interesse.

Nesse sentido, acredita-se que a associação dos MIP com espectrofotometria pode resultar em procedimentos simples, rápidos e seletivos para a análise de diferentes analitos em amostras biológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Oga, M. E. B. Siqueira, Introdução à Toxicologia, In: S. Oga, *Fundamentos de Toxicologia*, 2 ed., Ateneu, São Paulo, 2003, p. 474.
- [2] M. Nichkova, M. P. Marco, Development and evaluation of C18 and immunosorbent solid-phase extraction methods prior immunochemical analysis of chlorophenols in human urine, *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 67.
- [3] S. M. Wang, T. C. Wang, Y. S. Giang, Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers in urine by simultaneous

- liquid-liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatographic-isotope dilution mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 816 (2005) 131.
- [4] D. O. Johns, R. L. Dillis, M. S. Morgan, Evaluation of dynamic headspace with gas chromatography/mass spectrometry for the determination of 1,1,1-trichloroethane, trichloroethanol, and trichloroacetic acid in biological samples, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 817 (2005) 255.
- [5] D. L. Mayer, J. S. Fritz, Semi-micro solid-phase extraction of organic compounds from aqueous and biological samples, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 189.
- [6] G. Frison, L. Tedeschi, D. Favretto, A. Rehemann, S. D. Ferraca, Gas chromatography/mass spectrometry determination of amphetamine-related drugs and ephedrines in plasma, urine and hair samples after derivatization with 2,2,2-trichloroethyl chloroformate, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 919.
- [7] J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, M. Gil-Agusti, M. E. Capella-Peiro, D. Bose, Micellar liquid chromatography for the determination of drugs materials in pharmaceutical preparations and biological samples, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
- [8] V. Pucci, M. A. Raggi, Analysis of antiepileptic drugs in biological fluids by means of electrokinetic chromatography, *Electrophoresis* 26 (2005) 767.
- [9] S. Mare, S. Penugonda, N. Ercal, High performance liquid chromatography analysis of MESNA (2-mercaptoethane sulfonate) in biological samples using fluorescence detection, *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 80.
- [10] G. H. Shui, L. P. Leong, Screening and identification of antioxidants in biological samples using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application on *Salacca edulis* Reinw, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 880.
- [11] M. Kolthoff, E. B. Sandell, *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis*, New York, 1967
- [12] F. Danet, M. Cheregi, J. M. Calatayud, J. V. G. Mateo, H. Y. A. Enein, Flow injection methods of analysis for waters. I. Inorganic species, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 191.
- [13] V. Cerdà, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, Flow techniques in water analysis, *Talanta* 50 (1999) 695.

- [14] M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, Imprinted polymers, *Adv. Mater.* 13 (2001) 467.
- [15] L. I. Andersson, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *J. Chromatogr. B*, 745 (2000) 3.
- [16] C. R. T. Tarley, M. P. T. Sotomayor, L. T. Kubota, Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação, *Quim. Nova* 28 (2005) 1076.

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

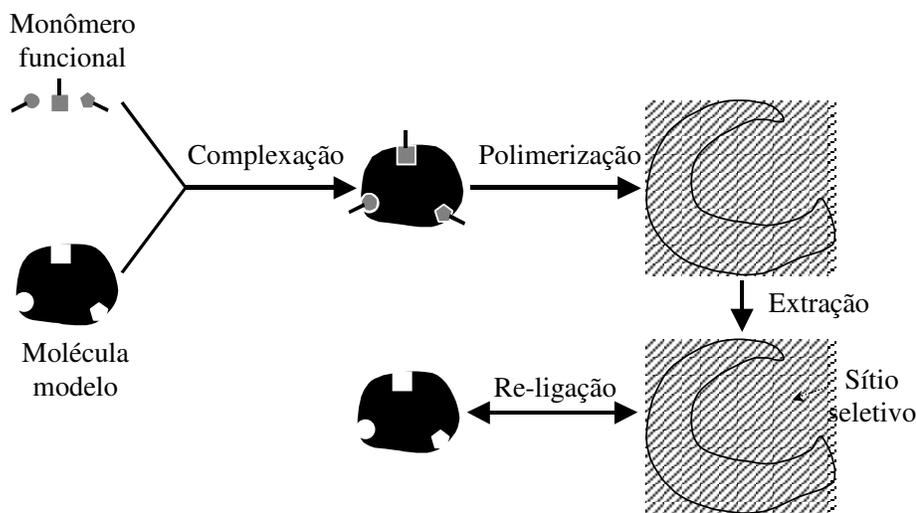
A síntese bibliográfica dessa Tese refere-se aos seus pontos mais relevantes, tais como conceitos e diferentes possibilidades de uso de MIP, emprego dos mesmos na extração de substâncias em amostras vegetais e biológicas, além do uso de reações químicas não seletivas na determinação de substâncias de interesse em amostras complexas.

## 1. POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP)

A existência na natureza de vários sistemas de reconhecimento molecular como a interação antígeno-anticorpo ou enzima-substrato, tem despertado grande interesse da ciência na síntese de sítios seletivos de reconhecimento [1]. Tudo começou em 1940, quando Pauling propôs sua teoria para a formação de anticorpos [2]. Segundo Pauling, um antígeno era empregado como molécula modelo (MM), e o anticorpo era modelado ao redor dessa molécula, resultando em configurações complementares altamente seletivas [2]. Em 1949, o trabalho de Dickey põe em prática a teoria de Pauling promovendo a utilização de absorventes específicos com memória inerente a uma dada molécula e capazes de se religar seletivamente à mesma [3]. A partir daí, vê-se despertar, na comunidade científica, a idéia de sintetizar um polímero rígido, com seletividade atribuída principalmente a sua estrutura tridimensional complementar à MM. Atualmente, essa técnica encontra-se bem estabelecida, sendo rotineiramente intitulada de polímeros de impressão molecular (do inglês *molecularly imprinted polymers* – MIP).

Os MIP têm sido rotineiramente preparados por uma metodologia chamada de polimerização em “*bulk*”, na qual a reação é realizada em um sistema homogêneo. Nesse processo, a MM e o monômero funcional (MF) são dissolvidos num solvente

(ampola de síntese), e se ligam estrategicamente em posições específicas e complementares (Figura RB-1). Posteriormente, adiciona-se o agente de ligação cruzada, responsável pela interligação dos MF e, conseqüentemente, a formação da rede polimérica. Contudo, a polimerização ocorre somente após a adição do iniciador radicalar, responsável pelo fornecimento de radicais reativos que dão início e continuidade à reação.



**Figura RB-1:** Esquema genérico da síntese do MIP.

Recentemente, Whitcombe e Vulfson [1] propuseram uma classificação dos MIP quanto à natureza do reconhecimento molecular. Essa classificação foi feita com base no tipo de ligação (entre a MM e MF/MIP), no momento da síntese e religação. Assim, foram enumerados três grandes grupos intitulados de impressão covalente, impressão não-covalente e impressão baseada no sacrifício espacial. Contudo, esses mesmos autores enfatizam a dificuldade de classificar os MIP devido ao surgimento de processos híbridos complexos.

A impressão covalente foi inicialmente proposta por Wulff *et al.* [4, 5] e tem como princípio básico a presença de ligações de natureza covalente entre o MF e a MM. Essa estratégia apresenta vantagens como o perfeito ajuste entre os MF e a

MM. Porém, após a polimerização, depara-se com uma enorme dificuldade em quebrar, especificamente, as ligações covalentes, mediante todas àquelas oriundas da rede polimérica. Por outro lado, quando a MM é retirada do sítio específico, novas ligações podem ser restabelecidas na cavidade, inativando a mesma para futuras religações. Outro inconveniente é o limitado número de moléculas compatíveis com essa metodologia, sendo necessário, para tal propósito, que as mesmas pertençam às classes dos álcoois, aldeídos, cetonas, aminas ou ácidos carboxílicos [1]. Por fim, ressalta-se que o principal inconveniente é a lenta cinética de ligação e clivagem entre os monômeros e a MM, o que inviabiliza consideravelmente eventuais aplicações de rápida demanda [1].

A impressão não-covalente, inicialmente proposta por Mosbach *et al.* [6,7], recebe esse nome devido à natureza não covalente das ligações entre os MF e a MM. Esse tipo de impressão tem sido estudado extensivamente, e até agora remete como sendo a mais popular estratégia de formação de sítios específicos de reconhecimento [1]. Sua popularidade é, em grande parte, consequência da versatilidade inerente à ampla faixa de interações não-covalentes tais como ligações de hidrogênio, iônica, íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido etc. [1]. Cabe também ressaltar a facilidade (cinética rápida) de formação e clivagem das ligações entre os MF e a MM, o que contribui para o emprego desse MIP em análises dinâmicas. Por outro lado, a fraca natureza das interações tem como principal desvantagem à formação de sítios de ligação heterogêneos [8].

Tentando contornar os problemas inerentes às impressões covalente e não-covalente, Whitcombe *et al.* [9] propuseram em 1995 um procedimento que associa as características vantajosas de ambas as impressões. A esse procedimento deu-se o nome de impressão baseada em sacrifício espacial. Nesse caso, os autores usaram um MF que se liga à MM por meio de interações covalentes, mas que é facilmente

desligado por clivagem hidrolítica, liberando CO<sub>2</sub> após a polimerização. Os grupos remanescentes no sítio formado (após a hidrólise) são capazes de se religar a MM por meio de interações não-covalentes. Assim, as interações covalentes entre o MF e a MM só ocorrem na etapa de síntese, sendo a religação intercambiada por interações de natureza não-covalente.

As constantes mudanças no projeto de síntese de MIP advêm do envolvimento de um vasto e complexo número de variáveis experimentais [10]. Dentre essas variáveis pode-se destacar a natureza e concentração da MM, do MF, do agente de ligação cruzada (ALC), do iniciador radicalar (IR), bem como o método para a iniciação e progresso da reação (temperatura, radiação UV). Nesse contexto, um grande número de regras de preparo de MIP tem surgido na literatura. Essas regras auxiliam nos processos de síntese de MIP inéditos, porém, não são sempre garantia de formação eficiente de sítios específicos de reconhecimento.

Ao propor a síntese de um MIP, deve-se inicialmente avaliar a MM quanto à presença de grupos capazes de se ligar ao MF, uma vez que nem todas essas MM apresentam características suficientemente satisfatórias para tal propósito [10]. Assim, quando se processa a síntese por meio de polimerização por radicais livres, deve-se avaliar a MM quanto à presença de grupos polimerizáveis que certamente promoverão a inserção da mesma dentro da rede polimérica, não ocorrendo formação de sítios de reconhecimentos [10]. Essas moléculas também não podem ter grupos funcionais que acelerem ou retardem a reação de polimerização tais como grupos tiol [10]. Por fim, elas devem ser estáveis a temperaturas de aproximadamente 60°C se a 2,2'-azobisisobutironitrila for empregada como IR [10].

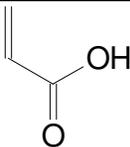
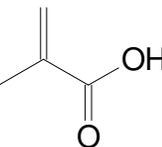
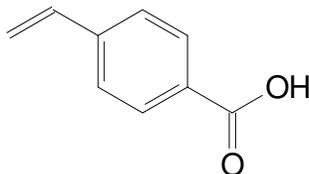
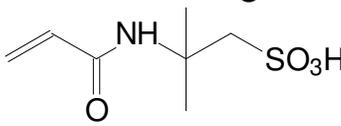
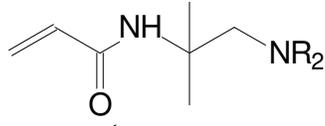
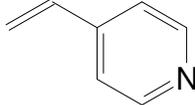
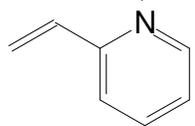
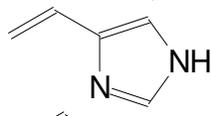
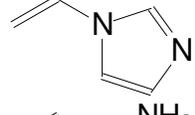
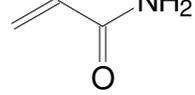
A escolha do MF deve ser criteriosamente embasada na complementaridade entre o mesmo e a MM. Dessa forma, é comum o emprego de um MF doador de próton (caráter ácido) e uma MM aceptora de próton (caráter básico), ou vice-versa

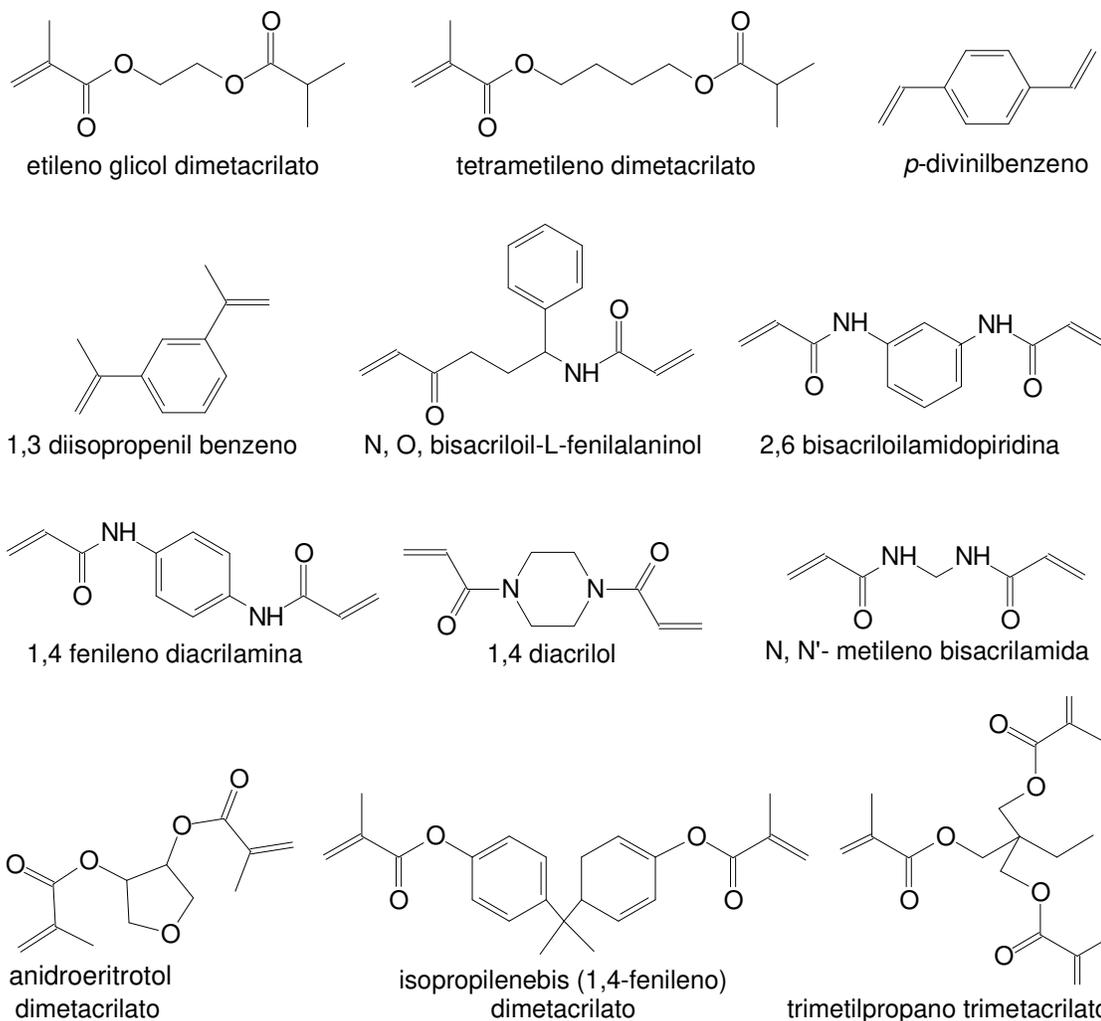
[11]. Nesse contexto, dois MF se destacam, o ácido metacrílico e a 4-vinilpiridina, empregados para MM básicas e ácidas, respectivamente. Contudo, outros também têm sido usados (*eg.* ácido acrílico, ácido *p*-vinilbenzóico, ácido acrilamidossulfônico, amino metacrilaminada, 2-vinilpiridina, 4-vinilimidazol, 1-vinilimidazol, acrilamida, dentre outros), sempre objetivando uma perfeita interação e conseqüente obtenção de sítios específicos e em alto número. A Tabela RB-1 [11] apresenta alguns MF e as principais interações feitas com a MM. Outro ponto importante é a concentração. Para tal avaliação é importante ressaltar que a interação entre o MF e a MM é governada por processos de equilíbrio. Assim, quantidades superiores de MF devem ser empregadas (normalmente 4:1-MF:MM), com o objetivo de deslocar o equilíbrio para a formação do maior número possível de sítios específicos de reconhecimento [12,13]. Por fim, é importante destacar a possibilidade de se utilizar uma combinação de MF em um processo denominado de coquetel de polimerização [14]. Contudo, deve-se avaliar criteriosamente a proporção dos MF, a fim de assegurar rigidez, porosidade e estabilidade mecânica do MIP.

Na síntese de um MIP, o agente de ligação cruzada (ALC) exerce diferentes funções. Ele é responsável pelo controle da morfologia da matriz polimérica (do tipo gel, macroporos ou microgel), além de estabilizar os sítios de ligação e conferir estabilidade mecânica ao polímero [10]. Um grande número de ALC (Figura RB-2) é compatível com impressão molecular, muitos dos quais são capazes de formar complexos com a MM, atuando como MF. Contudo, cabe destacar que o etileno glicol dimetacrilato tem sido o ALC mais largamente empregado, devido à formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa. Muito tem sido escrito sobre a proporção dos ALC durante a síntese. Porém, o que se pode concluir, sob o ponto de vista da polimerização, é que são requeridas altas

proporções de ALC [15], de modo a acessar permanente os poros do polímero e, assim, gerar materiais com adequada estabilidade mecânica [10].

**Tabela RB-1:** Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.

Monômero funcional	Estrutura química	Tipo de interação com o analito
Ácido acrílico		Iônica e ligação de hidrogênio
Ácido metacrílico		Iônica e ligação de hidrogênio
Ácido <i>p</i> -vinilbenzóico		Iônica e ligação de hidrogênio
Ácido acrilamidosulfônico		iônica
Amino metacrilamida		iônica
4-vinilpiridina		Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
2-vinilpiridina		Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
4-vinilimidazol		Iônica, ligação de hidrogênio e coordenação de metais
1-vinilimidazol		Iônica, ligação de hidrogênio e coordenação de metais
Acrilamida		ligação de hidrogênio



**Figura RB-2:** Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada usualmente empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.

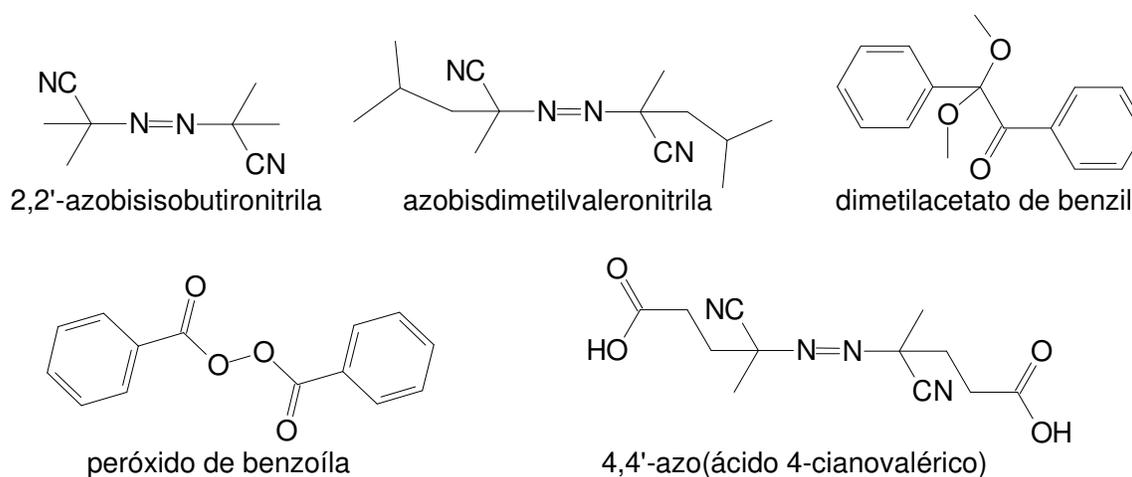
Outro parâmetro importante na síntese de MIP é a natureza do solvente que tem como finalidade solubilizar os reagentes da síntese, além de contribuir na formação adequada de poros perfeitamente arquitetados [11]. Por outro lado, o solvente não deve interferir na formação do complexo MF-MM, uma vez que tal interferência pode conduzir a formação de sítios de ligação pouco seletivos e em pequeno número. Como a maioria das interações entre MF-MM ocorre por meio de

forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio, os solventes mais adequados nessa situação são aqueles de caráter apolar, apróticos e de baixa constante dielétrica, tais como clorofórmio e tolueno. Contudo, quando ocorrem problemas de insolubilidade, podem ser empregados solventes de constante dielétrica maior (*eg.* acetonitrila), mediante a formação de MIP menos seletivos.

Outra função importante do solvente é auxiliar na formação de macroporos no polímero, e, por essa razão, eles são comumente intitulados de solventes porogênicos. Como regra geral, o aumento do volume do solvente porogênico aumenta a porosidade do polímero, e solventes com boa capacidade térmica conduzem à formação de boas estruturas de poros (alta área superficial) [10]. Vale também ressaltar que polímeros pouco porosos apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular devido à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos [13]. Entretanto, embora os solventes apolares, apróticos e de baixa constante dielétrica sejam os mais indicados para a síntese do MIP, o polímero manifestará maior caráter seletivo se a amostra, por ele processada, estiver em um meio similar ao da síntese [13]. Uma alternativa é promover uma extração líquido-líquido dos analitos antes da percolação pelo MIP, ou, ainda, efetuar a síntese do MIP em um meio polar (normalmente metanol:água). Porém, nesse último caso, o MIP pode ser sintetizado somente para algumas MM, devido à necessidade das mesmas de apresentar caráter anfifílico [16-17].

Somente a presença dos reagentes de síntese (MF, MM, ALC e solvente) comentados anteriormente, não é suficiente para criar os radicais livres para a polimerização. Assim, é indispensável o emprego de iniciadores radicalares (IR) em associação com estímulos físicos como temperatura e radiação UV. Porém, a escolha do iniciador deve ser feita após o conhecimento das manifestações causadas em todos os outros reagentes, no tocante ao aumento de temperatura, exposição à

radiação, dentre outras modificações físicas normalmente empregadas na ativação do IR [10]. Como exemplo, se uma MM for fotoquimicamente instável, o emprego de IR ativados por radiação pode não ser adequado. Outro ponto importante que deve ser observado diz respeito à condução da síntese em baixas temperaturas quando as ligações MF-MM ocorrem preferencialmente por ligações de hidrogênio. Nessas circunstâncias, iniciadores fotoquimicamente ativados são mais apropriados [10]. Por fim, cabe ressaltar que o IR mais empregado é a 2,2'-azobisisobutironitrila. A Figura RB-3 apresenta a estrutura química dos principais IR empregados na síntese de MIP.



**Figura RB-3:** Estrutura química dos iniciadores radicalares mais empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.

Além de todos os aspectos comentados anteriormente, salienta-se que a presença de oxigênio causa retardo no processo de síntese [10]. Assim, para maximizar a interligação grupo a grupo dos MF, é interessante promover a remoção do oxigênio normalmente purgando nitrogênio ou argônio por alguns minutos, ou também empregando um banho ultra-som.

Em termos de seletividade do MIP um dos fatores mais influentes é o tamanho da MM. Assim, MIP para moléculas grandes são comprovadamente menos seletivos, talvez pela formação de sítios específicos “grandes”, o que permite a entrada de outras moléculas pequenas presentes na amostra [18]. Contudo, o trabalho de Minoura e Rachkov [19], apresenta uma alternativa elegante para o reconhecimento de uma proteína. Nesse caso, o MIP foi sintetizado para uma seqüência de quatro aminoácidos presente na molécula de oxitocina (oligopeptídeo). Dessa forma, o reconhecimento da proteína ocorre indiretamente ao reconhecimento do peptídeo. Nesse mesmo contexto, alguns trabalhos interessantes foram propostos, com destaque para o artigo de Tai *et al.* [20] que relata uma metodologia capaz de diagnosticar a Dengue, baseada no reconhecimento de uma proteína por meio de uma seqüência de aminoácidos.

Em um estágio inicial, as pesquisas na área de polímeros de impressão molecular (MIP) se direcionaram na compreensão dos princípios básicos que regem a seletividade das interações moleculares entre o ligante e o sítio de reconhecimento. Porém, existe um grande interesse na atualidade na aplicação prática de receptores sintéticos em amostras complexas, simplesmente porque o reconhecimento molecular é a base principal de separações altamente seletivas [1]. Com isso, a técnica tem amadurecido, se estabelecendo nas mais diversas áreas devido à características relevantes como estabilidade, robustez e seletividade para uma ampla faixa de compostos [1].

Por fim, cabe destacar a ampla faixa de aplicação da tecnologia MIP, principalmente direcionada à separação de matrizes complexas. Os mais diversos tipos de analitos podem ser determinados, tais como enzimas [21], proteínas [22], hormônios [23], peptídeos [24], nucleotídeos [25] e fármacos [26], comprovando sua grande potencialidade em aplicações analíticas.

## 2. APLICAÇÕES DE MIP EM QUÍMICA ANALÍTICA

Em 1972, Wulff e Sarhan [27] propuseram o primeiro trabalho empregando um MIP em química analítica. Esse trabalho relatava a síntese de um polímero com sítios seletivos para a separação enantiomérica de racematos de açúcar. Desde então, e principalmente a partir da década de 1990, um emprego crescente da tecnologia de impressão molecular tem ocorrido em diversos laboratórios de química analítica, a ponto de se afirmar que, hoje, a grande maioria das aplicações de sucesso desses polímeros, ocorre nesse campo das ciências químicas.

Dentre essas aplicações, pode-se citar os sensores químicos, as técnicas de separação como a cromatografia, a eletrocromatografia capilar e a extração em fase sólida (SPE) [28]. Porém, deve ser dada uma relevância maior ao emprego de MIP como fase estacionária em cromatografia líquida, e como fase sólida em SPE, devido ao grande número de trabalhos relativos a essas aplicações. Por outro lado, especificamente para cromatografia líquida e eletroforese capilar, salienta-se que a grande maioria dos trabalhos remete ao emprego de MIP em separações quirais [29]. A seguir, as mais relevantes estratégias de emprego de MIP em química analítica são individualmente comentadas e exemplificadas.

### 2.1. Sensores

Um sensor químico é constituído de um elemento de reconhecimento acoplado a um transdutor. O elemento de reconhecimento é responsável pela interação seletiva com o analito [30], e o transdutor converte essa informação em resposta analítica [31]. Tradicionalmente, os elementos de reconhecimento mais empregados nos biossensores químicos são enzimas e anticorpos. Contudo, o

emprego de materiais seletivos como os MIP, tem se sido uma boa alternativa em substituição às biomoléculas, devido ao fácil preparo, baixo custo, resistência a ambientes adversos, fácil armazenagem, dentre outras vantagens [32]. Nesse caso, a detecção é feita com base a alguma propriedade geral do analito (*e.g.* espectro infravermelho, fluorescência e atividade eletroquímica) ou em mudanças de parâmetros físico-químicos do sistema (*e.g.* massa acumulada), após a ligação analito-MIP.

O primeiro sensor a base de MIP foi reportado em 1993 por Hedborg *et al.* [33]. O sensor constituía-se de um capacitor de efeito de campo contendo uma fina membrana de MIP seletivo a fenilalanina. A ligação do analito resultava na mudança da capacitância do dispositivo, permitindo sua detecção. Lahav *et al.* [34], propuseram um filme de TiO<sub>2</sub> impresso para ácidos cloroaromáticos como o 2,4-D, e empregaram-no para o reconhecimento desse composto na forma de sensores baseados em transistores de efeito de campo sensíveis a íons. Os resultados foram satisfatórios em termos de seletividade e sensibilidade para a detecção de sais de sódio das moléculas impressas.

Outros importantes sensores químicos são aqueles sensíveis a massa como a microbalança de cristal de quartzo [35]. Nessa técnica, um filme do MIP é acoplado sobre um cristal de quartzo que oscila a uma dada frequência, mediante uma fonte osciladora. Quando se processa a passagem do analito pelo sistema, esse se liga seletivamente às cavidades do MIP causando um aumento da massa e, como consequência, uma diminuição da frequência de oscilação (sinal analítico). Zougagh *et al.* [36] propuseram o acoplamento de um filme de MIP (seletivo a cafeína) sobre um cristal piezolétrico de quartzo. O sistema foi empregado para a análise direta de cafeína em suspensões, apresentando uma boa sensibilidade e seletividade. Feng *et al.* [37] acoplaram um MIP seletivo a formaldeído a uma microbalança de cristal de quartzo. O sistema portou-se como um sensor de odor e foi capaz de reter

seletivamente formaldeído em fase gasosa. Outro interessante trabalho foi proposto por Tai *et al.* [20] e relata o emprego de uma microbalança de cristal de quartzo associada a um MIP para o diagnóstico da Dengue. Para isso, sintetizou-se um MIP seletivo a uma proteína presente somente na superfície e no meio intercelular de células contaminadas pelo vírus. O reconhecimento ocorreu por meio da ligação de um peptídeo dessa proteína (15 aminoácidos) ao MIP. Os resultados foram satisfatórios e permitiram diagnosticar a Dengue em sobrenadante de cultura de células contaminadas ou não pelo vírus.

Uma modalidade elegante de sensores a base de MIP são aqueles que se portam como transdutores condutimétricos [38]. Nesse caso, dois eletrodos são separados por uma membrana de MIP. Quando o analito se liga ao sítio seletivo, ocorre uma modificação da condutividade do sistema, a qual é utilizada como sinal analítico. Sergeyeve *et al.* [39] desenvolveram um sensor para o herbicida atrazina, baseado em um MIP de ácido metacrílico seletivo a atrazina e em medidas condutimétricas. Os resultados mostraram haver uma grande dependência da quantidade e do tamanho do agente de ligação cruzada na flexibilidade, na estabilidade da membrana bem como na resposta condutimétrica. Sendo assim, os melhores resultados foram obtidos empregando-se agentes de ligação cruzada longos e flexíveis. Um dos principais atrativos desse sensor foi o baixo tempo de medida e a alta sensibilidade.

## **2.2. Separações**

### **2.2.1. Cromatografia**

Embora, atualmente, as aplicações de MIP como sensores estejam em crescimento, são nas ciências das separações que esses materiais realmente se destacam. Isso pode ser comprovado pelo extensivo número de trabalhos sobre o

assunto decorrentes da boa adaptação desses polímeros como fase estacionária em cromatografia líquida e em eletrocromatografia capilar, e como fase sólida em SPE. Em 2000 [40], Andersson mencionou que a aplicação mais estudada de MIP era justamente seu emprego como fase estacionária para cromatografia líquida, em consequência da boa resposta desses materiais na separação de enantiômeros. Realmente, o processo de impressão traz enantioseletividade ao polímero sintetizado para um isômero específico, principalmente quando se empregam monômeros funcionais não quirais. Além disso, o fato de serem feitos sob medida, permite um maior controle de sua seletividade mediante mudanças nas condições de síntese.

Hwang e Lee [41] sintetizaram um MIP para (-)fenilpropanolamina, empregando-se ácido metacrílico e etilenoglicoldimetacrilato como monômero funcional e agente de ligação cruzada. O MIP foi, então, empacotado em uma coluna analítica e a enantioseletividade foi avaliada. Após a injeção de uma mistura racêmica dos isômeros, observou-se o maior tempo de retenção do isômero (-), comprovando a maior afinidade do mesmo pela coluna. Da mesma forma, Matsui *et al.* [42] conseguiram um alto fator de separação (>31) empregando-se polímeros impressos para isômeros (+) e (-) de cinchonidina (alcalóide da cinchona).

Yin *et al.* [43] compararam a eficiência da separação de colunas analíticas preenchidas, ou com um MIP sintetizado diretamente dentro da coluna, ou sintetizado fora da coluna e posteriormente empacotado. Os resultados mostraram que a separação de isômeros de nateglinida (hipoglicemiante usado no tratamento do diabetes), foi bem definida usando o MIP sintetizado diretamente dentro da coluna, enquanto, na outra coluna, não houve resolução cromatográfica. A origem dessa diferença no reconhecimento quiral foi investigada por Kim *et al.* [44] que concluíram existir uma distribuição mais homogênea dos sítios específicos do MIP quando o mesmo é sintetizado diretamente na coluna. Isso certamente se deve à

redução do número de sítios não específicos. Todavia, a principal limitação desse processo de síntese (direto na coluna) é o emprego de solventes porogênicos mais polares (necessários para a formação de polímeros permeáveis). Isso pode gerar uma competição entre esse solvente e a molécula modelo pela ligação como o monômero funcional, diminuindo a qualidade dos sítios específicos.

Algumas metodologias de sínteses de MIP são feitas por meio do aumento progressivo das partículas sob pontos específicos de sedimentação. Nesse contexto, Haginaka e Kagawa [45] sintetizaram um MIP para clorfeniramina e bronfeniramina empregando ácido metacrílico ou ácido 2-trifluorometilacrílico como monômeros funcionais e látex de poliestireno como ponto de sedimentação. Após a síntese, a retenção enantioselectiva foi avaliada, empacotando-se os polímeros em uma coluna analítica acoplada a um equipamento de HPLC. Os resultados demonstraram haver uma afinidade das moléculas modelo pelos respectivos MIP. Os autores ainda reforçam que as interações que favorecem o aspecto seletivo do MIP são possivelmente interações de troca-iônica ou hidrofóbicas.

Embora a complexidade da molécula seja crucial na obtenção de materiais enantioselectivos, alguns autores têm conseguido separações eficientes, mesmo para moléculas com mais de um centro quiral. Assim, Ramstrom *et al.* [24] sintetizaram um MIP para o dipeptídeo Ac-(L)-Phe-(L)-Trp-Ome, capaz de reconhecer especificamente o isômero de impressão na presença de três outros estereoisômeros. Nesse caso, o isômero (LL) foi mais retido na coluna de MIP do que os isômeros (DD), (DL) e (LD). De uma forma geral, pode-se concluir que quanto maior o número de centros quirais da molécula, maior a seletividade inerente ao polímero impresso [28]. Assim, Mayes *et al.* [46], conseguiram seletividade empregando-se MIP sintetizados para um derivado da glicose. Vários isômeros foram avaliados,

sendo o maior tempo de retenção sempre do isômero de impressão, comprovando a maior afinidade do mesmo pela coluna.

### 2.2.2. Eletrocromatografia capilar (CEC)

A eletrocromatografia capilar pode ser considerada como uma das mais promissoras técnicas cromatográficas usada em associação com MIP [28]. Tal conclusão advém da maior eficiência de separação dessa técnica, o que pode aumentar o desempenho dos MIP [40]. Além disso, outros pontos relevantes devem ser destacados, como o volume reduzido de reagentes e amostra consumidos, bem como a facilidade de miniaturização. No sentido prático, duas alternativas têm se destacado para promover a inclusão do MIP dentro do capilar de sílica. Na primeira delas, polímeros convencionais são imobilizados no capilar usando um gel de poli(acrilamida) [47], e, na segunda, o MIP é sintetizado diretamente dentro do capilar de sílica [48].

O trabalho de Schweitz *et al.* [49] relata a separação enantioselectiva de propranolol e metoprolol por meio de MIP e CEC. Como principais resultados pode-se mencionar que um MIP sintetizado para (R)-propranolol conseguiu separar uma mistura racêmica contendo (R) e (S)-propranolol. Da mesma forma, (R) e (S)-metoprolol foram satisfatoriamente separados empregando-se um MIP para (S)-metoprolol. Além da eficiência de separação, a elevada resistência química e física dos polímeros resultou em uma estabilidade para até 3 meses de uso.

No mesmo contexto, Lin *et al.* [47] sintetizaram um MIP para a separação enantiomérica de (D) e (L) fenilalanina. Após a síntese, o polímero foi misturado a um gel de poli(acrilamida) e inserido dentro do capilar de sílica. O desempenho do MIP foi satisfatório, permitindo a separação dos isômeros (R) e (S) com boas resoluções cromatográficas. Para fins de comparação, os mesmos autores [50]

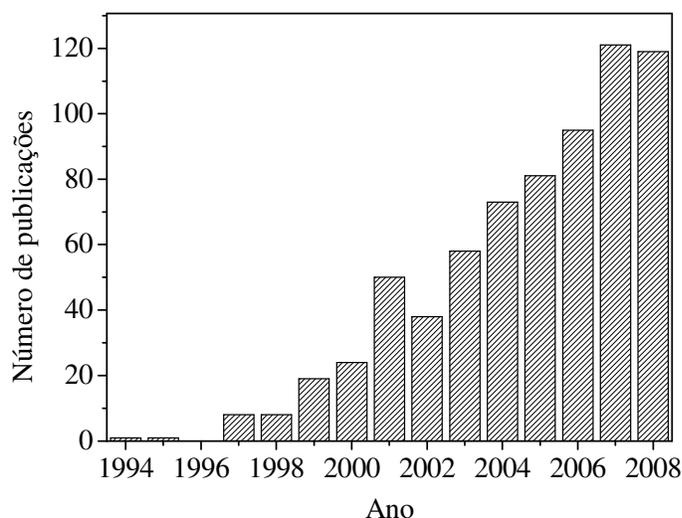
sintetizaram o MIP para fenilalanina diretamente dentro do capilar de sílica. Esse, por sua vez, foi então avaliado na separação dos isômeros, não apresentando boa resolução cromatográfica, a qual foi constatada pelo número reduzido de pratos teóricos. Como explicação, os autores atribuem a baixa resolução do MIP sintetizado *in situ*, à heterogeneidade do diâmetro das partículas.

Ou *et al.* [51] prepararam dois MIP para separação enantiomérica de tetraidropalmitato e base de Tröger. A síntese ocorreu diretamente dentro do capilar de sílica monolítica. Inicialmente, aderiu-se grupos vinilas aos silanóis da sílica monolítica, e, em seguida, promoveu-se a síntese individual do MIP com cada molécula modelo. Os capilares foram, então, acoplados (separadamente) a um equipamento de eletrocromatografia capilar, propiciando uma boa separação cromatográfica dos isômeros de tetraidropalmitato e de base de Tröger em menos de quatro minutos. Além disso, os autores também salientam que a separação obtida com esse tipo de MIP foi mais eficiente que a separação obtida por MIP orgânico [52].

### 2.2.3. Extração em fase sólida (SPE)

A aplicação extensiva dos MIP como fase sólida em SPE é resultado da simplicidade dessa aplicação [53], bem como do alto grau de seletividade dos MIP, quando comparados a sorventes convencionais como C18 e resinas de troca iônica [40]. Como visto na seção 1.2.1, em 2000 [40], Andersson mencionou que a aplicação mais estudada de MIP era como fase estacionária para cromatografia líquida. No entanto, em 2001, Haupt [28] contradisse essa afirmação dizendo que a SPE já era a técnica de separação, em associação aos MIP, mais extensivamente estudada. Independentemente, o curto intervalo de tempo no qual ocorreu a mudança de tendências, pode servir para destacar o crescimento das aplicações de MIP em

SPE. Tal comprovação pode ainda ser reforçada pela Figura RB-4 que retrata o crescimento dessa aplicação. Como pode ser visto, o número de trabalhos dobrou de 2000 para 2001.



**Figura RB-4:** Pesquisa do número de trabalhos científicos sobre MIP e SPE, publicados de 1994 a 2008. Fonte: “*Web of Science*”. Dia da pesquisa: 08-12-2008. Palavras chave: “*molecular\* imprint\* polymer\* and solid phase extraction*”.

Atualmente, o emprego de MIP como SPE é realizado por diversos grupos de pesquisa, o que propiciou a publicação de 120 trabalhos inéditos no ano de 2008. Bravo et al. [54] sintetizaram um MIP a base de ácido metacrílico para a extração seletiva de dietilbestrol, um composto estrogênico normalmente encontrado em baixas concentrações no ambiente. Após a extração, o eluato foi diretamente injetado em um equipamento de HPLC. A seletividade do MIP foi avaliada frente a diversos compostos da mesma classe tais como hexestrol, estrona, estriol, estradiol, e etinilestradiol. O MIP apresentou boa seletividade e também boa capacidade de pré-concentração. Os autores também enfatizaram como principais vantagens, a possibilidade de trabalhar com grandes volumes de amostras (pré-concentração), as

restritas etapas de manipulação das amostras, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo.

O trabalho de Fernandez-Llano *et al.* [55] relatou a síntese de um MIP seletivo a diclofenaco empregando-se 2-(dimetilamino)etil-metacrilato como monômero funcional. O polímero foi aplicado para a extração de diclofenaco em urina seguido de quantificação por voltametria de pulso diferencial. Os resultados foram satisfatórios em termos de seletividade e sensibilidade.

Prasad *et al.* [56] sintetizaram um MIP para ácido úrico empregando melanina e cloranil como monômeros funcionais. O MIP foi usado de duas maneiras: como fase sólida em uma SPE para a extração de ácido úrico e também na construção do sensor eletroquímico usado na quantificação do mesmo. As potencialidades do sistema foram avaliadas frente a amostras de soro sanguíneo, sem nenhum tratamento prévio (*e.g.* precipitação de proteínas, filtração). A metodologia permitiu, nas melhores condições de trabalho, a determinação de ácido úrico em concentrações de até 0,024 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, uma avaliação com moléculas estruturalmente semelhantes ao ácido úrico demonstrou haver maior afinidade do ácido úrico pelo MIP.

O trabalho de Ariffin *et al.* [57] relatou a síntese de um MIP para diazepam empregando ácido metacrílico como monômero funcional. O polímero foi usado na extração seletiva de diazepam e outros benzodiazepínicos em amostras de cabelo seguidas da separação e quantificação por cromatografia líquida com detector de massa seqüencial. Essas amostras foram inicialmente lavadas e depois pré-extraídas com metanol. O extrato foi levado a secar e o resíduo foi ressuspenso em tolueno para a execução da SPE. Os autores promoveram uma comparação entre a SPE usando C18 e MIP como fase sólida e o cromatograma da extração usando MIP foi mais limpo que aquele obtido após o uso de C18.

Zurutuza *et al.* [58] sintetizaram um MIP para benzoilecgonina, um metabólito da cocaína, empregando ácido metacrílico com monômero funcional. O MIP foi então empregado em uma SPE e os resultados demonstraram seletividade satisfatória na extração de benzoilecgonina em amostras aquosas. Segundo os autores, o sucesso na preparação e avaliação do MIP pode representar a primeira etapa para a construção de um sensor para detectar a presença de cocaína por meio de seu metabólito.

Embora uma imensa variedade de MIP tenha sido empregada em procedimentos de SPE, ressalta-se não haver uma variação significativa na configuração desses procedimentos. Assim, o aspecto inovador das novas propostas, recai inteiramente nas variações da rota de síntese e dos reagentes empregados na mesma, além de estudos relacionados às etapas de lavagem. Dessa forma, alguns materiais mais seletivos e com uma maior percentual de sítios específicos têm sido propostos, tornando ainda mais atraente essa área das ciências de separações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, Imprinted polymers, *Adv. Mater.* 13 (2001) 467.
- [2] L. J. Pauling, A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies, *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1940) 2643.
- [3] F. H. Dickey, The preparation of specific adsorbents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 35 (1949) 227.
- [4] G. Wulff, J Haarer, Enzyme-analogue built polymers. The preparation of defined chiral cavities for the racemic resolution of free sugars, *Makromol. Chem.* 192 (1991) 1329.
- [5] G. Wulff, S. Schauhoff, Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 395.

- [6] B. Ekberg, K. Mosbach, Molecular imprinting: A technique for producing specific separation materials, *Trends Biotechnol.* 7 (1989) 92.
- [7] K. Mosbach, Molecular imprinting, *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994) 9.
- [8] L. Ye, K. Mosbach, The technique of molecular imprinting – principle, state of the art, and future aspects, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 41 (2001) 107.
- [9] M.J. Whitcombe, E.M. Rodriguez, P. Villar, E.N. Vulfson, A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7105.
- [10] P. A. G. Cormack, A. Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 173.
- [11] C. R. T. Tarley, M. P. T. Sotomayor, L. T. Kubota, Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação, *Quim. Nova* 28 (2005) 1076.
- [12] L. I. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 5211.
- [13] A. Martín-Esteban, Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 795.
- [14] O. Ramström, L. I. Andersson, K. Mosbach, Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 7562.
- [15] B. Sellergren, *Macromol. Chem. Phys.* 190 (1989) 2703.
- [16] E. Caro, R. M. Marcé, P. A. Cormack, D. C. Sherrington, F. Borrull, Molecularly imprinted solid-phase extraction of naphthalene sulfonates from water, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 175.
- [17] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 35.
- [18] S. A. Spivak, J. Campbell, Systematic study of steric and spatial contributions to molecular recognition by non-covalent imprinted polymers, *Analyst* 126 (2001) 793.
- [19] A. Minoura, N. Rachkov, Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, *Biochim. Biophys. Acta* 1544 (2001) 255.

- [20] D. Tai, C. Lin, T. Wu, L. Chen, Recognition of Dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5140.
- [21] J. Svenson, N. Zheng, I. A. Nicholls, A molecularly imprinted polymers-based synthetic transaminase, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 8554.
- [22] A. Bossi, S. A. Piletsky, E. V. Piletska, P. G. Righetti, A. P. F. Turner, Surface-Grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5281.
- [23] H. Dong, A. Tong, L. Li, Syntheses of steroid-based molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study with spectrometric detection, *Spectrochim. Acta Part A* 59 (2003) 279.
- [24] O. Ramström, I. A. Nicholls, K. Mosbach, Synthetic peptide receptor mimics - highly stereoselective recognition in noncovalent molecularly imprinted polymers, *Tetrahedron Asymmetry* 5 (1994) 649.
- [25] K. J. Shea, D. A. Spivak, B. Sellergren, Polymer complements to nucleotide bases - selective binding of adenine-derivatives to imprinted polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 3368.
- [26] R. Suedee, T. Srichana, T. Chuchome, U. Kongmark, Use of molecularly imprinted polymers from a mixture of tetracycline and its degradation products to produce affinity membranes for the removal the tetracycline from water, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 811 (2004) 191.
- [27] G. Wulff, A. Sarhan, The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of recemates, *Angew. Chem.* 11 (1972) 341.
- [28] K. Haupt, Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst* 126 (2001) 747.
- [29] N. M. Maier, W. Lindner, Chiral recognition applications of molecularly imprinted polymers: critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 377.
- [30] C. R. T. Tarley, M. D. P. T. Sotomayor, L. T. Kubota, Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: Aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos, *Quim. Nova* 28 (2005) 1087.
- [31] J. Wang, Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 47.
- [32] S. Piletsky, S. Alcock, A. P. F. Tuner, Molecular imprinting: at the edge of the third millennium, *Trends Biotechnol.* 19 (2001) 9.
- [33] E. Hedborg, F. Winquist, I. Lundstrom, L. I. Andersson, K. Mosbach, Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sens. Actuators A* 37-38 (1993) 796.

- [34] M. Lahav, A. B. Kharitonov, O. Kartz, T. Kunitake, I. Willner, Tailored Chemosensors for Chloroaromatic Acids Using Molecular Imprinted TiO<sub>2</sub> Thin Films on Ion-Sensitive Field-Effect Transistors, *Anal. Chem.* 73 (2001) 720.
- [35] C. Malitesta, I. Losito, P. G. Zambonin, Molecularly Imprinted Electrosynthesized Polymers: New Materials for Biomimetic Sensors, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1366.
- [36] M. Zougagh, A. Rios, M. Valcárcel, Automatic selective determination of caffeine in coffee and tea samples by using a supported liquid membrane-modified piezoelectric flow sensor with molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 117.
- [37] L. Feng, Y. Liu, X. Zhou, J. Hu, The fabrication and characterization of a formaldehyde odor sensor using molecularly imprinted polymers, *J. Colloid. Interf. Sci.* 284 (2005) 378.
- [38] S. A. Piletsky, E. V. Piletskaya, A. V. Elgersma, K. Yano, I. Karube, Y. Pearhometz, A. V. El'skaya, Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 959.
- [39] T. A. Sergeeva, S. A. Piletsky, T. L. Panasyuk, A. V. El'skaya, A. A. Brovko, E. A. Slinchenko, L. M. Sergeeva, Conductimetric sensor for atrazine detection based on molecularly imprinted polymer membranes, *Analyst* 124 (1999) 331.
- [40] L. I. Andersson, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 3.
- [41] C. Hwang, W. Lee, Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase, *J. Chromatogr. B* 765 (2001) 45.
- [42] J. Matsui, I. A. Nicholls, T. Takeuchi, Highly stereoselective molecularly imprinted polymer synthetic receptors for cinchona alkaloids, *Tetrahedron: Asymmetr.* 7 (1996) 1357.
- [43] J. Yin, G. Yang, Y. Chen, Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its L-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A*, 1090 (2005) 68.
- [44] H. Kim, G. Guiochon, Comparison of the Thermodynamic Properties of Particulate and Monolithic Columns of Molecularly Imprinted Copolymers, *Anal. Chem.* 77 (2005) 93.
- [45] J. Haginaka, C. Kagawa, Retentivity and enantioselectivity of uniformly sized molecularly imprinted polymers for d-chlorpheniramine and -brompheniramine in hydro-organic mobile phases, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 19.

- [46] A. G. Mayes, L. I. Andersson, K. Mosbach, Sugar binding polymers showing high anomeric and epimeric discrimination obtained by noncovalent molecular imprinting, *Anal. Biochem.* 222 (1994) 483.
- [47] J. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, Molecularly imprinted polymer as chiral selector for enantioseparation of amino acids by capillary gel electrophoresis *Chromatographia* 43 (1996) 585.
- [48] K. Nilsson, J. Lindell, O. Norrlöw, B. Sellergren, Imprinted polymers as antibody mimetics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 57.
- [49] L. Schweitz, L. I. Andersson, S. Nilsson, Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1179.
- [50] J. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, Capillary electrochromatographic separation of amino acid enantiomers using on-column prepared molecularly imprinted polymer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1351.
- [51] J. J. Ou, X. Li, S. Feng, J. Dong, X. Dong, L. Kong, M. Ye, H. Zou, Preparation and evaluation of a molecularly imprinted polymer derivatized silica monolithic column for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography, *Anal. Chem.* 79 (2007) 639.
- [52] J. J. Ou, J. Dong, R. J. Tian, J. W. Hu, M. L. Ye, H. F. Zou, Enantioseparation of tetrahydropalmatine and Troger's base by molecularly imprinted monolith in capillary electrochromatography *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 71.
- [53] F. G. Tamayo, E. Turiel, A. Martín-Esteban, Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent development and future trends, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 32.
- [54] J. C. Bravo, R.M. Garcinuño, P. Fernández, J. S. Durand, A new molecularly imprinted polymer for the on-column solid-phase extraction of diethylstilbestrol from aqueous samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1039.
- [55] L. Fernandez-Llano, M.C. Blanco-Lopez, M.J. Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, Determination of diclofenac in urine samples by molecularly-imprinted solid-phase extraction and adsorptive differential pulse voltammetry, *Electroanalysis* 19 (2007) 1555.
- [56] B. B. Prasad, P. S. Sharma, D. Lakshmi, Molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-based sensor for detection of uric acid, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 18.
- [57] M. M. Ariffin, E. I. Miller, P. A. G. Cormack, R. A. Anderson, Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Diazepam and Its Metabolites from Hair Samples, *Anal. Chem.* 79 (2007) 256.

- [58] A. Zurutuza, S. Bayoudh, P.A.G. Cormack, L. Dambies, J. Deere, R. Bischoff, D.C. Sherrington, Molecularly imprinted solid-phase extraction of cocaine metabolites from aqueous samples, *Anal. Chim.* 542 (2005) 14.

## *Capítulo 1*

# **EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE CATECOL EM AMOSTRAS VEGETAIS EMPREGANDO POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP) E ESPECTROFOTOMETRIA**

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são poluentes ambientais comumente usados em uma ampla faixa de indústrias como a farmacêutica, de alimentos, óleos, polímeros dentre outras [1]. Eles também são produzidos como co-produtos em outros processos industriais, bem como durante a decomposição natural de substâncias húmicas e leguminosas [2]. O monitoramento desses compostos é de elevada importância por sua alta toxicidade ambiental, como também devido a uma série danosa de alterações causada em humanos tais como mutações e cânceres [3].

Dentre os derivados fenólicos pode-se destacar o catecol devido principalmente à elevada presença de tal molécula em diferentes amostras (ambientais, vegetais, dentre outras), e também ao potencial tóxico da mesma em comparação a outros compostos fenólicos. O catecol é aproximadamente duas vezes mais tóxico que o fenol dependendo da rota de exposição [4]. A dose letal 50 para exposição oral em ratos de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  é aproximadamente a metade do valor para fenol [4]. O catecol apresenta diversas aplicações dentre as quais pode-se citar sua capacidade anti-séptica, anti-oxidante e antifúngica (plantações de batata), além do seu emprego em fotografia e no desenvolvimento de tinturas de pele [5].

O catecol é também encontrado em alguns produtos vegetais, tais como guaraná, nativo de região amazônica [6], e erva mate [7], comumente consumida na forma de decoctos e infusos. É facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal, o que traz como consequência a manifestação indesejada de diversos distúrbios como vasoconstrição periférica (hipertensão arterial), degeneração dos túbulos renais, diminuição das funções hepáticas, cânceres, doenças neurodegenerativas, dentre outras [8].

Nesse contexto, cabe enfatizar a importância da quantificação de catecol, justificada principalmente pela elevada toxicidade do mesmo. Porém, poucos

trabalhos foram reportados na literatura para sua quantificação em amostras vegetais. Tubino *et al.* [6], apresentam uma comparação entre dois reagentes espectrofotométricos (*p*-aminofenol em meio etanólico alcalino e *m*-aminofenol e metaperiodato de sódio em solução tampão (pH 3,0) para a determinação de catecol em amostras de pó-de-guaraná. Contudo, os autores relatam uma alta interferência da matriz, contornada por meio da técnica de adição de padrão. Kubota *et al.* [9], construíram um sensor voltamétrico usando um eletrodo de carbono vítrio modificado com  $\text{Cu}(\text{fenantrolina})_2(\text{tetracianoquinodimetamida})_2$  para quantificação de catecol em amostras de pó-de-guaraná. Testes de adição e recuperação foram empregados para fins de validação.

Embasado na importância da determinação de catecol, bem como na carência de artigos na literatura com tal finalidade, esse trabalho teve como objetivo propor uma metodologia sensível e seletiva para a determinação de catecol em amostras vegetais. Para tal proposta, foi sintetizado um MIP para catecol, sendo o mesmo avaliado em termos de seletividade e sensibilidade. A detecção foi feita por meio da reação de redução do Mn(VII) a Mn(II) pelo catecol em meio ácido. Destaca-se que tal reação é não específica, sendo a seletividade atribuída basicamente ao MIP.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Instrumentação

O sistema de extração e determinação espectrofotométrica em linha foi composto por uma bomba peristáltica (Ismatec IPC-12, Glattzbrugg, Switzerland) e sete válvulas solenóides 12 VDC/100 PSI (Cole-Parmer Instrument CO, Vernon Hills, USA). Tubos de Teflon<sup>®</sup> de 0,8 mm de diâmetro interno foram usados nas linhas de transmissão e tubos de Tygon<sup>®</sup> e Viton<sup>®</sup> foram usados na propulsão das

soluções. Um espectrofotômetro Femto, modelo 482 (São Paulo, Brasil) equipado com uma célula de fluxo de 1 cm de passo ótico foi empregado como detector e um auto-amostrador como aquele proposto por Figueiredo *et al.* [10]. A aquisição dos sinais bem como o controle das válvulas solenóides foi feito por meio da interface PCL 711 com programação em macro do Visual Basic<sup>®</sup> no Microsoft Excel<sup>®</sup>.

## 2.2. Reagentes e soluções

As vidrarias empregadas neste trabalho foram previamente lavadas com uma solução de HCl 10% (v/v) por 24 h e posteriormente enxaguadas com água ultrapura. As soluções aquosas foram preparadas com reagentes de alta pureza analítica e com água desionizada (> 18,2 MΩ cm) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). O HNO<sub>3</sub> empregado em todas as etapas foi destilado em um destilador sub-ebulição de quartzo (Marconi, Piracicaba, Brasil).

Para a síntese dos polímeros empregou-se catecol como MM, 4-vinilpiridina e ácido metacrílico como MF, etileno glicol dimetacrilato como ALC, 2,2'-azobisisobutironitrila como IR, todos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Os solventes foram clorofórmio HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil), e acetonitrila HPLC (Merck, Darmstadt, Germany).

Uma fase sólida de sílica modificada - C18 (Varian, Harbor City, USA) foi empregada como coluna de limpeza.

A solução estoque de catecol  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada, dissolvendo-se o composto em uma solução aquosa de pH 2,5 (empregando HCl, sem tampão). As soluções padrão variaram de 3,0 a 100 μmol L<sup>-1</sup> e foram preparadas diluindo a solução estoque para as respectivas concentrações com solução aquosa de HCl não tamponada pH 2,5.

A solução de  $\text{KMnO}_4$  (Merck, Darmstad, Germany) 0,010 % (m/v) foi preparada em água e estocada em frasco âmbar.

Para o estudo de seletividade foram empregados três compostos fenólicos com estrutura química semelhante ao catecol. Foram eles: 4-cloro-3-metilfenol, 2-cresol e 2-metoxifenol (todos Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

### 2.3. Síntese do MIP

O MIP para catecol foi sintetizado de acordo com o trabalho de Tarley e Kubota [11] onde as interações entre o catecol e o monômero funcional foram de natureza não-covalente. Para a síntese empregou-se uma ampola de vidro (cilíndrica) com seção transversal circular de diâmetro igual 30 mm e altura de 100 mm. Em uma das extremidades o diâmetro da seção circular diminui para aproximadamente 5 mm com o objetivo de facilitar a vedação no momento da síntese. Nessa ampola foram adicionados 11 mL de acetonitrila, 8,0 mmol de 4-vinilpiridina e 2,0 mmol de catecol. A solução foi então homogeneizada e interações de natureza não-covalente ocorreram entre o MF e o catecol. Posteriormente, adicionou-se 40 mmol de etileno glicol dimetacrilato e 1,5 mmol de 2,2' azobisisobutironitrila. O frasco foi colocado em banho frio ( $<5^\circ\text{C}$ ) e purgado com nitrogênio por 5 min. Essa etapa foi necessária para promover a eliminação de oxigênio uma vez que o mesmo causa problemas devido à formação de radicais prejudiciais à polimerização. Este, pode retardar a polimerização devido à formação de radicais secundários [12,13] ou, também, favorecer a presença de grupos ligantes em posições não complementares ao catecol, e, conseqüentemente, diminuir a seletividade [14]. Terminada a etapa, o frasco foi selado e colocado em um banho-maria a  $60^\circ\text{C}$ . A temperatura favoreceu a reação que se processou por um período de 24 h. Após a completa polimerização, a ampola de síntese foi quebrada e o polímero

triturado mecanicamente empregando um almofariz. Fez-se uma seleção do tamanho das partículas empregando-se uma peneira de 106  $\mu\text{m}$  de malha. A remoção do catecol bem como dos reagentes remanescentes da síntese foi feita empacotando-se 700 mg de MIP e percolando etapas de lavagem de 4 mL de metanol:ácido acético 4:1 (v/v). O eluato foi monitorado por voltametria de pulso diferencial até não mais ser observado sinal analítico inerente ao catecol. Por fim, o polímero foi seco a 60°C e estocado a temperatura ambiente.

Outro polímero a base de ácido metacrílico (polímero metacrílico-MP) foi também sintetizado para ser empregado como coluna de limpeza, objetivando melhorar a seletividade. A síntese deste polímero seguiu o modelo proposto por Tan *et al.* [15]. Assim, 4 mmol de ácido metacrílico, 20 mmol de etileno glicol dimetacrilato e 0,31 mmol de 2,2' azobisisobutironitrila foram dissolvidos em 10 mL de clorofórmio. A ampola (mesmas dimensões daquela empregada anteriormente) foi purgada com nitrogênio por 30 min, selada e colocada em um banho-maria a 60°C por 24 h. Após a polimerização, a ampola foi quebrada, e o polímero foi moído mecanicamente empregando-se um almofariz. Fez-se a seleção do tamanho de partículas ( $\leq 106 \mu\text{m}$ ) e lavou-se o MP (700 mg) empregando-se 4 mL de metanol:ácido acético 4:1 (v/v). Por fim, o MP foi seco a 60°C e estocado a temperatura ambiente.

## 2.4. Amostras

Duas amostras de pó-de-guaraná (*Paullinia cupana*), e uma de chá mate (*Ilex paraguariensis*) foram submetidas a um procedimento de extração alcoólica do catecol de acordo com o trabalho de Carlson e Thompson [16]. Para isso, pesou-se exatamente 0,1600 g de amostra em um béquer de 100 mL e adicionaram-se 60 mL de uma solução de metanol:água 1:5 (v/v). A extração se processou por 20 min a

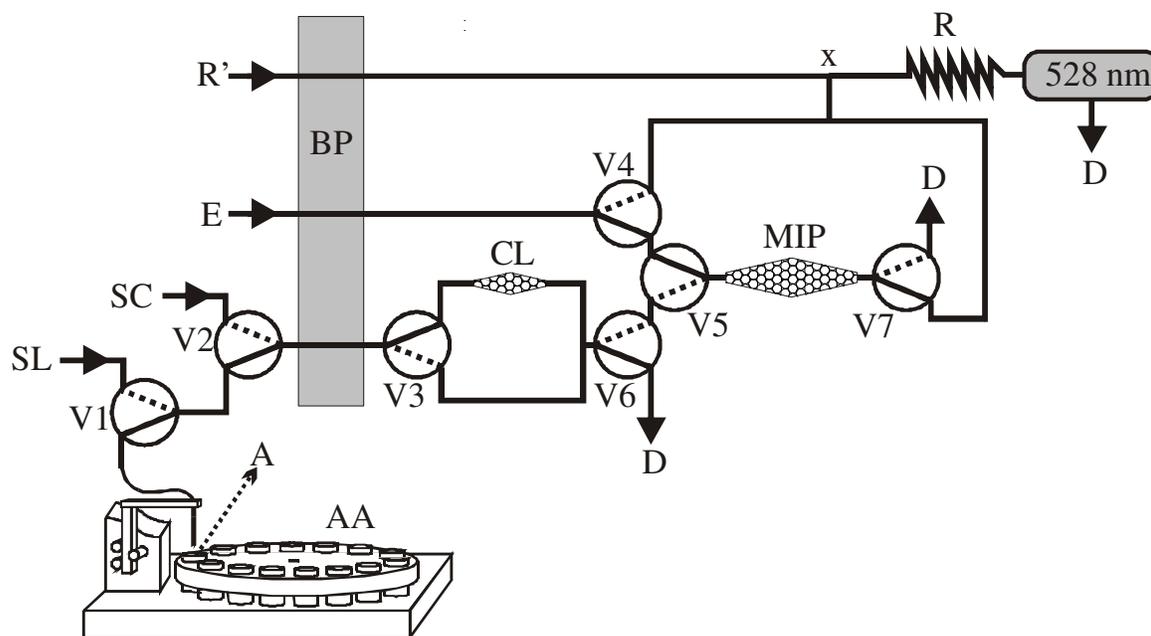
uma temperatura controlada de 80°C. O extrato foi então quantitativamente filtrado e o volume foi completado para 100 mL em uma solução aquosa de HCl não tamponada de pH 2,5. Os extratos de guaraná e mate foram diluídos com água nas proporções de 4:5 e 1:5 (v/v), respectivamente, e o pH foi ajustado para 2,5 com HCl. Uma amostra de água de torneira foi também diluída na proporção de 1:5 (v/v) com ajuste do pH para 2,5 com HCl. Essa diluição foi feita somente com intuito de ajustar o pH.

## **2.5. Sistema de extração e determinação espectrofotométrico usando MIP**

O sistema proposto foi baseado na extração em linha de catecol, usando uma coluna de limpeza, composta de MP + C18 (70 mg), seguida de uma coluna contendo 70 mg de MIP. Posteriormente, somente a coluna de MIP foi lavada com 0,01 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> + 2 % (v/v) de acetonitrila, com a finalidade de eliminar interferentes. Por fim, o catecol foi eluído com HNO<sub>3</sub> 1,0 mol L<sup>-1</sup> e o eluato recebeu uma solução de permanganato de potássio 0,010 % (m/v). Nesse estágio, o catecol promove a redução do Mn(VII) a Mn(II), causando uma descoloração que foi monitorada em 528 nm.

O sistema foi composto de sete válvulas solenóides de três vias, posicionadas de acordo com a Figura C1-1 (posição de eluição). Um ciclo correspondente a uma medida foi dividido em cinco estágios como observado na Tabela C1-1. Segue, abaixo, a seqüência de acontecimentos pertinentes a cada estágio.

Primeiro estágio: a amostra é impulsionada através da coluna de limpeza (CL) e da coluna de MIP. Nesse procedimento, a coluna de limpeza (CL) promove a retenção de alguns interferentes e permite a passagem do catecol que ocupará os sítios seletivos presentes na coluna MIP.



**Figura C1-1:** Sistema de extração e determinação espectrofotométrica empregando MIP, na etapa de eluição (todas as válvulas estão desligadas como visto no estágio 5 da Tabela C1-1). O sistema compreende uma bomba peristáltica (BP), sete válvulas solenóides de três vias (V1-7) e um espectrofotômetro ajustado em 528 nm. R' = solução de  $\text{KMnO}_4$  0,010 % (m/v) a uma vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , E = solução eluente de  $\text{HNO}_3$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  a  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ , A = amostra/padrão a  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , SL = solução de lavagem ( $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  + 2,0 % (v/v) de acetonitrila em água) a  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , SC = solução de condicionamento (acetonitrila 50 % (v/v)) a  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , MIP = coluna com 70 mg de polímero de impressão molecular seletiva a catecol, CL = coluna de limpeza com 70 mg de polímero metacrílico (70 % (m/m)) + C18 (30 % (m/m)), R = Reator de 20 cm, x = ponto de confluência, AA = auto-amostrador e D = descarte. As linhas tracejadas indicam a posição alternativa das válvulas.

Segundo estágio: a solução de lavagem (SL), composta por  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  + 2,0 % de acetonitrila em água, transporta a amostra remanescente do estágio anterior até sua completa passagem através da CL.

Terceiro estágio: a SL é direcionada diretamente para a coluna MIP sem passar através da CL. Nesse estágio, moléculas (que não o catecol) ligadas fracamente ao MIP são eluídas caracterizando uma etapa de eliminação de interferentes.

Quarto estágio: a coluna MIP é inserida no percurso analítico, e o catecol é eluído empregando-se uma solução de  $\text{HNO}_3$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Ao mesmo tempo, a solução de condicionamento (SC), composta de 50 % (v/v) de acetonitrila, é conduzida através da CL, promovendo a eluição dos compostos remanescentes do primeiro estágio.

Quinto estágio: este estágio refere-se àquele apresentado na Figura C1-1, onde todas as válvulas estão desligadas. O catecol continua a ser eluído da coluna MIP e recebe, na confluência x, a solução de  $\text{KMnO}_4$   $0,010 \text{ % (m/v)}$ . No reator R, o catecol promove a redução do Mn(VII) a Mn (II), causando uma descoloração proporcional à concentração de catecol da amostra/padrão. Tal procedimento caracteriza uma determinação indireta. O controle das válvulas bem como o monitoramento do sinal analítico (em tempo real) é conseguido por meio do interfaceamento (PCL 711) entre o microcomputador e o espectrofotômetro. O software foi desenvolvido na linguagem de programação Visual Basic<sup>®</sup> presente em macro no Microsoft Excel<sup>®</sup>.

**Tabela C1-1:** Sequência de trabalho das válvulas solenóides. L = ligada, D = desligada.

Estágio	Válvulas							Tempo/ s
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	
1	D	D	D	L	L	L	L	40
2	L	D	D	L	L	L	L	25
3	L	D	L	L	L	L	L	50
4	D	L	D	D	D	D	D	20
5	D	D	D	D	D	D	D	100

## 2.6. Sistema cromatográfico

As análises por HPLC foram processadas empregando-se um sistema cromatográfico Waters (Milford, USA), composto de um sistema de liberação de solvente modelo 510, um detector de absorvância Tunable modelo 486, um registrador de dados 746 e um injetor Rheodyne 7725 com volume de alça de  $20 \mu\text{L}$ .

Uma coluna LiChrosphere® RP-18 – 125 x 4,6 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Germany) foi empregada na separação. A fase móvel isocrática foi constituída de metanol:tampão fosfato 15:85 (v/v), e a vazão empregada foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A concentração do tampão foi de 0,01 mol L<sup>-1</sup> e o pH foi ajustado para 3,5 com ácido fosfórico. As determinações de catecol por HPLC nas amostras de pó-de-guaraná, chá mate e água de torneira, foram adaptadas da metodologia desenvolvida por Carlson e Thompson [16].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

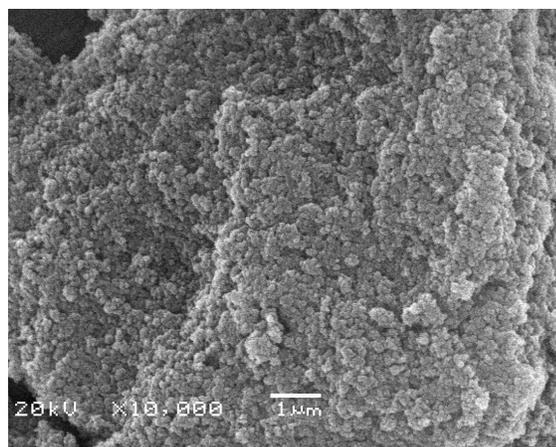
#### 3.1 Caracterização do MIP

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM) as amostras foram depositadas em uma fita adesiva dupla face de carbono fixada em um suporte de amostra de latão. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com ouro até a espessura de 12 nm utilizando-se um metalizador MED 020 da Bal-Tec. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o Jeol LV-JSM 6360 (Japão) operando em voltagem de 15 keV. A Figura C1-2 apresenta as micrografias do MIP e do NIP (do inglês *non-imprinted polymer*) de catecol. Embora uma comparação visual não seja adequada para apresentar conclusões sobre as diferenças entre os polímeros, pode-se observar que o MIP, aparentemente, apresentou uma porosidade maior. A confirmação dessa hipótese advém dos valores de área superficial obtidos pela técnica BET (Brunauer Emmett and Teller) e pelos valores de volume e tamanho dos poros obtidos pela técnica BJH (Barret, Joyner and Halenda) mostrados na Tabela C1-2. Como pode ser visto, o tamanho dos poros é maior no MIP do que no NIP, certamente devido à presença da molécula de catecol quando da síntese do mesmo. Essas medidas de porosimetria de sorção de nitrogênio foram realizadas em

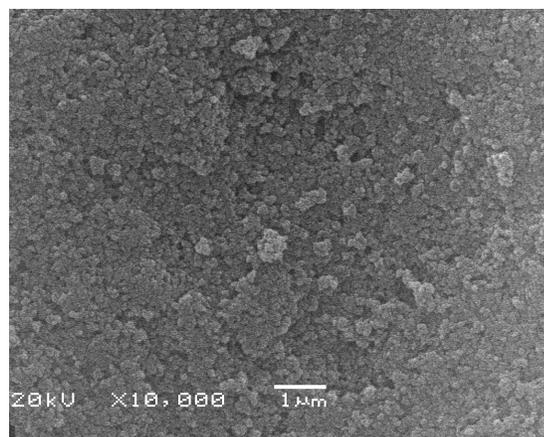
um ASAP 2010 da Micromeritics (EUA). As isotermas de adsorção e dessorção foram medidas a  $-195,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Antes das medidas as amostras foram desgaseificadas a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h sob um vácuo de aproximadamente 15 mPa.

**Tabela C1-2:** Área superficial, volume dos poros e diâmetro médio dos poros no MIP e NIP.

Polímero	Área superficial/ $\text{m}^2\text{g}^{-1}$	Volume médio dos poros/ $\text{mLg}^{-1}$	Diâmetro médio dos poros/ $\text{Å}$
MIP	279,0	0,8	121,6
NIP	294,7	0,9	117,0



(A)



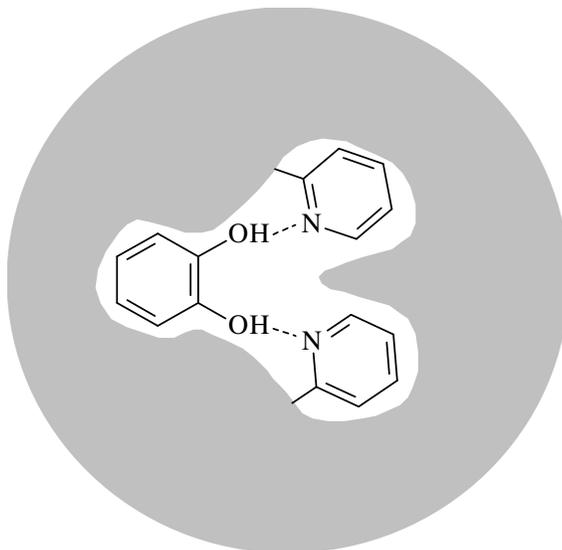
(B)

**Figura C1-2:** Micrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e do NIP (B) com aumento de 10000 vezes.

### 3.2. Otimização das variáveis

Um planejamento fatorial foi feito para avaliar a viabilidade de uma otimização multivariada. Entretanto, verificou-se que várias variáveis experimentais foram significativas, tornando difícil o processo de otimização por esse caminho. Dessa forma a otimização univariada foi empregada. As variáveis físicas e químicas do sistema foram otimizadas sempre empregando 1,3 mL de um padrão de catecol de  $30\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ , preparado em solução aquosa de HCl pH 2,5 sem o emprego de

tampão [11]. Nesse pH, ambas as hidroxilas do catecol não se encontram dissociadas. Assim, possivelmente ocorre a formação de uma ligação de hidrogênio entre cada hidroxila e o nitrogênio piridínico do monômero funcional, como apresentado na Figura C1-3.



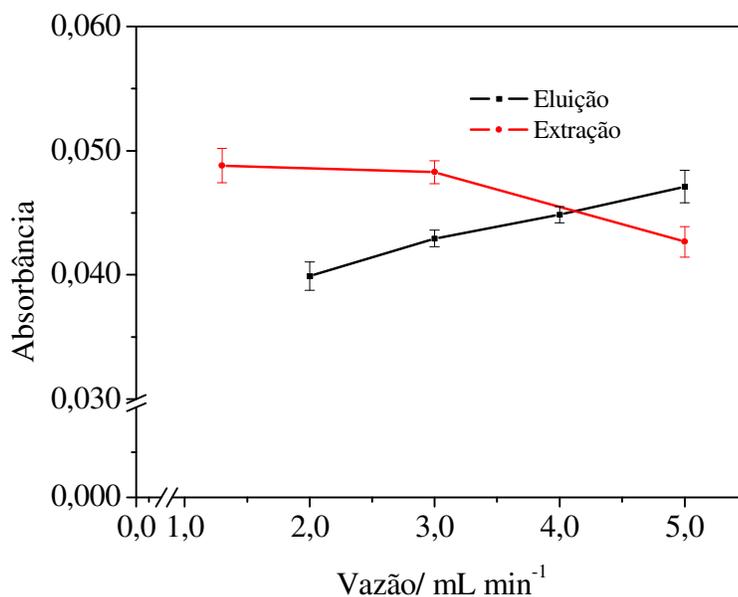
**Figura C1-3:** Esquema da possível interação entre o catecol e o MIP por meio de interações de hidrogênio

### 3.2.1. Vazões de extração

Em sistemas de extração em fase sólida, uma das variáveis de maior importância é a vazão de extração. Tal fato se justifica devido à sua elevada influência na sensibilidade, seletividade e frequência da extração. Assim, o trabalho em altas vazões de extração acarreta melhores frequências analíticas bem como melhores seletividades. Contudo, a sensibilidade é diminuída devido ao tempo de contato restrito entre os sítios de ligação e o analito. Por outro lado, percolar a amostra a baixas vazões propicia ao analito, bem como aos interferentes, um tempo de contato adequado, tendo como consequência os benefícios da melhora na sensibilidade e os prejuízos da diminuição da seletividade [17]. Por fim, cabe

ressaltar a necessidade de um compromisso entre esses fatores (sensibilidade, seletividade e frequência analítica), a fim de atender aos objetivos do trabalho.

A vazão de extração foi variada no intervalo de 1,3 a 5,0 mL min<sup>-1</sup>. A Figura C1-4 apresenta os resultados e, como pode ser visto, a vazão de 5,0 mL min<sup>-1</sup> promoveu um sinal analítico aproximadamente 10% menor do que aqueles obtidos com 1,3 e 3,0 mL min<sup>-1</sup>. Além disso, quando a vazão de 3,0 mL min<sup>-1</sup> foi empregada, alguns interferentes atravessaram coluna de limpeza e foram retidos na coluna MIP. Tal fato foi comprovado pelo aparecimento de sinal analítico quando uma amostra, comprovadamente desprovida de catecol, foi percolada pelo sistema. Dessa forma, mesmo havendo perda em frequência analítica, a vazão de 1,3 mL min<sup>-1</sup> foi selecionada como condição de trabalho.



**Figura C1-4:** Influência das vazões de extração e eluição na resposta analítica. Para o início da otimização empregou-se uma vazão de eluição de 5 mL min<sup>-1</sup>, 90cm de reator, HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> como eluente e KMnO<sub>4</sub> 0,01% (m/v) como reagente espectrofotométrico.

### 3.2.2. Vazão de eluição

A vazão de eluição foi avaliada no intervalo de 2,0 a 5,0 mL min<sup>-1</sup>. Os resultados (Figura C1-4) mostraram que o sinal analítico aumenta (*ca.* 20 %) quando são empregadas vazões mais altas. Isso pode ser justificado pela boa eficiência de eluição o que tem como consequência a diminuição da zona do analito eluído a uma faixa estreita, causando aumento do sinal analítico em detrimento à largura de sua base. Assim, a vazão de 5,0 mL min<sup>-1</sup> foi selecionada como condição de trabalho.

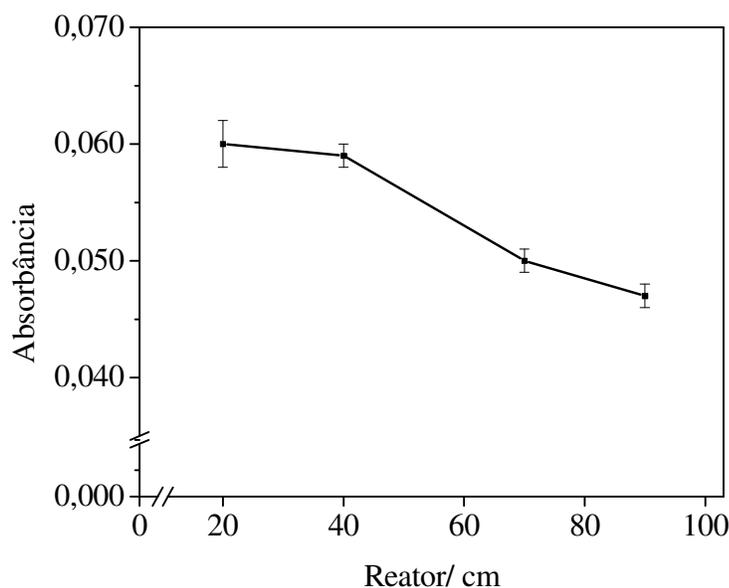
### 3.2.3. Comprimento do reator

A bobina de reação foi empregada para melhorar a mistura entre os reagentes e, ao mesmo tempo, propiciar um rendimento adequado de reações de cinética lenta. Um estudo foi proposto com intuito de avaliar a influência do comprimento do reator na resposta analítica. Assim, variou-se o comprimento do reator de 20 a 90 cm e verificou-se que o sinal analítico diminuiu progressivamente (*ca.* 22 %) com o aumento do comprimento do reator (Figura C1-5). Isso pode ser explicado pela rápida cinética de reação (oxi-redução) entre o catecol e MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>, e pela elevada influência do efeito de dispersão que causa alargamento da base do sinal e a diminuição da altura do mesmo. Portanto, o reator de 20 cm foi selecionado como condição de trabalho.

### 3.2.4. Natureza e concentração do eluente

A literatura reporta a existência de dois processos pelos quais os analitos podem ser eluídos dos MIP. O primeiro deles ocorre por partição e está relacionado à alta afinidade do analito por solventes polares como a acetonitrila e/ou solventes próticos como o metanol [18]. O segundo mecanismo ocorre pela protonação dos grupos ligantes do polímero e do analito, devido à presença de ácidos orgânicos

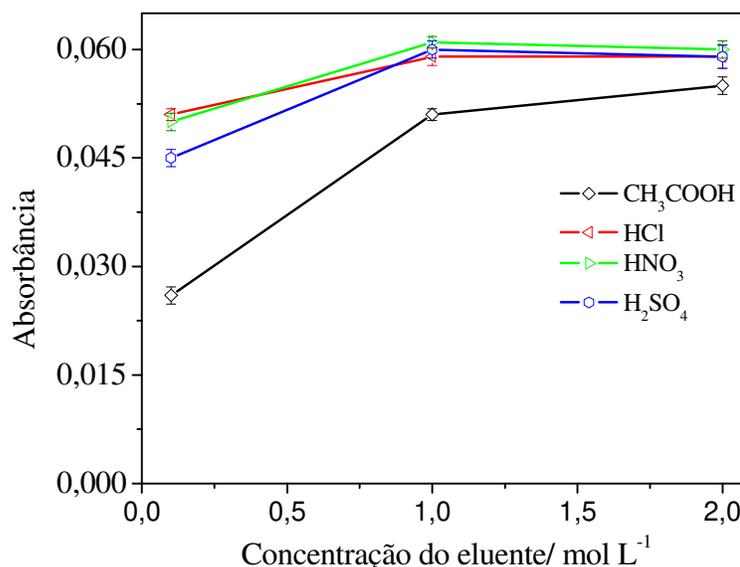
( $C_2H_4O_2$ ) e inorgânicos (HCl,  $HNO_3$ ) [18]. Tarley e Kubota [11] empregaram em seu trabalho uma mistura de metanol:ácido acético 4:1 (v/v) para a eluição do catecol. Essa mesma solução eluente foi avaliada na eluição de catecol, apresentando problema relacionados ao aparecimento de bolhas, incompatíveis com o detector espectrofotométrico. Dessa forma, optou-se em empregar somente soluções ácidas, não alcoólicas, como eluentes. O mecanismo de eluição ácida é explicado pela protonação dos grupos amina e hidroxila presentes no MIP e no catecol, respectivamente, causando uma repulsão eletrostática entre as extremidades com carga positiva e posterior eluição do catecol do sítio de reconhecimento molecular do MIP [19].



**Figura C1-5:** Influência do comprimento do reator na resposta analítica

A otimização do eluente foi feita avaliando-se as respostas analíticas obtidas com o emprego de um ácido orgânico ( $CH_3COOH$ ) e três ácidos inorgânicos ( $HNO_3$ , HCl, e  $H_2SO_4$ ), em três níveis distintos de concentração (0,1, 1,0 e 2,0 mol  $L^{-1}$ ). Como pode ser visto na Figura C1-6,  $CH_3COOH$  foi que apresentou piores resultados em termos de sensibilidade, talvez pela baixa constante de dissociação do

mesmo. HCl, HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, apresentaram sinais analíticos semelhantes para concentrações de 1,0 e 2,0 mol L<sup>-1</sup>. Dessa forma, HNO<sub>3</sub> 1,0 mol L<sup>-1</sup> foi selecionado para futuros experimentos devido à impossibilidade de precipitação de sais (sais de nitrato são solúveis), bem como pela maior facilidade de purificação.

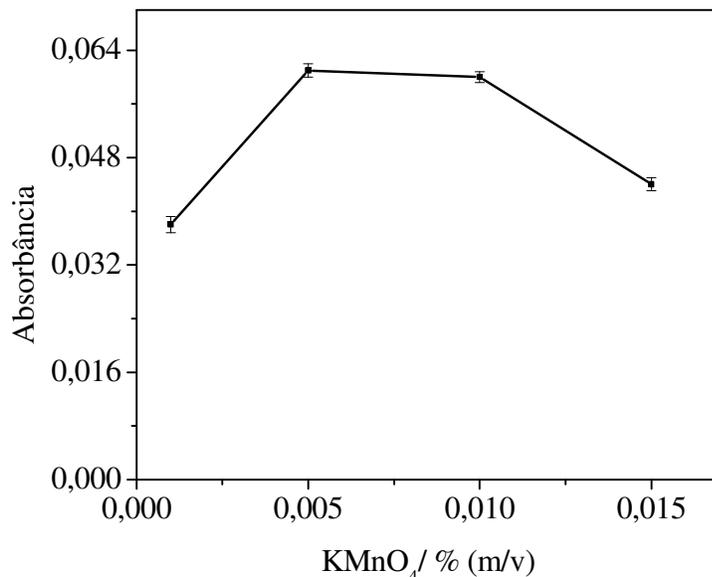


**Figura C1-6:** Influência da natureza e concentração dos ácidos do eluente na resposta analítica.

### 3.2.5. Concentração de KMnO<sub>4</sub>

A concentração de KMnO<sub>4</sub> foi avaliada na faixa de 0,001 a 0,015 % (m/v), e os resultados são apresentados na Figura C1-7. Como pode ser visto, o menor sinal analítico foi obtido na concentração de 0,001 % (m/v) (absorbância de 0,038), talvez porque essa concentração de KMnO<sub>4</sub> não seja suficiente para reagir com o catecol proveniente do padrão de 30 μmol L<sup>-1</sup>. Nas concentrações de 0,005 e 0,010 % (m/v) o sinal analítico aumentou e se manteve estável (*ca.* 0,038). Porém, aumentando-se a concentração para 0,015 % (m/v), percebeu-se uma diminuição considerável do sinal analítico (*ca.* 40 %), possivelmente decorrente de um mascaramento do sinal devido

à alta concentração de  $\text{KMnO}_4$ . Por fim, a concentração de trabalho de  $\text{KMnO}_4$  foi selecionada para 0,010 % (m/v).



**Figura C1-7:** Influência da concentração de  $\text{KMnO}_4$  na resposta analítica.

### 3.2.6. Coluna de limpeza (CL)

Em consequência da complexidade das amostras (guaraná e mate), foi necessário empregar uma coluna de limpeza antecedendo a coluna MIP, com intuito de reter alguns interferentes tais como macromoléculas, compostos redutores, dentre outros, presentes nestas amostras. A referida coluna (70 mg) foi composta por uma mistura de 70 % (em massa) de um polímero metacrílico (MP) e 30 % (em massa) de C18. O MP foi sintetizado empregando-se ácido metacrílico devido à presença de grupamentos carboxílicos oriundos deste monômero. Esses grupamentos, favoreceram a retenção de compostos de natureza básica (que não o catecol), que possivelmente poderiam acarretar interferências na retenção do catecol pelo MIP, bem como na reação espectrofotométrica. Dessa forma, ao ser percolada pela coluna de MP, a amostra perde alguns interferentes, contribuindo para o ganho em seletividade. Por outro lado, a CL não pode reter o catecol, sendo que o mesmo

(catecol) atravessa por completo a CL e é retido somente nos sítios de reconhecimento presentes na coluna MIP.

A coluna de limpeza foi inicialmente avaliada após seu preenchimento com 100 % de MP (70 mg). Contudo, os sinais analíticos obtidos para amostras reais (mate e guaraná) apresentaram baixa reprodutibilidade, bem como dificuldade de retorno à linha base. Isso pode ser explicado pela ineficiência de retenção de interferentes. Dessa forma, possivelmente alguns compostos cromóforos e macromoléculas conseguiram atravessar a CL e se ligaram à coluna MIP. No momento da eluição, esses compostos são lentamente eluídos (usando  $\text{HNO}_3$ ) da coluna, causando efeito de memória e sinais com longas caudas. Da mesma forma, também foi avaliada uma CL com 100 % de C18 (70 mg). Nesse caso, o catecol, bem como os interferentes, foram fortemente retidos pela CL, resultando na quase completa eliminação do sinal analítico para um padrão de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

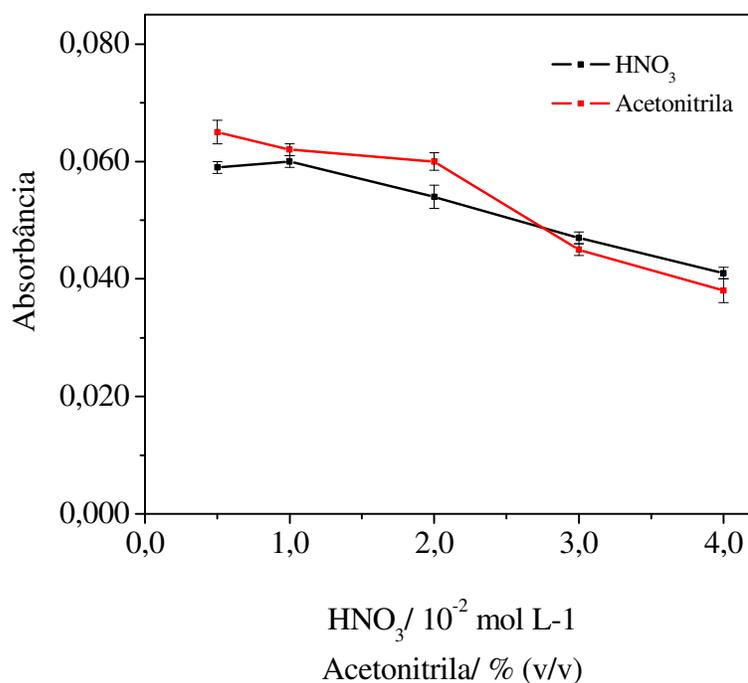
Baseando-se em um compromisso entre seletividade e sensibilidade analítica, foi proposta uma associação entre MP e C18 na CL. Para tal, observou-se que a proporção de 70 % (em massa) de MP + 30 % (em massa) de C18, propiciaram seletividade e sensibilidade adequadas. Dessa forma, os sinais analíticos para as amostras foram precisos, e alcançaram rapidamente a linha base, caracterizando a ausência de cromóforos e macromoléculas.

### 3.2.7. Solução de lavagem

Somente a CL não foi suficiente para promover a completa eliminação dos interferentes. Isso foi comprovado determinando a concentração de catecol em amostras de pó-de-guaraná e mate. As concentrações foram estatisticamente diferentes (maiores) das reais (obtidas por HPLC), o que denotou a presença indesejada de concomitantes. Uma alternativa foi associar ao sistema uma solução

de lavagem que tem por finalidade eluir possíveis concomitantes retidos na coluna MIP por ligações fracas. Para tal avaliação, deve-se inicialmente enfatizar que em um procedimento de extração em fase sólida, alguns concomitantes se ligam ao MIP mais fracamente que o analito, e outros concomitantes se ligam ao MIP mais fortemente que o analito. Dessa forma, a melhora em seletividade poderia ser obtida empregando-se uma solução de lavagem capaz de eliminar (eluir) os interferentes que se ligam mais fracamente, sem eluir o analito. Por outro lado, é também importante empregar um eluente capaz de eluir os analitos, sem eluir àqueles concomitantes que se ligam mais fortemente ao MIP.

Nesse trabalho foi usada uma solução padrão de catecol de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a otimização da solução de lavagem. O objetivo era definir qual a maior concentração dessa solução (em termos de solvente, ou acidez), que poderia ser empregada sem que houvesse eluição do catecol. Para isso, variou-se inicialmente a concentração de acetonitrila de 0,5 a 4,0% (v/v) em água (Figura C1-8). As concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 % (v/v) não promoveram diminuição significativa no sinal analítico (< 5 %). Assim, a concentração de 2,0 % (v/v) foi selecionada como condição de trabalho. Posteriormente, a fração de água anteriormente usada na diluição da acetonitrila foi substituída por uma solução de  $\text{HNO}_3$ . Esta solução foi estudada na faixa de 0,005 a 0,04  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  e, como pode ser visto, as concentrações de 0,005 e 0,010  $\text{mol L}^{-1}$  não promoveram nenhuma eluição do catecol. Porém, concentrações  $\text{HNO}_3$  maiores que 0,010  $\text{mol L}^{-1}$  causaram uma progressiva diminuição no sinal analítico indicando a perda do catecol na etapa de lavagem. Assim, a concentração de  $\text{HNO}_3$  de 0,010  $\text{mol L}^{-1}$  foi selecionada para futuros experimentos.



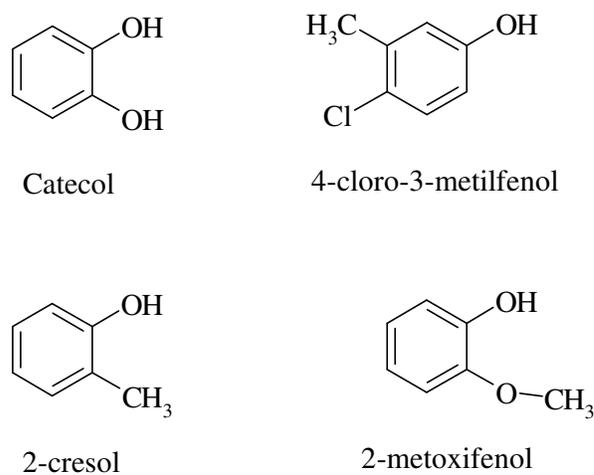
**Figura C1-8:** Influência da concentração de HNO<sub>3</sub> e acetonitrila como constuintes da solução de lavagem.

### 3.3. Estudo dos concomitantes

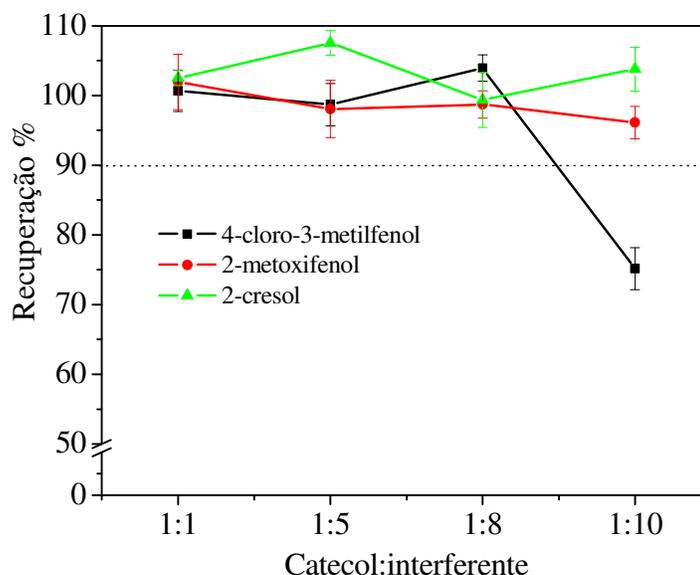
A alta seletividade do MIP é atribuída à sua estrutura tridimensional e à adequada distribuição dos monômeros funcionais em posições estratégicas ao redor da MM [20]. Assim, torna-se necessário efetuar estudos que avaliem a retenção (no MIP) de moléculas estruturalmente semelhantes à MM, com o objetivo de assegurar a efetiva seletividade do sítio específico de reconhecimento. Esses concomitantes, podem se ligar ao MIP por ligações mais fracas, sendo uma etapa de lavagem normalmente requerida para a eluição dos mesmos, sem promover a eluição do analito [21].

Para o estudo, empregaram-se três moléculas com estrutura química semelhante ao catecol, como mostrado na Figura C1-9. Ressalta-se que essas moléculas podem competir pelo sítio de reconhecimento do MIP causando baixa

eficiência de retenção do analito, além de promoverem a redução do Mn(VII) a Mn(II) (devido à presença do grupo hidroxila) e, conseqüentemente, gerar uma interferência positiva no sinal analítico. O estudo foi feito individualmente, adicionando concentrações crescentes de interferente (30, 150, 240 e 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) a uma solução padrão de catecol de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As proporções de catecol:concomitante foram 1:1, 1:5, 1:8 e 1:10, respectivamente. Adotou-se que recuperações compreendidas entre 90 a 110 % indicam a não interferência dos compostos. Os resultados são apresentados na Figura C1-10, e como pode ser visto, somente o 4-cloro-3-metilfenol apresentou interferência negativa na proporção de 1:10. Isso pode ser explicado pela competição entre o 4-cloro-3-metilfenol e o catecol pelos sítios de ligação, resultando numa menor retenção de catecol. As outras moléculas (2-cresol e 2-metoxifenol) possivelmente não se ligaram ao sítio específico do catecol, devido ao impedimento estérico causado, provavelmente, pelos grandes grupos metil e metoxi presente nas mesmas.



**Figura C1-9:** Estrutura química do catecol e de três moléculas estruturalmente semelhantes.

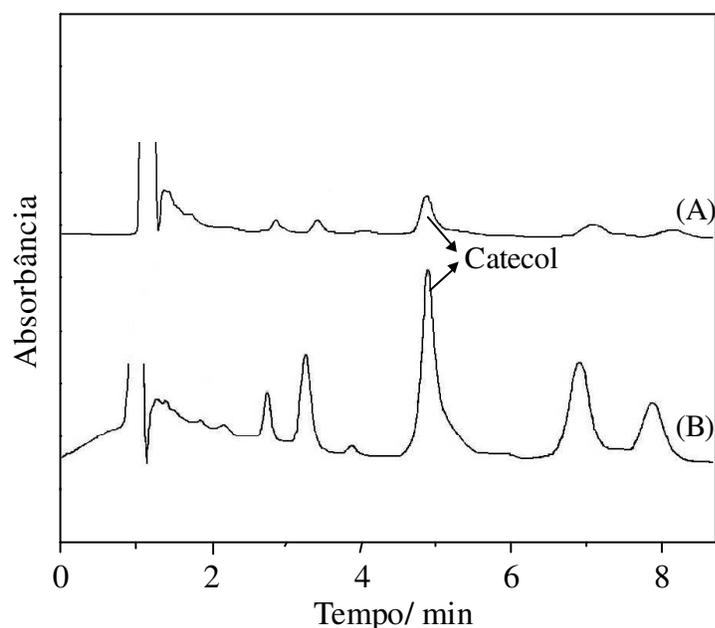


**Figura C1-10:** Estudo da seletividade na determinação de catecol empregando os concomitantes 4-cloro-3-metilfenol, 2-metoxifenol e 2-cresol (n = 3).

Uma amostra de chá mate foi também empregada para verificar a eficiência de eliminação de concomitantes. Para isso, a amostra foi diluída na proporção de 1:5 (v/v), e fortificada com  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de solução padrão de catecol. Em seguida, ela foi percolada pelo sistema, e o eluato foi coletado antes de receber a solução de permanganato (antes do ponto de confluência x, na Figura C1-1). Outra amostra foi também preparada como a anterior, porém, sem ser percolada pelo sistema. Por fim, ambas as amostras foram injetadas em um equipamento de HPLC equipado com detector UV operando a 272 nm [16]. A faixa analítica do método foi de 2,5 a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o limite de quantificação foi de  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O coeficiente de correlação foi maior que 0,998 e as precisões inter e intra-ensaios foram menores que 11% para todos os pontos da curva.

Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura C1-11. Como pode ser visto, houve uma perda em sensibilidade explicada pela retenção de parte do catecol pela CL e também pela eliminação de parte do mesmo (catecol) durante a etapa de lavagem (usando acetonitrila e  $\text{HNO}_3$ ). Por outro lado, verificou-se que a relação

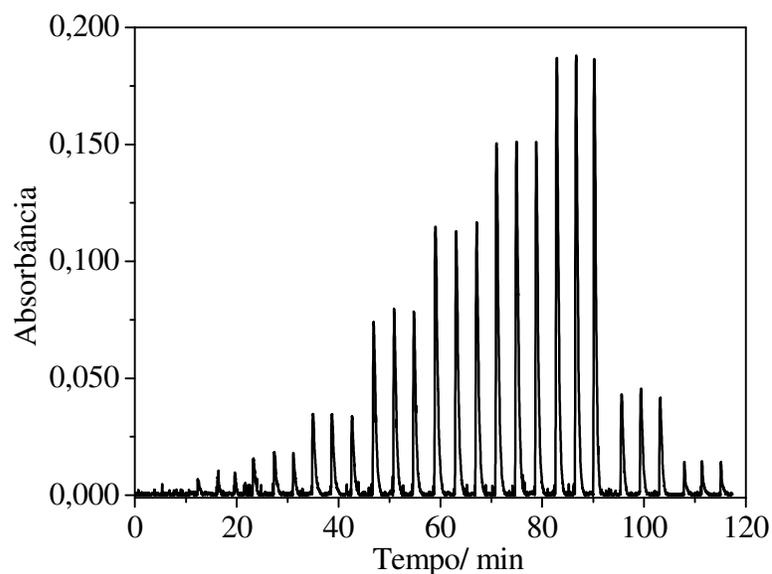
área do pico de catecol/área dos demais picos foi *ca.* 10% maior no cromatograma A. Embora esse valor seja considerado pequeno, o emprego da coluna de limpeza e da solução de lavagem é justificado pela eliminação de substâncias indesejáveis que possivelmente interferem na reação com o permanganato. Esse fato foi comprovado quando um extrato de erva mate foi analisado pelo sistema proposto na ausência da coluna de limpeza e também da solução de lavagem. Nessa situação, os resultados obtidos para catecol foram maiores do que aqueles obtidos por HPLC, comprovando a presença de substâncias que também reagem com o permanganato, aumentando o sinal analítico. Finalmente, esses possíveis interferentes não apareceram nos cromatogramas, talvez por possuírem alta polaridade (na referida fase móvel), sendo os mesmos eluídos rapidamente, e com tempos de retenção próximos ao volume morto.



**Figura C1-11:** Cromatogramas de duas amostras de chá mate fortificadas com  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de catecol, com (A) e sem (B) a passagem pelo sistema proposto.

### 3.4. Figuras de mérito

A curva analítica foi construída na faixa de concentrações de 3,0 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , obtendo-se um coeficiente de correlação maior que 0,999 para medidas em triplicata de sete níveis de concentração. A Figura C1-12 apresenta os sinais analíticos para os padrões na faixa analítica, bem como para duas amostras reais (guaraná e mate), respectivamente. É importante destacar que, embora o método seja baseado em uma descolorimetria (sinais descendentes), a Figura C1-12 foi apresentada como tal (sinais ascendentes) para facilitar a interpretação dos resultados. Tal estratégia foi conseguida multiplicando-se todos os dados da ordenada por (-1). Os limites de detecção ( $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e quantificação ( $2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC [22]. A precisão, expressa como desvio padrão relativo (DPR), foi de 3,0 % ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $n = 10$ ) e a frequência analítica foi de  $15 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura C1-12:** Sinais analíticos (em triplicata) do branco analítico, de padrões de catecol de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , de uma amostra de pó-de-guaraná adicionada de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de catecol e uma amostra de chá mate (sem adição), respectivamente.

### 3.5. Aplicações

O método foi aplicado na determinação de catecol em amostras de pó-de-guaraná, chá mate e água de torneira. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com aqueles obtidos com um método cromatográfico adaptado da literatura [16]. Como pode ser visto na Tabela C1-3, todas as amostras foram fortificadas com 10 e 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de catecol, e as recuperações obtidas variaram de 91 a 110 %. Da mesma forma, os resultados oriundos do método proposto e do método de comparação (HPLC), não diferiram estatisticamente ao nível de 95% segundo o teste *t*.

**Tabela C1-3:** Determinação de catecol em amostras de guaraná, mate e água de torneira pelo sistema proposto e por HPLC; n = 3. MP: método proposto.

Amostra	Adição/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	MP/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação/ %	HPLC/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Concentração na amostra (MP)/ $\text{mg g}^{-1}$
Guaraná	0	< LQ <sup>1</sup>	-	< LQ <sup>2</sup>	
	10	10,5 ± 0,5	105	10,4 ± 0,5	< LQ <sup>3</sup>
	20	20,6 ± 0,6	103	21,3 ± 0,2	
B	0	2,8 ± 0,4	-	< LQ	
	10	11,9 ± 0,2	91	12,0 ± 0,1	0,24 ± 0,03
	20	23,2 ± 0,4	102	24,0 ± 0,3	
Mate	0	7,7 ± 0,5	-	7,4 ± 0,2	
	10	18,9 ± 0,2	112	17,0 ± 0,1	2,6 ± 0,2
	20	29,5 ± 0,4	109	27,4 ± 0,2	
Água de torneira	0	< LQ <sup>1</sup>	-	< LQ <sup>1</sup>	
	10	9,5 ± 0,4	95	10,3 ± 0,8	< LQ <sup>1</sup>
	20	19,6 ± 0,2	98	20,0 ± 0,6	

<sup>1</sup>LQ = 2,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , <sup>2</sup>LQ = 4,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e <sup>3</sup>LQ = 0,17  $\mu\text{mol L}^{-1}$

## 4. CONCLUSÕES

A quantificação de compostos em amostras complexas torna-se extremamente complicada quando não se empregam métodos cromatográficos. Assim, pode-se enfatizar que a tecnologia de impressão molecular apresenta-se como uma elegante alternativa, decorrente principalmente, de características relevantes como alta seletividade e robustez, bem como a facilidade de obtenção e o baixo custo. Nesse contexto, foi possível quantificar catecol em amostras vegetais empregando-se uma reação não específica (redução de Mn(VII) a Mn(II) por catecol). É importante também ressaltar que o emprego MP como coluna de limpeza foi reportado pela primeira vez. Essa estratégia aumentou consideravelmente a seletividade do método, permitindo a obtenção de resultados estatisticamente exatos em comparação a um método cromatográfico. O aumento da seletividade (com o emprego de MP) foi conseguido adotando um monômero funcional (para a síntese do MP) com sítios de ligação de natureza oposta (ácido metacrílico - monômero ácido) do que aquele empregado na síntese do MIP (4-vinilpiridina - monômero básico).

O método proposto apresentou boas figuras de mérito e a avaliação dos concomitantes comprovou que moléculas com estrutura semelhante ao catecol não apresentaram retenção significativa no MIP. Isso permitiu a análise de catecol em amostras complexas (guaraná e mate), com exatidão dos resultados obtidos, reafirmando assim, a proposta inicial desta Tese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Abdullah, M. Ahmad, L. Y. Heng, N. Karuppiah, H. Sidek, Stacked films immobilization of MBTH in nafion/sol-gel silicate and horseradish peroxidase

- in chitosan for the determination of phenolic compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1285.
- [2] W. Zhang, N.D. Danielson, Determination of phenols by flow injection and liquid chromatography with on-line quinine-sensitized photo-oxidation and quenched luminol chemiluminescence detection *Anal. Chim. Acta* 493 (2003) 167.
- [3] G.C. Jagetia, R. Aruna, Hydroquinone increases the frequency of micronuclei in a dose-dependent manner in mouse bone marrow *Toxicol. Lett.* 93 (1997) 205.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention – USA, <<http://www.cdc.gov/mill1.sjlibrary.org/niosh/pel88/120-80.html>>, Acessado em 04 de janeiro de 2007.
- [5] B. Bukowska, S. Kowalska, Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes, *Toxicol. Lett.* 152 (2004) 73.
- [6] A. Magna, A.A. Salomão, M.D.C. Vila, M. Tubino, Comparative Study of Two Spectrophotometric Reagents for Catechol Analysis in Guaraná Seeds Powder, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 129.
- [7] P. Mazzafera, Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake, *Food chemistry* 60 (1997) 67.
- [8] R.D. Irons, Quinones as toxic metabolites of benzene, *J. Toxicol. Environ. Health* 16 (1985) 673.
- [9] R. D. C. Silva Luz, F. S. Damos, A. B. de Oliveira, J. Beck, L. T. Kubota, Development of a voltammetric sensor for catechol in nanomolar levels using a modified electrode with Cu(phen)(2)(TCNQ)(2) and PLL, *Sens. Actuators B* 117 (2006) 274.
- [10] E. C. Figueiredo, L. R. Souza, C. S. Magalhães, C. Wisniewski, P. O. Luccas, A homemade autosampler/injector commutator for flow injection analysis, *J. Autom. Methods Manag. Chem.* 2006 (2006) 1.
- [11] C. R. T. Tarley, L. T. Kubota, Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry, *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 11.
- [12] P. A. G. Cormack, A. Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 173.
- [13] C. R. T. Tarley, M. D. T. Sotomayor, L. T. Kubota, Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação, *Quim. Nova* 28 (2005) 1076.
- [14] B. Sellergren, A. J. Hall, Fundamental aspects on the synthesis and characterisation of imprinted network polymers, In: B, Sellergren (Ed), *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their*

- applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2001, p. 557.
- [15] Y. Tan, J. Yin, C. Liang, H. Peng, L. Nie, S. Yao, A study of a new TSM biomimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its application for the determination of nicotine in human serum and urine, *Bioelectrochemistry* 53 (2001) 141.
- [16] M. Carlson, R. Thompson, Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná *J. AOAC Int.* 81 (1998) 691.
- [17] M.L. Mena, L. Agüí, P. Martínez-Ruiz, P. Yáñez-Sedeño, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Molecularly imprinted polymers for on-line clean up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 18.
- [18] A. Martín-Esteban, Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 795.
- [19] M.L. Mena, P. Martínez-Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Molecularly imprinted polymers for on-line preconcentration by solid phase extraction of pirimicarb in water samples, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 297.
- [20] M. Zougagh, A. Ríos, M. Valcárcel, Automatic selective determination of caffeine in coffee and tea samples by using a supported liquid membrane-modified piezoelectric flow sensor with molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 117.
- [21] B.S. Vicente, F.N. Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, Continuous solid-phase extraction and preconcentration of bisphenol A in aqueous samples using molecularly imprinted columns *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 115.
- [22] Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, *Analyst* 112 (1987) 199.

## *Capítulo 2*

# **EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE NICOTINA EM URINA EMPREGANDO POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP) E ESPECTROFOTOMETRIA**

## 1. INTRODUÇÃO

O tabagismo pode ser considerado como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, pela forte ligação com a manifestação das mais diversas moléstias que assolam a população [1]. A organização mundial de saúde (OMS) estima que o número de óbitos atribuídos ao tabaco chegou a 4 milhões em 2003, o que representa a vasta fatia de 8% das causas de morte no mundo [1]. No Brasil, estimativas indicaram aproximadamente 200.000 mortes no ano de 2002 [2]. A exposição ativa ou passiva ao tabaco aumenta consideravelmente o risco de mortes prematuras e limitações físicas por doença coronariana, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, bronquite, enfisema e câncer [3]. Entre os tipos de câncer relacionados ao uso do tabaco incluem-se os de pulmão, boca, laringe, faringe, esôfago, estômago, fígado, pâncreas, bexiga, rim e colo de útero [4].

Dentre os diversos alcalóides encontrados no tabaco, a nicotina é a principal responsável pelos efeitos prejudiciais acarretados aos fumantes. Sua concentração na planta (*ca.* 5% da massa de planta [5]) é estimada como aproximadamente 90 % da fração total de alcalóides [6]. Em um cigarro, ela pode variar de 7 a 24 mg [7] e sua dose letal em humanos encontra-se entre 40 e 60 mg [1]. Na fumaça do cigarro, a nicotina encontra-se na forma não protonada (pH de 5,5), sendo bem absorvida (20 a 25% da quantidade presente no cigarro) pelos alvéolos pulmonares, e por isso alcança rapidamente o pico de concentração plasmática [1]. Após sua absorção, ela se liga pouco às proteínas plasmáticas (< 5%), sendo rapidamente distribuída aos órgãos e tecidos do organismo, bem como atravessando a barreira placentária e hematoencefálica [8]. O metabolismo da nicotina é rápido e complexo, com a existência de pelo menos 18 metabólitos já descritos, sendo que a maioria dos estudos enfoca basicamente a cotinina como aquele de caráter mais relevante [9]. Biotransformada, basicamente por uma reação de C-oxidação (catalisada por

enzimas do complexo citocromo P450<sup>1</sup>), a cotinina apresenta uma meia via em torno de 20 horas, o que justifica sua utilização como biomarcador da exposição à nicotina.

A farmacodinâmica da nicotina foi bem detalhada a partir do trabalho de Mcgehee *et al.* [10], onde foi elucidado, pela primeira vez, a existência de receptores nicotínicos, presentes no sistema nervoso central e em fibras pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo. Esse receptor é rotineiramente ocupado pela acetilcolina (substância endógena), porém, pode também ser ocupado, preferencialmente, pela nicotina. A ligação da nicotina ao receptor nicotínico causa um efeito estimulante, seguido de um efeito depressor do sistema nervoso central. Assim, todas as manifestações imprevisíveis decorrentes da intoxicação por nicotina, se devem, não somente às suas ações em vários locais quimiosensíveis, mas, também, ao fato de que o alcalóide pode estimular e deprimir o sistema nervoso central [5]. Outro fator importante é o aumento significativo do número de receptores nicotínicos em fumantes crônicos, o que leva à tolerância à nicotina [5].

Baseado nos efeitos tóxicos oriundos da exposição à nicotina, diversos trabalhos foram propostos com intuito de quantificar esse composto em amostras biológicas, tais como sangue [11,12], urina [6,13], saliva [14], cabelo [15], dentre outras. Contudo, na maioria dos casos, essas análises têm sido feitas após separações cromatográficas, o que acarreta aumento nos custos, morosidade nas determinações, além elevar consideravelmente o tempo de análise. Nesse contexto, metodologias alternativas que propiciem a precisa e exata quantificação de nicotina são rotineiramente necessárias, principalmente para fins toxicológicos.

As determinações espectrofotométricas, com algumas exceções, não apresentam seletividade suficiente para a análise de toxicantes e metabólitos em

---

<sup>1</sup> Complexo enzimático hepático responsável pela maioria das reações de biotransformação.

amostras biológicas. Essa deficiência pode ser suprimida empregando-se sorventes altamente seletivos como os MIP. Esses materiais têm como principal característica sua capacidade de seqüestrar moléculas específicas, complementares ao sítio seletivo de reconhecimento. Assim, torna-se extremamente atraente a associação de MIP em reações espectrofotométricas não específicas, aproveitando as características relevantes em termos de seletividade dos MIP e a simplicidade sempre marcante nas determinações espectrofotométricas. Dessa forma, este capítulo tem como objetivo, avaliar as potencialidades de um sistema em linha de extração empregando MIP e determinação espectrofotométrica de nicotina em amostras de urina de fumantes. A reação empregada será a redução do Mn(VII) a Mn(VI) pela nicotina em meio básico, e o comprimento de onda monitorado será de 610 nm, correspondente ao Mn(VI) formado.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Instrumentação

O sistema de extração e determinação espectrofotométrica em linha de nicotina foi composto por uma bomba peristáltica (Ismatec IPC-12, Glattzbrugg, Suíça), sete válvulas solenóides 12 VDC/100 PSI (Cole-Parmer Instrument CO, Vernon Hills, EUA), um auto-amostrador como àquele proposto por Figueiredo *et al.* [16] e um banho-maria para o sistema em fluxo.

O banho-maria foi construído no próprio laboratório e empregou um circuito integrado LM135 (sensor de temperatura), que foi aterrado e alimentado com uma tensão de +5V. O sinal fornecido pela base foi direcionado para uma entrada analógica da interface PCL711, e a temperatura real do banho foi calculada de acordo com a equação  $\theta = P/10$  (para  $10 \leq \theta \leq 80^\circ\text{C}$ ) onde  $\theta$  é a temperatura em  $^\circ\text{C}$  e

P é o potencial em mV. Para o aquecimento, empregou-se parte de uma resistência de chuveiro (níquel-crômio) de 2,5  $\Omega$  e uma fonte de tensão de 12 V (cc). Um relê, acionado por uma saída digital da PCL 711, foi utilizado para ligar a resistência. Inicialmente, a temperatura real é medida pelo sensor e enviada ao computador. Se esta temperatura estiver abaixo do valor estipulado, o computador envia um sinal para o sistema (via PCL 711) e aciona a resistência. Quando a temperatura atinge o valor estipulado, a resistência é desligada.

Para as linhas de transmissão foram empregados tubos de Teflon<sup>®</sup> de 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a propulsão dos fluidos conduzida por tubos Tygon<sup>®</sup>. Como detector, foi empregado um espectrofotômetro Femto, modelo 482 (São Paulo, Brasil) equipado com uma célula de fluxo de 1 cm de passo óptico. O controle das válvulas, do auto-amostrador e do banho termostaticado, bem como as aquisições dos sinais foram feitos por meio da interface PCL 711 com programação em macro do Visual Basic<sup>®</sup> no Microsoft Excel<sup>®</sup>.

Para avaliação da exatidão, empregou-se um HPLC Shimadzu série LC-10 com injetor automático, equipado com coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m de partícula), pré coluna C18 (4 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m de partícula) e detector de UV em 230 nm.

## 2.2. Reagentes e soluções

As soluções aquosas foram preparadas com reagentes de alta pureza analítica e com água ultrapura (>18,2 M $\Omega$  cm) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). O HNO<sub>3</sub> empregado em todas as etapas foi sub destilado em um destilador de quartzo (Marconi, Piracicaba, Brasil). Todas as vidrarias foram lavadas com uma solução de HCl 10% (v/v) por 24 h e posteriormente enxaguadas com água ultrapura.

Para a síntese do MIP, empregou-se a nicotina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como molécula modelo, o ácido metacrílico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como monômero funcional, o etileno glicol dimetacrilato (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como agente de ligação cruzada, a 2,2'-azobisisobutironitrila (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como iniciador da reação e o clorofórmio (grau HPLC Tedia, Rio de Janeiro, Brasil) como solvente.

A solução estoque de nicotina  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foi preparada pela diluição aquosa da solução comercial de nicotina ( $5,91 \text{ mol L}^{-1}$ ). As soluções padrão foram preparadas diluindo-se a solução estoque com água, para as respectivas concentrações.

A solução de  $\text{KMnO}_4$  (Merck, Darmstad, Alemanha)  $0,020 \%$  (m/v) foi preparada em água e estocada em frasco âmbar e a solução de  $\text{NaOH}$   $10 \%$  (m/v) foi preparada dissolvendo-se a massa apropriada da base em água.

Para o estudo de seletividade empregou-se soluções aquosas de cotinina, anabasina, nornicotina e cafeína (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

A solução de condicionamento do MIP foi preparada adicionando-se a 50 mL de acetonitrila (Merck, Darmstad, Alemanha), 3,6 mL de  $\text{HNO}_3$  conc. (Merck, Darmstad, Alemanha) e ajustando o volume com água para 100 mL.

A solução de lavagem 1 foi preparada misturando-se 20 mL de acetonitrila e 80 mL de  $\text{NaOH}$  (Merck, Darmstad, Alemanha) pH 11,4. Por fim, uma solução de  $\text{HNO}_3$  pH 2,5 foi empregada como solução de lavagem 2.

### 2.3. Síntese do MIP

A síntese do MIP foi conduzida de acordo com trabalho de Tan *et al.* [17] sendo as interações entre o MF e a MM de natureza não-covalente. Em uma ampola de síntese (como aquela descrita no item 2.3 do Capítulo 1) foram adicionados 10

mL de clorofórmio, 1 mmol de nicotina e 4 mmol de ácido metacrílico. A solução foi homogeneizada e ocorreram interações de natureza não-covalente entre o monômero funcional e a nicotina. Posteriormente, adicionou-se 20 mmol de etileno glicol dimetacrilato e 0,3 mmol de 2,2' azobisisobutironitrila. A solução foi, então, homogeneizada e purgada com nitrogênio por 30 min. Essa etapa foi necessária para eliminar o oxigênio, uma vez que o mesmo causa problemas devido à formação de radicais prejudiciais à síntese. Este pode retardar a polimerização devido à formação de radicais secundários [18,19] ou também favorecer a presença de grupos ligantes em posições não complementares à nicotina, e, conseqüentemente, diminuir a seletividade [20]. A ampola de síntese foi acoplada em um banho-maria a 60°C por 24 horas, tempo necessário para a completa polimerização. Após a síntese, a ampola foi quebrada e o polímero foi pulverizado (empregando-se um almofariz) até tamanho de partícula menor que 150 µm. A nicotina, bem como os reagentes remanescentes da síntese, foram eluídos por meio da percolação contínua de 50 mL de uma solução de metanol:ácido acético 8:2 (v/v), através de 500 mg de MIP. Por fim, o polímero foi seco a 60°C e estocado a temperatura ambiente. Um polímero controle (NIP) foi também sintetizado como descrito acima, porém, na ausência de nicotina.

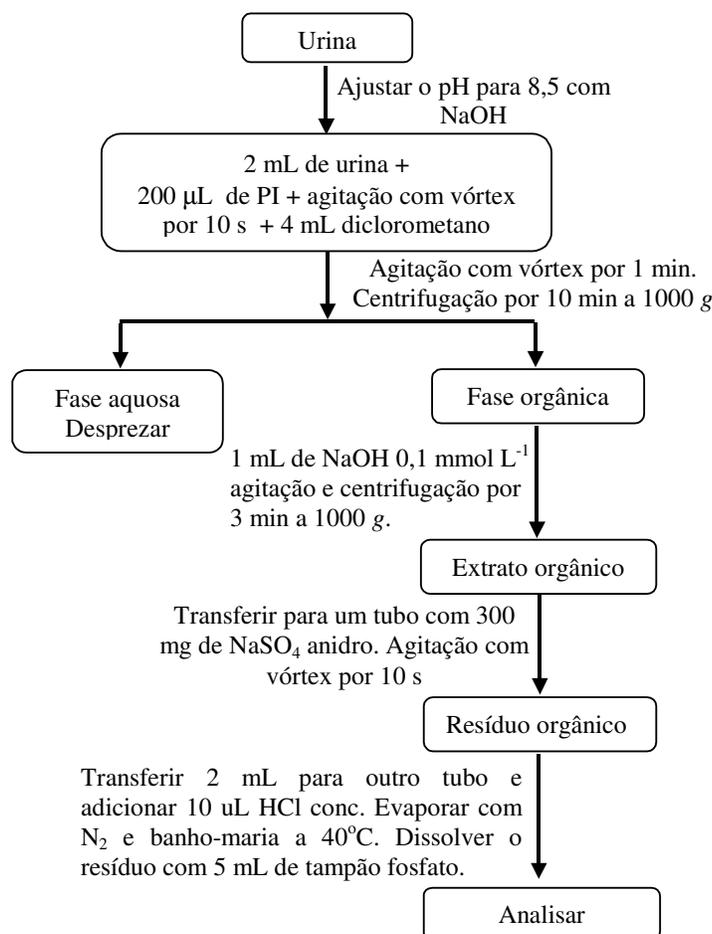
#### **2.4. Preparo das amostras**

Inicialmente cabe enfatizar que o estudo foi avaliado e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp com o número de CAAE: 0411.0.146.000-07. Amostras de urina de fumantes e não fumantes foram submetidas à uma extração líquido-líquido empregando-se diclorometano como solvente extrator. Tal extração foi adaptada da metodologia proposta por Barbieri e Moreno Jr [5]. Inicialmente, 2 mL de urina (valor de pH ajustado para 8,5 com

NaOH) e 200  $\mu\text{L}$  de água/solução padrão (para o preparo das amostras ou dos padrões) foram misturados em um tubo de ensaio. A esse tubo adicionou-se 4 mL de diclorometano, agitou-se por 1 min no agitador vórtex e centrifugou-se a 1000g por 10 min. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com 1 mL de solução aquosa de NaOH 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  e o extrato orgânico foi novamente transferido para outro tubo contendo 300 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Após agitação moderada, transferiu-se 2 mL do resíduo orgânico para outro tubo de ensaio, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de HCl conc., e secou-se com auxílio de  $\text{N}_2$  e banho-maria a 40°C. Após a secagem completa, o resíduo foi recuperado em 5 mL de tampão fosfato (0,01  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,5), e posteriormente analisado pelo sistema proposto. A Figura C2-1 apresenta o esquema completo da LLE. Cabe ressaltar que o preparo das amostras para a análise por HPLC, foi criteriosamente igual ao procedimento descrito acima, com exceção da última etapa, onde o resíduo foi recuperado em 100  $\mu\text{L}$  de fase móvel.

## 2.5. Sistema de extração e determinação espectrofotométrica usando MIP

Inicialmente, uma solução de acetonitrila 50% (v/v)/ $\text{HNO}_3$  0,5  $\text{mol L}^{-1}$  foi percolada pelo sistema, para o condicionamento da coluna de MIP (100 mg). Posteriormente, a amostra/padrão foi percolada pela coluna e a nicotina foi retida na mesma. Para melhorar a seletividade, empregou-se uma solução de lavagem 1 constituída de 1:4(v/v) acetonitrila:NaOH pH 11,4, seguida de uma solução de lavagem 2 ( $\text{HNO}_3$  a pH 2,5). Por fim, a nicotina foi eluída com  $\text{HNO}_3$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$  e o eluato recebeu uma solução de  $\text{KMnO}_4$  0,020 % (m/v), em confluência com uma solução de NaOH 3 % (m/v). Então, a nicotina promoveu a redução do Mn(VII) a Mn(VI), causando a mudança da coloração de roxo para verde. O monitoramento espectrofotométrico foi realizado no comprimento de onda de 610 nm.

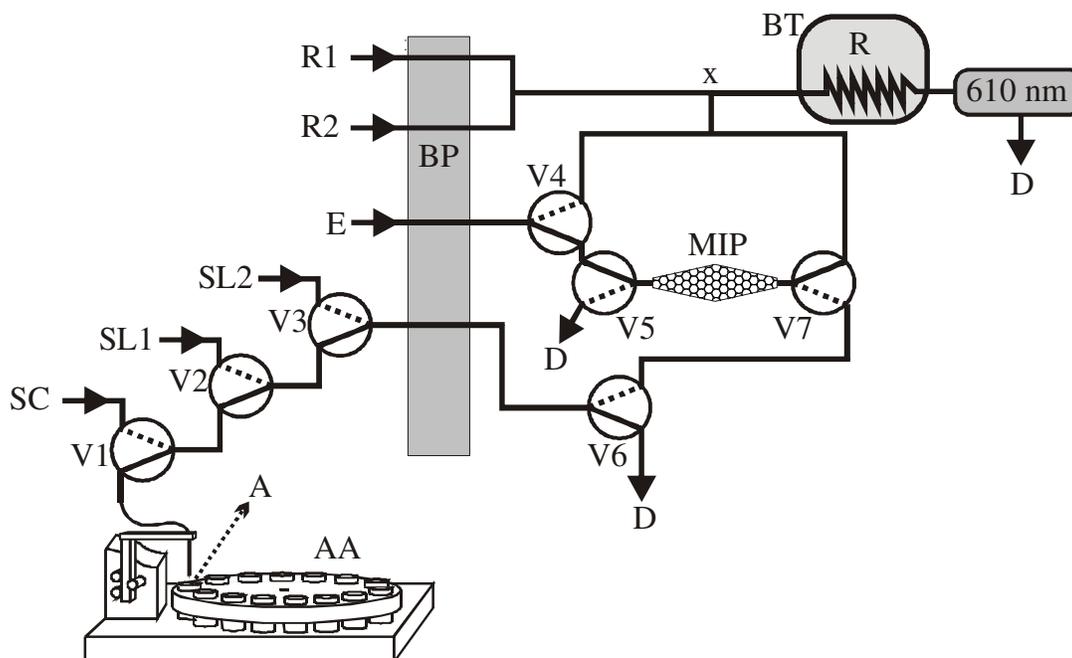


**Figura C2-1:** Esquema da extração líquido-líquido. PI: padrão intermediário adicionado ao sistema para o preparo dos padrões da curva analítica.

O sistema foi composto por sete válvulas solenóides de três vias, posicionadas de acordo com a Figura C2-2 (posição de eluição). Um ciclo correspondente a uma medida foi dividido em seis estágios como observado na Tabela C2-1. Apresenta-se, em seguida, a seqüência de cada estágio.

Primeiro estágio: o braço do auto amostrador é inserido na amostra e a mesma é aspirada com o objetivo de lavar/preencher o capilar do auto-amostrador.

Segundo estágio: uma solução de condicionamento (SC), composta por acetonitrila 50%(v/v)/HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>, é percolada pela coluna MIP com a finalidade de eliminar moléculas indesejáveis remanescentes do ciclo anterior.



**Figura C2-2:** Sistema espectrofotométrico de extração e determinação empregando MIP, na etapa de eluição (todas as válvulas estão desligadas como visto no estágio 6 da Tabela C2-1). O sistema compreende uma bomba peristáltica (BP), sete válvulas solenóides de três vias (V1-7), um auto-amostrador (AA) [16], um banho termostatizado (BT) a 50°C e um espectrofotômetro visível ajustado em 610 nm. R1 = solução de  $\text{KMnO}_4$  0,010 % (m/v) a uma vazão de  $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ , R2 = solução de NaOH 3 % (m/v) a uma vazão de  $0,75 \text{ mL min}^{-1}$  E = solução eluente de  $\text{HNO}_3$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  a  $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ , A = amostra/padrão a  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ , SC = solução de condicionamento (50% (v/v) acetonitrila/ $\text{HNO}_3$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) a  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ , SL1 = Solução de lavagem 1 (1:4 (v/v) acetonitrila:NaOH pH 11,4) a  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ , SL2 = solução de lavagem 2 ( $\text{HNO}_3$  pH 2,5) a  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ , MIP = coluna com 100 mg de polímero impresso molecularmente seletivo a nicotina, R = Reator de 300 cm, x = ponto de confluência, AA = autoamostrador [16] e D = descarte. As linhas tracejadas indicam a posição alternativa das válvulas.

Terceiro estágio: a amostra/padrão é aspirada e conduzida para a coluna MIP, onde a nicotina é retida nos sítios específicos e a solução remanescente é conduzida para um descarte.

Quarto estágio: o braço do auto amostrador é retirado da amostra e uma solução de lavagem 1 (SL1), constituída de 1:4(v/v) acetonitrila:NaOH em pH 11,4, é percolada pela coluna MIP, para eliminar possíveis interferentes fracamente ligados à mesma.

Quinto estágio: da mesma forma que no estágio anterior, uma solução de lavagem 2 (SL2), constituída de HNO<sub>3</sub> a pH 2,5, é percolada pela coluna MIP, também com objetivo de eliminar interferentes.

Sexto estágio: este estágio refere-se à Figura C2-2, onde todas as válvulas estão desligadas. A nicotina é eluída da coluna MIP e recebe, na confluência x, a mistura das soluções de KMnO<sub>4</sub> 0,020 % (m/v) e NaOH 3 % (m/v). No reator R (temperatura igual a 50°C), a nicotina promove a redução do Mn (VII) a Mn(VI), causando a mudança da coloração de roxo para verde, a qual é monitorada no comprimento de onda de 610 nm. É importante enfatizar que essa reação apresenta uma cinética lenta, o que justifica a presença de um banho termostatizado como apresentado na Figura C2-2.

**Tabela C2-1:** Sequência de trabalho das válvulas solenóides. L = ligada, D = desligada.

Estágio	Válvulas							Tempo/ s
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	
1	D	D	D	D	D	D	D	14
2	L	D	D	L	L	L	L	25
3	D	D	D	L	L	L	L	80
4	D	L	D	L	L	L	L	20
5	D	D	L	L	L	L	L	50
6	D	D	D	D	D	D	D	100

## 2.6. Sistema cromatográfico

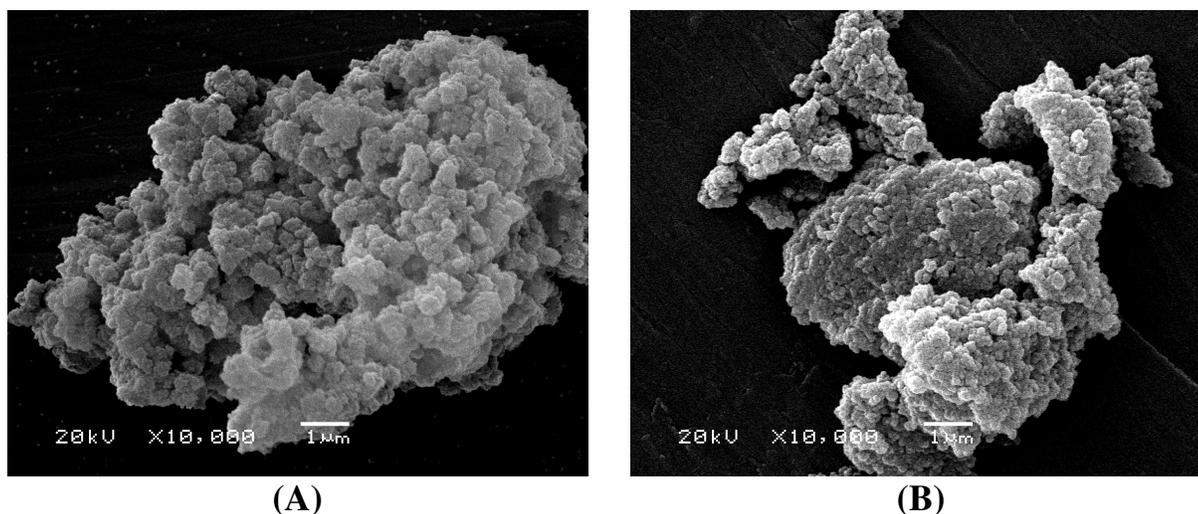
As determinações de nicotina por HPLC foram processadas empregando-se uma coluna em fase reversa (C18) de 25 cm de comprimento e a uma temperatura de 20°C. A fase móvel isocrática foi constituída de uma mistura 1:9 (v/v) de

acetonitrila:tampão fosfato (20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,3). A solução tampão foi constituída de 20 mmol L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,1% (v/v) de trietanolamina, e o pH foi ajustado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> conc. O volume injetado foi de 40µL e a vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Essa metodologia foi adaptada do trabalho desenvolvido por Barbieri e Moreno Jr [5].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Caracterização do MIP

Após a síntese, os polímeros foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura C2-3). As amostras foram depositadas em uma fita adesiva dupla face de carbono fixada em um suporte de amostra de latão. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com ouro até a espessura de 12 nm utilizando-se um metalizador MED 020 da Bal-Tec. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o Jeol LV-JSM 6360 (Japão) operando em voltagem de 15 keV. Nessa avaliação, verificou-se que o MIP apresentou uma granulometria ligeiramente maior que o NIP. Tal conclusão pode ser comprovada pelos valores de área superficial (Tabela C2-2) obtidos pela técnica BET, bem como pelos valores do volume e do tamanho dos poros (Tabela C2-2) obtidos pela técnica BJH. Esses resultados comprovam que a presença de nicotina na síntese do MIP produziu poros ligeiramente maiores, certamente ocupados pela nicotina no momento da síntese. As medidas de porosidade e área superficial foram realizadas em um ASAP 2010 da Micromeritics (EUA). As isotermas de adsorção e dessorção foram medidas a -195,5 °C. Antes das medidas as amostras foram degaseificadas a 200 °C por 24 h sob um vácuo de aproximadamente 15 mPa.



**Figura C2-3:** Micrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e do NIP (B) com aumento de 10000 vezes.

**Tabela C2-2:** Área superficial, volume dos poros e diâmetro médio dos poros no MIP e NIP.

Polímero	Área superficial/ $\text{m}^2\text{g}^{-1}$	Volume médio dos poros/ $\text{mLg}^{-1}$	Diâmetro médio dos poros/ $\text{Å}$
MIP	348,4	0,7	93,8
NIP	336,9	0,6	87,0

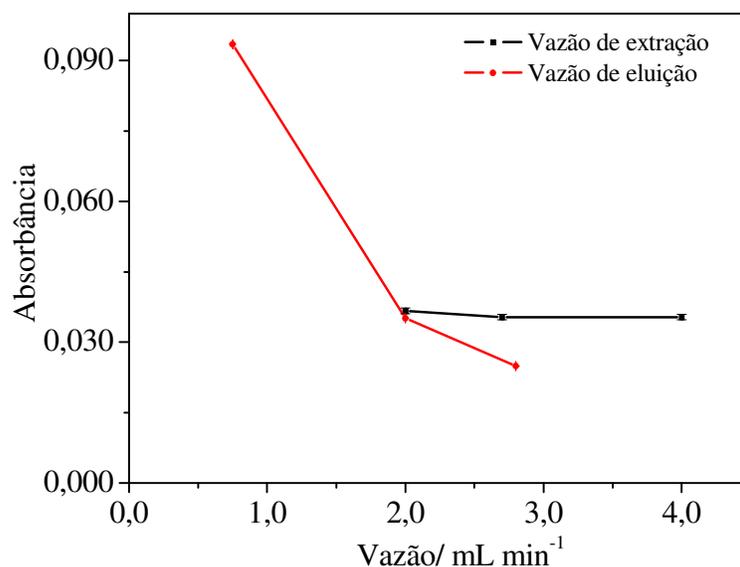
### 3.2. Otimização das variáveis do sistema

As variáveis químicas e físicas do sistema foram otimizadas por meio de um procedimento univariado, empregando-se, inicialmente, um padrão de nicotina de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

#### 3.2.1. Vazão de extração e de eluição

Em procedimentos de SPE, a vazão de extração contribui diretamente com algumas características do sistema como frequência analítica e sensibilidade. Assim, altas vazões de extração podem resultar em altas frequências analíticas, mas, por outro lado, podem também diminuir a eficiência de retenção das moléculas e, por conseqüência, a sensibilidade do sistema. Sendo assim, a otimização deve ser

conduzida de modo a atender satisfatoriamente tais figuras de mérito, sempre com atenção às reais necessidades de aplicação da metodologia. Nesse trabalho, a vazão de extração foi estudada no intervalo de 2,0 a 4,0 mL min<sup>-1</sup>, e como pode ser visto na Figura C2-4, não houve diferença significativa no sinal analítico. Vazões maiores que 4,0 mL min<sup>-1</sup> não foram estudadas devido ao aumento da pressão interna, o que resultou em vazamentos no sistema. Dessa forma, a vazão de 4,0 mL min<sup>-1</sup> foi escolhida como condição de trabalho, por resultar na melhor frequência analítica.



**Figura C2-4:** Influência da vazão de extração e da vazão de eluição na resposta analítica. Para o início da otimização empregou-se uma vazão de eluição de 2 mL min<sup>-1</sup>, 60 cm de reator, extração em tampão 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), HNO<sub>3</sub> 0,10 mol L<sup>-1</sup> como eluente, NaOH 4% (m/v), KMnO<sub>4</sub> 0,02% (m/v) e reação em temperatura ambiente.

A vazão de eluição foi estudada no intervalo de 0,75 a 2,8 mL min<sup>-1</sup>, e os resultados (Figura C2-4) mostraram uma diminuição do sinal analítico (*ca.* 75%), com o aumento da vazão de 0,75 para 2,8 mL min<sup>-1</sup>. Essa mudança significativa no sinal analítico pode ser atribuída a dois fatores. O primeiro deles seria a baixa eficiência de eluição em altas vazões, o que certamente acarretaria na formação de sinais mais largos e baixos. O segundo fator seria a cinética lenta da reação

espectrofotométrica, notadamente favorecida por vazões mais baixas e, com isso, com maior tempo de contato dos reagentes antes de passarem pelo detector. Contudo, pela análise dos sinais, pôde-se concluir que os sinais obtidos nas vazões de 2,0 e 2,8 apresentam largura de base menor que aqueles obtidos na vazão de 0,75 mL min<sup>-1</sup>, o que denota a eficácia no processo de eluição. Sendo assim, podemos afirmar que os bons resultados obtidos em baixas vazões de eluição são decorrentes da cinética lenta da reação. Dessa forma, a vazão de 0,75 mL min<sup>-1</sup> foi escolhida como condição de trabalho.

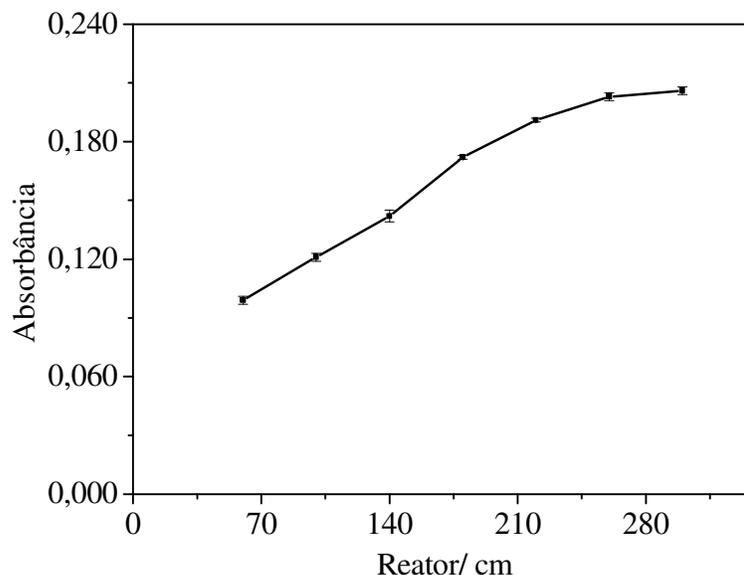
### 3.2.2. Comprimento do reator

Como mencionado acima, a reação empregada no método proposto apresenta uma cinética lenta. Tal hipótese é confirmada pela avaliação da influência do reator na resposta analítica. Essa variável foi estudada na faixa de 60 a 300 cm, e os resultados são apresentados na Figura C2-5. Como pode ser visto, há um aumento significativo do sinal analítico com o aumento do comprimento de 60 cm a 260 cm (*ca.* 50%). Para comprimentos acima de 260 cm (incluindo), o sinal analítico tende a se estabilizar. Dessa forma, um reator de 300 cm foi selecionado para futuros experimentos.

### 3.2.3. pH de extração

A eficiência de extração da nicotina foi avaliada mediante diferentes valores de pH de extração (6,0 a 8,0). Como visto na Figura C2-6, houve um aumento do sinal analítico do pH 6,0 para 7,0 (*ca.* 25%), e uma estabilização do sinal para valores entre 7,0 e 8,0. Com base na literatura pode-se concluir que em pH entre 7,0 e 8,2 a nicotina encontra-se com o anel piridínico não ionizado ( $pK_a = 3,1$ ), e com o anel pirrolidínico ionizado positivamente ( $pK_a = 8,2$ ) [21]. Por outro lado, nessa mesma faixa de pH, a terminação carboxila do ácido metacrílico encontra-se

ionizada negativamente ( $pK_a = 4,7$ ) [22]. Dessa forma, há uma interação eletrostática entre o anel pirrolidínico da nicotina e a terminação carboxila do ácido metacrílico (ver Figura C2-7). Já para pH maior que 8,2, a nicotina encontra-se (em grande parte) não-ionizada e o ácido metacrílico totalmente ionizado. Sendo assim, o pH de 7,5 foi selecionado como condição ótima de trabalho.

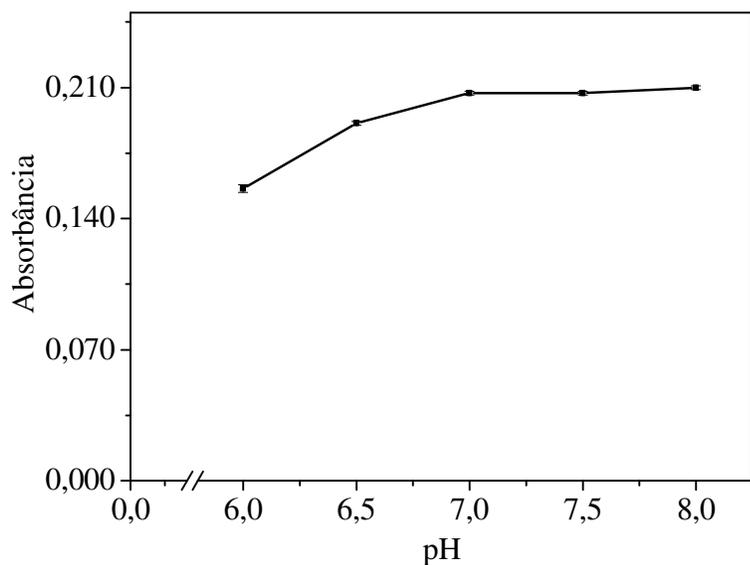


**Figura C2-5:** Influência do comprimento do reator na resposta analítica.

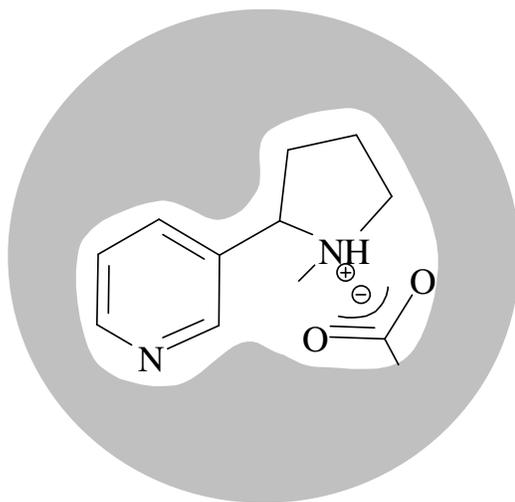
#### 3.2.4. Concentração do tampão

Um tampão fosfato foi avaliado em diferentes concentrações, a fim de estabilizar o pH ideal do padrão/amostra no momento da extração. A faixa de estudo foi de 0,001 a 0,015 mol L<sup>-1</sup> e os resultados demonstraram uma modesta queda do sinal analítico (*ca.* 8%) à medida que a concentração foi aumentada do primeiro para o último nível. Entretanto, deve-se levar em consideração a complexidade de algumas amostras possivelmente avaliadas pela metodologia. Essa complexidade deve ser inerente a uma gama de compostos que podem aumentar ou diminuir o pH de um sistema não tamponado. Dessa forma, com o objetivo de garantir um sistema

tamponante suficiente para estabilizar o pH de amostras desconhecidas, optou-se por empregar a concentração intermediária de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura C2-6:** Influência do pH de extração na resposta analítica.



**Figura C2-7:** Possível mecanismo de interação entre a nicotina e o MIP em pH maior que 7,0.

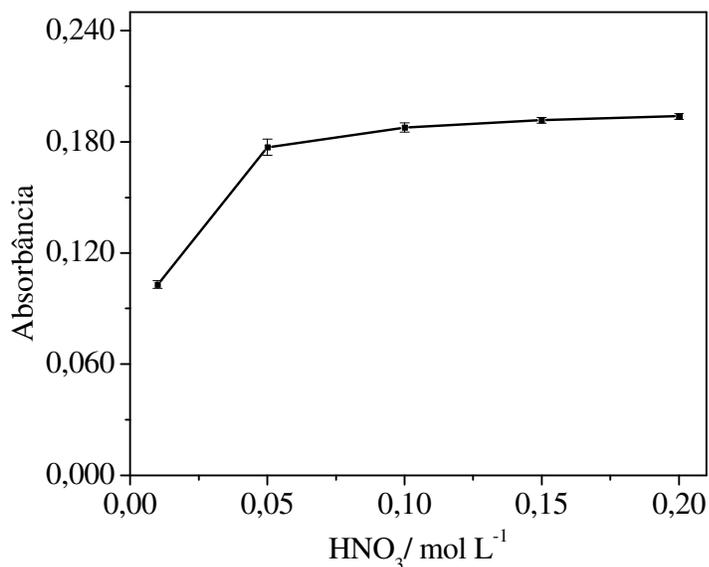
### 3.2.5. Concentração do eluente

A literatura reporta a existência de dois processos pelos quais os analitos podem ser eluídos do MIP. O primeiro deles ocorre por partição e está relacionado à alta afinidade do analito por solventes polares como a acetonitrila e/ou solventes próticos como o metanol [23]. O segundo mecanismo ocorre pela protonação dos grupos ligantes do polímero e do analito, devido à presença de ácidos orgânicos ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e inorgânicos ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ) [24]. Especificamente com sistemas em fluxo, o emprego de álcoois é inviável porque os mesmos podem favorecer o aparecimento de bolhas. Por outro lado, o emprego de ácidos inorgânicos resulta em resíduos mais facilmente tratáveis. Dessa forma, estudou-se  $\text{HNO}_3$  como eluente, na faixa de concentração entre 0,01 e 0,20 mol L<sup>-1</sup>. Como pode ser visto na Figura C2-8, para concentrações de  $\text{HNO}_3$  entre 0,10 e 0,20 mol L<sup>-1</sup>, o sinal analítico permaneceu constante. Por outro lado, para concentrações de 0,01 e 0,05 mol L<sup>-1</sup>, houve uma diminuição da altura e um alargamento da base dos sinais (Figura C2-9), o que traduz a ineficiência da eluição. Ressalta-se que o pico duplo obtido com a concentração de 0,01 mol L<sup>-1</sup> se deve ao fato de que, no momento da comutação, a solução presente na coluna (solução de lavagem) forma duas interfaces com o eluente, onde a fração inicial tem uma concentração ácida menor que a fração final, resultando em diferentes capacidades de eluição. Sendo assim, a concentração de 0,10 mol L<sup>-1</sup> foi selecionada para futuros experimentos.

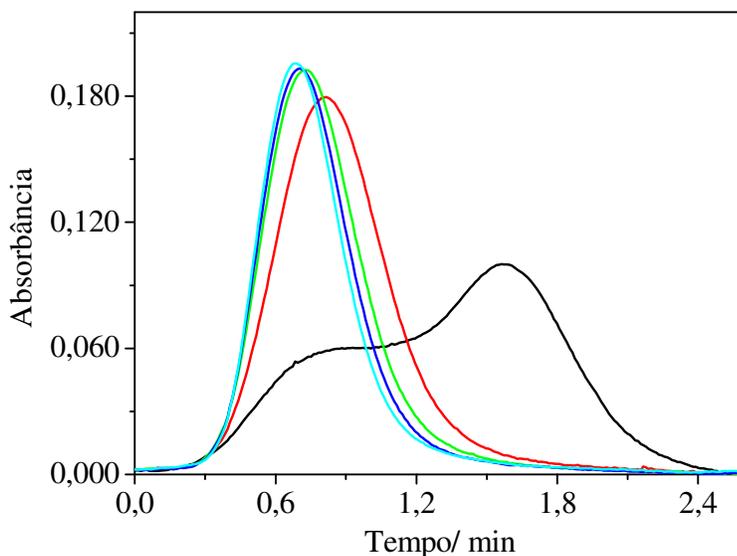
### 3.2.6. Concentração de NaOH

A reação de redução do Mn (VII) a Mn (VI) ocorre em meio alcalino. Porém, a eluição da nicotina foi conduzida em meio ácido, como comentado na seção anterior. Sendo assim, foi necessário alcalinizar o meio reacional empregando-se uma solução de NaOH. A concentração foi estudada de 1 a 7% (m/v) e os resultados são apresentados na Figura C2-10. Com a avaliação do gráfico podemos concluir

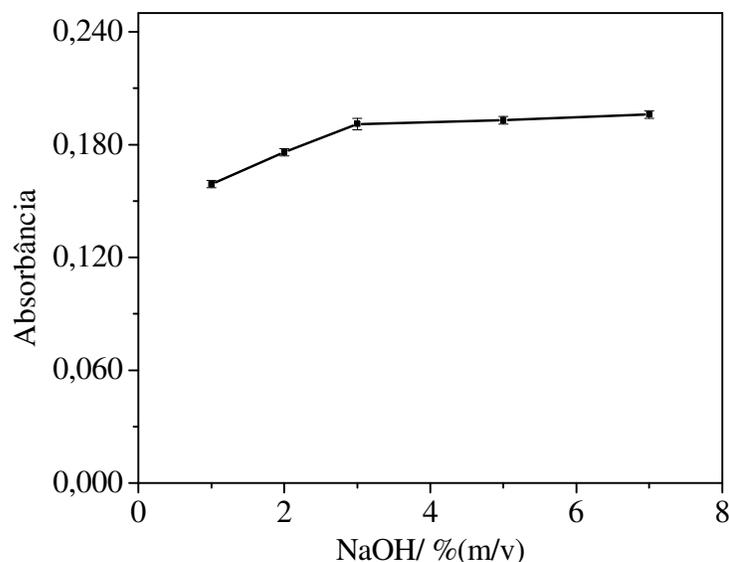
que, para concentrações acima de 3% (m/v) de NaOH, não houve mudança significativa no sinal analítico. Já para concentrações inferiores, o sinal foi menor, em consequência da formação de um ambiente inadequado para a reação. Então, a concentração de 3% (m/v) foi selecionada como condição de trabalho.



**Figura C2-8:** Influência da concentração do eluente na resposta analítica.



**Figura C2-9:** Perfil dos sinais mediante o emprego de concentrações de HNO<sub>3</sub> (eluente) de 0,01 (preto), 0,05 (vermelho), 0,10 (verde), 0,15 (azul escuro), 0,20 (azul claro) mol L<sup>-1</sup>.



**Figura C2-10:** Influência da concentração de NaOH na resposta analítica.

### 3.2.7. Concentração de $\text{KMnO}_4$

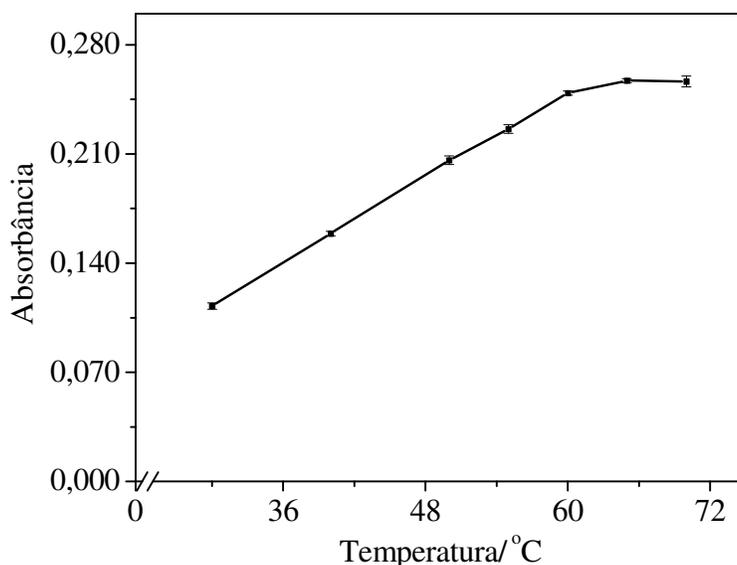
A concentração de  $\text{KMnO}_4$  empregado como reagente espectrofotométrico, deve ser suficiente para permitir a reação com o padrão concentrado da curva de calibração. Assim, não houve necessidade de otimizar a mesma, bastando somente que ele estivesse em excesso. Para o presente sistema, a concentração de  $\text{KMnO}_4$  foi definida como 0,02 % (m/v).

### 3.2.8. Temperatura do reator

Cabe inicialmente ressaltar que a partir deste experimento, empregou-se um padrão de nicotina de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , devido ao aumento significativo do sinal analítico ao longo da otimização (*ca.* 5 vezes maior) com o padrão de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os experimentos relatados nas seções 3.2.1. e 3.2.2. confirmaram a cinética lenta da reação entre a nicotina e o  $\text{KMnO}_4$ . Para melhorar a sensibilidade dessa reação, optou-se, então, por aumentar a temperatura do reator. Isso foi possível empregando um banho termostatizado (ver seção 2.1.) para a avaliação de diferentes

temperaturas do reator. Os resultados são apresentados na Figura C2-11. Como pode ser visto, o aumento da temperatura de 30 para 70°C causou um aumento de *ca.* 150% no sinal analítico. Contudo, o trabalho com temperaturas mais altas, propiciou a criação de bolhas indesejáveis no sistema em fluxo. Assim, a temperatura de 50°C foi selecionada como condição de trabalho, embora tenha apresentado um sinal *ca.* 10% menor que aquele obtido na temperatura de 70°C. Por fim, cabe também ressaltar que foi necessário aumentar a pressão interna do fluxo, minimizando, assim, a presença de bolhas. Isso foi feito, comprimindo-se as paredes de um tubo de Tygon<sup>®</sup> conectado na extremidade final do sistema.



**Figura C2-11:** Influência da temperatura do reator na resposta analítica.

### 3.3. Adaptação do método por HPLC

O método por HPLC descrito por Barbieri e Moreno Jr [5] foi inicialmente avaliado frente à separação de uma mistura de padrões de nicotina, cotinina, cafeína e 2-felilimidazol. Todavia, observou-se uma sobreposição dos sinais de cotinina e cafeína. Assim, a única mudança feita no método original, foi à substituição da coluna de C18 (15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), por uma coluna C18 (25 cm x 4,6 mm, 5

µm). Dessa forma, conseguiu-se a total separação da cotinina e da cafeína. A faixa analítica foi de 0,5 a 6 µg mL<sup>-1</sup> e o limite de quantificação e o coeficiente de correlação foram de 0,5 µg mL<sup>-1</sup> e >0,998, respectivamente. As precisões (inter e intra-ensaio) foram menores que 15% para todos os pontos da curva.

### **3.4. Soluções de condicionamento e lavagem**

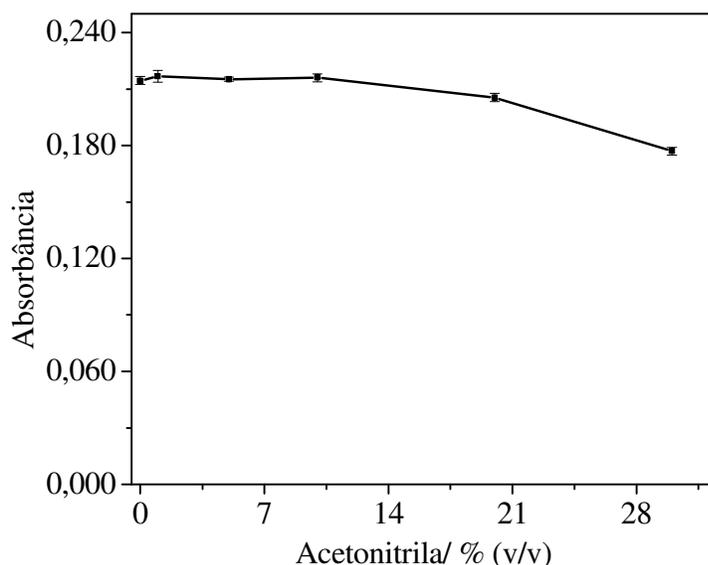
Embora o MIP seja um material seletivo a uma molécula específica, essa seletividade é altamente dependente do meio no momento da extração. Dessa forma, podem ocorrer ligações não complementares entre a molécula modelo ou mesmo interferentes e a superfície polimérica, resultando em baixa seletividade do polímero [25]. Entretanto, mesmo com uma refinada otimização do meio de extração (em termos de pH, força-iônica, polaridade, etc), ainda existem ligações não-específicas e, conseqüentemente, interferências. Para contornar tal problema, têm-se empregado soluções de lavagem em etapas que antecedem a eluição. Essas soluções são percoladas através do MIP e eluem moléculas ligadas não-especificamente, sem eluir o analito. No presente trabalho foram empregadas duas soluções de lavagem que discutidas nas seções subseqüentes.

#### **3.4.1. Solução de condicionamento (SC)**

Antes de percolar a amostra/padrão pelo sistema, foi necessário condicionar a coluna com os objetivos de eliminar moléculas remanescentes de ciclos anteriores, bem como hidratar a coluna evitando a formação de caminhos preferenciais no momento da extração. Nesse sentido, empregou-se uma SC de acetonitrila:HNO<sub>3</sub> (0,5 mol L<sup>-1</sup>) 1:1 (v/v). Essas concentrações foram selecionadas como tal para garantir a total limpeza da coluna.

### 3.4.2. Solução de lavagem 1 (SL1)

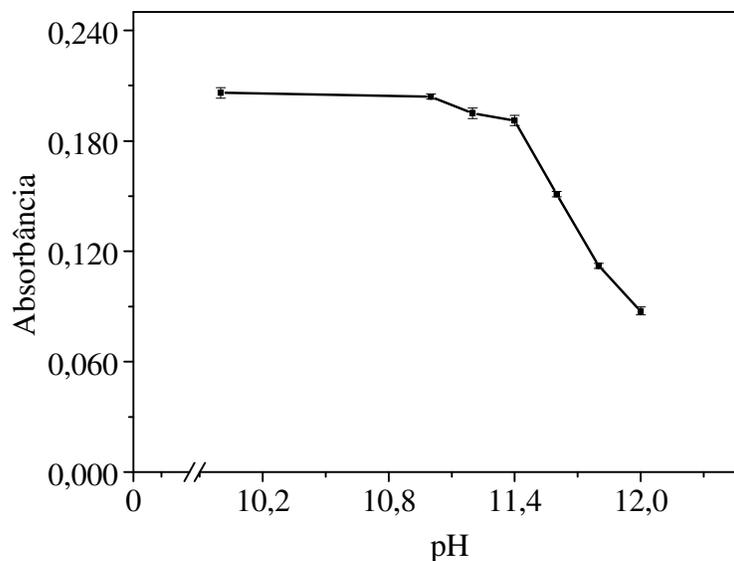
Essa solução de lavagem foi constituída de uma mistura de acetonitrila com NaOH. Inicialmente, diferentes concentrações de acetonitrila em água foram avaliadas, com o objetivo de descobrir qual a maior concentração que pode ser empregada e que não seja capaz de eluir a nicotina (Figura C2-12). Como pode ser visto, a partir de 10% (v/v), ocorreu uma diminuição no sinal analítico (parte da nicotina foi eluída na etapa de lavagem). Contudo, na concentração de 20% (v/v), a queda do sinal foi menor que 5%, o que ocasionou a escolha dessa concentração como condição de trabalho, mediante um compromisso entre sensibilidade e seletividade.



**Figura C2-12:** Influência da concentração de acetonitrila na solução de lavagem 1.

Fixada a concentração de acetonitrila em 20% (v/v), os 80% (v/v) restantes dessa solução (anteriormente completados com água) foram, agora, completados com uma solução de NaOH com pH definido. A faixa de pH estudada foi de 7,0 a 12,0 e os resultados são apresentados na Figura C2-13. Em valores pH superiores a 11,0 o sinal analítico começou a diminuir, denotando que parte da nicotina presente

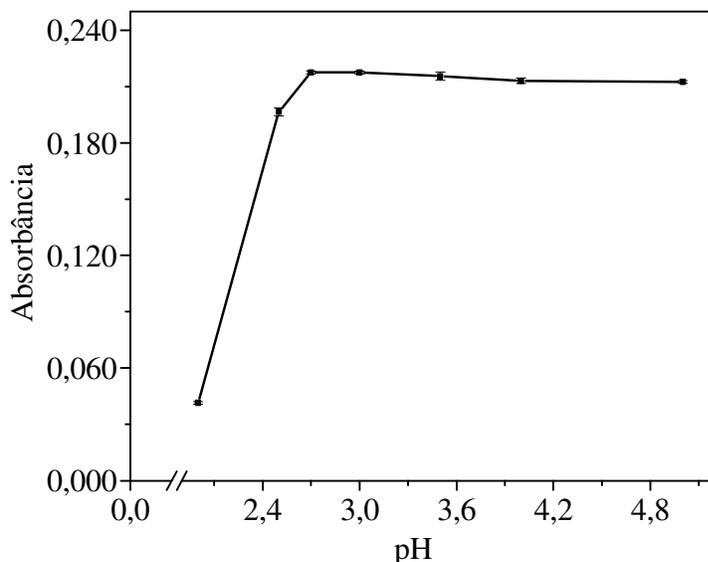
no MIP estava sendo eluída. Porém, a diferença de sinal obtido a pH 11,0 ou 11,4 foi de somente 6%. Então, com o objetivo de reforçar a seletividade do método, optou-se na escolha do pH de 11,4 como condição de trabalho.



**Figura C2-13:** Influência do pH (ajustado com NaOH) da solução adicionada à acetonitrila para obtenção da solução de lavagem 1.

### 3.4.3. Solução de lavagem 2 (SL2)

A solução de lavagem 2 foi otimizada em função da concentração de acetonitrila e do pH alcalino. Porém, acredita-se que uma solução de lavagem ácida também pode auxiliar na eliminação de interferentes. Dessa forma, a solução de lavagem 2 foi constituída de HNO<sub>3</sub> com pH estudado na faixa de 2,0 a 5,0. Os resultados (Figura C2-14) mostraram que a nicotina foi eluída somente em pH menor que 2,7. No pH de 2,5, *ca.* 10% da nicotina foi eluída. Porém, mediante um compromisso entre seletividade e sensibilidade e o pH de 2,7 foi escolhido para futuros experimentos.



**Figura C2-14:** Influência do pH da solução de lavagem 2 na resposta analítica.

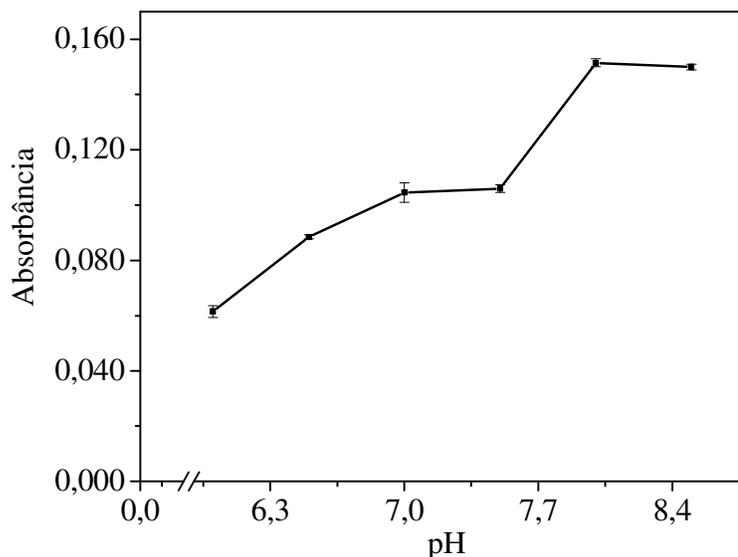
### 3.5. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido empregada no método proposto foi adaptada do trabalho de Barbieri e Moreno Jr [5]. Foi realizado um estudo para verificar qual o melhor pH de extração para a urina. A faixa de pH estudada foi de 6,0 a 8,5, e os resultados são apresentados na Figura C2-15. Com base no gráfico podemos concluir que para pH maior ou igual a 8,0, não há mudança significativa no sinal analítico. Sendo assim, o pH de 8,5 foi selecionado como condição de trabalho. É importante destacar que o pKa do anel pirrolidínico da nicotina é 8,2. Dessa forma, em um pH de 8,5, a maior parte da nicotina encontra-se não-protonada, facilitando sua passagem para a fase orgânica (diclorometado).

### 3.6. Estudo da seletividade

Como comentado na seção 3.4, nem sempre a existência de sítios seletivos de ligação a uma molécula específica é garantia de seletividade em procedimentos de SPE com MIP. Como exemplo, podemos citar a extração de fármacos em amostras

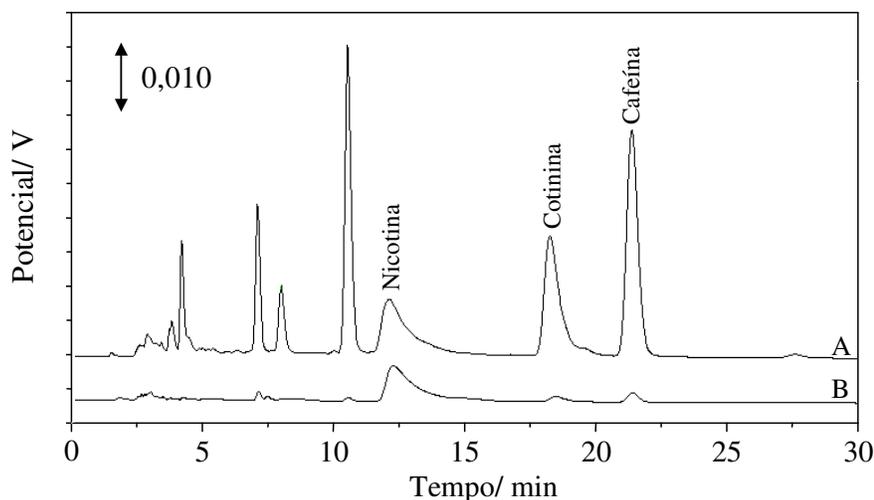
biológicas, para a qual, rotineiramente, emprega uma técnica de separação (*e.g.* HPLC) após a extração.



**Figura C2-15:** Influência do pH da urina na extração líquido-líquido.

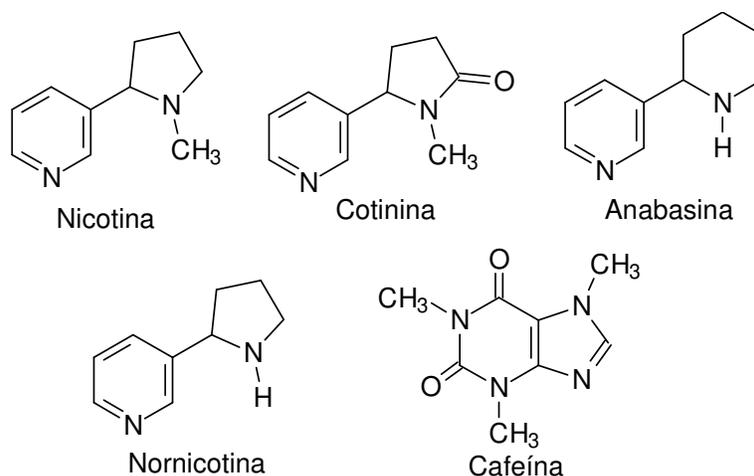
Isso é justificado porque a amostra biológica normalmente apresenta uma vasta quantidade de substâncias estruturalmente semelhantes à molécula modelo (*e.g.* metabólitos e substâncias endógenas). Dessa forma, como a proposta descrita nesse trabalho não emprega uma técnica de separação após a extração, a veracidade dos resultados aqui obtidos pode ser posta em prova. Por isso, para clarear as potencialidades dessa metodologia no tocante à sua seletividade fez-se necessário investigar rigorosamente o desempenho do MIP no trabalho com amostras biológicas. Nesse contexto, propôs-se um experimento para verificar a capacidade do sistema na eliminação de interferentes. Para tal, empregou-se uma amostra de urina de fumante, previamente submetida a uma extração líquido-líquido (em duplicata). Assim, na etapa após a secura completa, um dos resíduos foi ressuspensão em tampão fosfato, como descrito na seção 2.4., e o outro ressuspensão em 1 mL de HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Aquela réplica ressuspensa em tampão fosfato foi percolada pelo

sistema proposto nas condições de trabalho otimizadas anteriormente. A única mudança foi que o eluente passou a ser HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>. No momento da eluição, o tubo ascendente proveniente da válvula V7 (Figura C2-2) foi desconectado no ponto de confluência x, e um volume de 1 mL foi coletado. As duas réplicas, uma sem passar pelo sistema e a outra passada pelo sistema (em 1 mL de HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>, cada uma), foram secas sob N<sub>2</sub> a temperatura de 40°C, ressuspensas em 100 µL de fase móvel, e injetadas no HPLC. Os resultados são apresentados na Figura C2-16. Como pode ser observado no cromatograma (A), mesmo após a LLE, uma grande quantidade de compostos (*ca.* de 7 picos bem definidos) ainda prevaleceram na amostra de urina. Por outro lado, no cromatograma (B) quase todos os compostos são eliminados, exceto a nicotina.



**Figura C2-16:** Cromatogramas de uma amostra de urina de fumante injetada no HPLC após uma LLE (A) e após uma LLE seguida da percolação da amostra pelo sistema proposto (B).

Embora o experimento mostrado acima tenha demonstrado a boa seletividade da metodologia proposta, o efeito de concentrações crescentes de algumas moléculas estruturalmente semelhantes à nicotina (Figura C2-17) foi avaliado individualmente.



**Figura C2-17:** Estrutura química da nicotina e de algumas moléculas estruturalmente semelhantes.

Esses estudos foram feitos empregando-se soluções aquosas de concomitantes adicionados, em proporções definidas, a uma solução aquosa de nicotina de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Com base nos resultados (Tabela C2-3), pode-se concluir que a cotinina, (principal metabólito da nicotina), não causou interferência na proporção de 1:20. Cabe ressaltar que a concentração média de cotinina em urina de fumantes varia em função do tempo, uma vez que depende de diferentes fatores como o tempo de exposição, a eficiência de metabolização, dentre outros. Entretanto, em condições extremas de concentração destes dois fármacos, a proporção nicotina:cotinina nunca excede 1:20 (para uma concentração de nicotina de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) [26]. No mesmo contexto, as proporções de nicotina:anabasina e nicotina:nornicotina nunca excedem 1:20 em condições normais. Já para cafeína, mesmo na proporção extrema de 1:100 (nicotina:cafeína) não houve diferença significativa do sinal analítico. Um dado importante é que há uma baixa probabilidade de se encontrar concentrações de cafeína superiores a  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , uma vez que a concentração máxima encontrada em urina é da ordem de  $51 \mu\text{mol L}^{-1}$  [26].

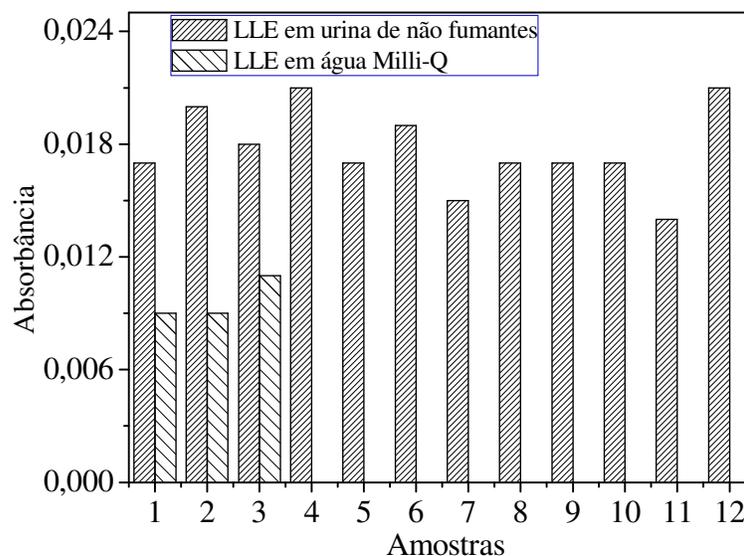
**Tabela C2-3:** Efeito de alguns concomitantes na resposta analítica de uma solução padrão de nicotina de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Concomitante	Proporção nicotina: concomitante	Recuperação/ %
Cotinina	1:1	98
	1:20	98
	1:100	129
Anabasina	1:1	96
	1:20	215
Nornicotina	1:1	101
	1:20	267
Cafeína	1:1	98
	1:20	100
	1:100	102

### 3.7. Figuras de mérito e aplicação em amostras de urina de fumantes

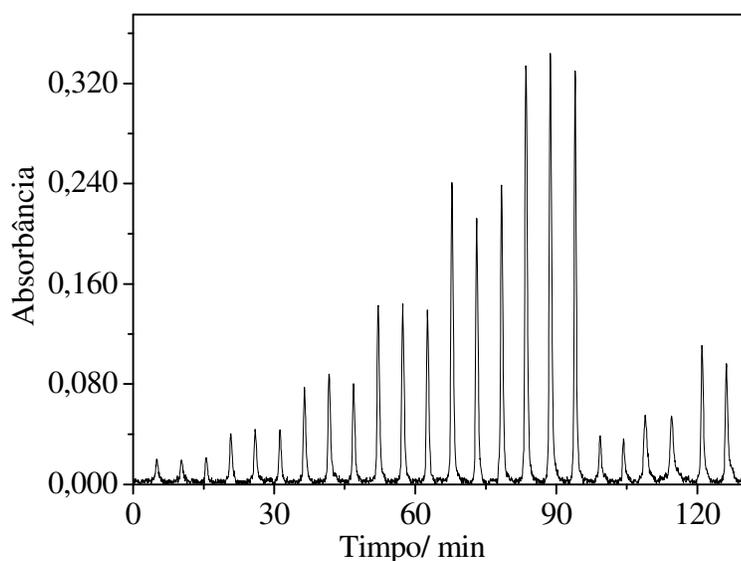
Com o objetivo de reproduzir a influência da matriz mediante os processos de extração das amostras de urina, os padrões da curva analítica foram preparados na presença de uma mistura de 12 amostras de urinas de não fumantes e submetidas às mesmas condições que as amostras de urinas de fumantes (ver Figura C2-1). Além disso, os sinais analíticos dessas 12 amostras foram obtidos individualmente (após uma LLE), e, como mostrado na Figura C2-18, não apresentaram diferença significativa ( $0,017 \pm 0,003$ ). Por outro lado, uma LLE foi novamente executada, porém, substituindo as amostras de urina por água ultra pura. Como também visto na Figura C2-18, houve uma média de absorvância de  $0,010 \pm 0,001$ . Esse resultado comprova que *ca.* 56% da absorvância obtida para as amostras de urina de não fumantes advém da própria LLE.

A faixa de concentração de nicotina na curva analítica foi de  $4,0$  a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o coeficiente de correlação foi maior que  $0,998$  para medidas em triplicata de cinco níveis de concentração.



**Figura C2-18:** Absorbâncias obtidas na medida de doze amostras de urina de não fumantes e de três amostras de água ultra-pura. Todas as amostras foram inicialmente submetidas a uma LLE.

A Figura C2-19 apresenta os sinais obtidos para o branco (urina de não fumante sem adição de nicotina), para os padrões da faixa analítica, bem como para três amostras de urina de fumantes (em duplicata), respectivamente. Os limites de detecção ( $LD = 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de quantificação ( $LQ = 1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC [27], e a frequência analítica do sistema foi de  $11 \text{ h}^{-1}$  (sem contar a etapa de LLE). As precisões intra-ensaio e inter-ensaio foram obtidas empregando-se uma amostra de urina de não fumante adicionada de três níveis de concentração de nicotina ( $3, 10$  e  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), e analisadas no mesmo dia ( $n = 5$ ) e em dias diferentes ( $n = 3$ ), respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela C2-4. A exatidão foi comprovada pela comparação das concentrações de nicotina em amostras de urina de fumantes, obtidas pelo método proposto e por HPLC [5]. Os resultados (Tabela C2-5) foram estatisticamente semelhantes ao nível de 95% de confiança segundo o teste  $t$ .



**Figura C2-19:** Sinais analíticos ( $n = 3$ ) do branco analítico, de 5 padrões de nicotina ( $4, 10, 20, 40$  e  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 3 amostras de urina de fumantes ( $n = 2$ ), respectivamente. Os padrões foram preparados em pool de urina de não fumantes.

**Tabela C2-4:** Precisão intra-ensaio e inter-ensaio obtida com amostras de urina de não fumantes fortificadas em três níveis de concentração.

Padrão de nicotina/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Precisão/ %	
	Intra-ensaio ( $n = 5$ )	Inter-ensaio ( $n = 3$ )
3	10	12
10	13	10
30	4	5

**Tabela C2-5:** Determinação de nicotina em amostras de urina de fumantes pelo sistema proposto e por HPLC.

Amostra	Sistema proposto	HPLC
1	$5,7 \pm 0,7$	$4,9 \pm 0,2$
2	$8,0 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,3$
3	$15 \pm 2$	$13 \pm 2$
4	$3,7 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,3$
5	$8,1 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,3$
6	$2,2 \pm 0,4$	$4 \pm 1$

## 4. CONCLUSÕES

Rotineiramente, os métodos empregados na quantificação de fármacos e toxicantes em amostras biológicas são, em sua maioria, baseados em sistemas cromatográficos. Tal fato se justifica pela complexidade dessas amostras, nas quais pode-se encontrar o próprio fármaco, além de diversas outras moléculas oriundas de processos de biotransformação. Uma técnica pouco seletiva como a espectrofotometria só pode ter sucesso neste caso, quando estratégias de preparo da amostra são empregadas. Nesse contexto, a tecnologia de impressão molecular apresenta-se como uma alternativa elegante, decorrente, principalmente, de características como a alta seletividade e robustez, a facilidade de obtenção dos polímeros e o baixo custo. Neste trabalho, foi possível quantificar nicotina em amostras de urina empregando uma reação espectrofotométrica pouco seletiva (redução de Mn(VII) a Mn(VI) pela nicotina) e um polímero impresso para nicotina.

Embora esteja bem estabelecido que um MIP é dotado de sítios específicos para uma molécula, cabe salientar que a seletividade de procedimentos que empregam MIP é dependente de outros fatores como o meio da extração, e principalmente, o uso adequado de soluções de lavagem. Nesse trabalho, as duas soluções de lavagem empregadas conseguiram eliminar quase que totalmente os interferentes ligados não-especificamente ao MIP (ver Figura C2-16). Além disso, o teste individual de interferentes mostrou não haver qualquer efeito no sinal de um padrão de nicotina na presença de concentrações de interferentes iguais ao maior valor encontrado em urina [26].

O método proposto apresentou boa exatidão, quando comparado com HPLC, bem como boas figuras de mérito, com destaque para a obtenção de melhores, limite de quantificação e frequência analítica, que a metodologia por HPLC empregada na

validação deste método. Além disso, outras potencialidades devem ser destacadas, como o emprego de uma reação não específica, baixo consumo de reagentes, pequeno volume de amostra, facilidade de preparo das soluções, dentre outras. Essas vantagens são certamente um atrativo para o emprego da metodologia na análise rotineira de nicotina em urina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. F. Galvão, R. L. M. Mereau, Tabaco, In: S. Oga, *Fundamentos de Toxicologia*, 2 ed., Ateneu, São Paulo, 2003, p. 474.
- [2] Instituto nacional do câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=dadosnum&link=brasil.htm>. Acessado em 08-01-2007.
- [3] World Health Organization (WHO). *Building blocks for tobacco control: a handbook*. Disponível em: [http://www.who.int/tobacco/resources/publications/general/en/building\\_blocks\\_1.pdf](http://www.who.int/tobacco/resources/publications/general/en/building_blocks_1.pdf).>. Acessado em: 01-10-2004.
- [4] Instituto nacional do câncer, *Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/inquerito/docs/completa.pdf>>. Acessado em 08-01-2007.
- [5] D. Barbieri, H. Moreno Jr, Padronização de método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de nicotina e cotinina em plasma de tabagistas, Dissertação, Faculdade de ciências médicas, Unicamp, 2003.
- [6] E. E. K. Baidoo, M. R. Clench, R. F. Smith, L. W. Tetler, Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 303.
- [7] F. Moriya, Y. Hashimoto, A fatal poisoning caused by methomyl and nicotine, *Forensic Sci. International* 149 (2005) 167.
- [8] P. A. Crooks, G. D. Byrd, Use of High-Performance Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric (LC-MS) Techniques for the Determination of Nicotine and its Metabolites, In: J. W. Gorrod, P. Jacob (Ed), *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites*, Elsevier, Amsterdam, 1999, p. 772.

- [9] A. W. Qare-Abu, B. Mohamed, Quantification of nicotine, chorphyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high-performace liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 757 (2001) 295.
- [10] D. S. Mcgehee, M. J. S. Heath, S. Gelber, P. Devay, L. W. Role, Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in cns by presynaptic receptors, *Science* 269 (1995) 1692.
- [11] I. Kim, M. A. Huestis, A validated method for the determination of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, and norcotinine in human plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, *J. mass Spectrom.* 41 (2006) 815.
- [12] E. Cognard, C. Staub, Determination of nicotine and its major metabolite cotinine in plasma or serum by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection, *Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (2003) 1599.
- [13] M. Meger, I. Meger-Kossien, A. Schuler-Metz, D. Janket, G. Scherer, Simultaneuos, determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine fo smokers using liquid chromatography-tendem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 778 (2002) 251.
- [14] I. Kim, W. D. Darwin, M. A. Huestis, Simultaneous determination of nicotine, cotinine, nornicotine and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 814 (2005) 233.
- [15] T. Chetiyankornkukul, A. Triba, R. Kizu, K. Kimura, K. Hayakawa, Hair analysis of nicotine and cotinine for evaluating tabacco smoke exposure by liquid chromatography-mass spectrometry, *Biom. Chromatogr.* 18 (2004) 655.
- [16] E. C. Figueiredo, L. R. Souza, C. S. Magalhães, C. Wisniewski, P. O. Luccas, A homemade autosampler/injector commutator for flow injection analysis, *J. Autom. Methods Manag.Chem.* 2006 (2006) 1.
- [17] Y. Tan, J. Yin, C. Liang, H. Peng, L. Nie, S. Yao, A study of a new TSM bio-mimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its app for determination of nicotine in human serum and urine, *Bioelectrochemistry* 53 (2001) 141.
- [18] P. A. G. Cormack, A. Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 173.
- [19] C. R. T. Tarley, M. D. T. Sotomayor, L. T. Kubota, Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly

- Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação, Quim. Nova 28 (2005) 1076.
- [20] B. Sellergren, A. J. Hall, Fundamental aspects on the synthesis and characterisation of imprinted network polymers, In: B. Sellergren (Ed), *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2001, p. 557.
- [21] Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations (INCHEM), Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/nicotine.htm>> Acessado em 06-01-2008.
- [22] Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations (INCHEM), <<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/79414.pdf>>, Acessado 06-01-2008.
- [23] A. Martín-Esteban, Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds, Fresenius J. Anal. Chem. 370 (2001) 795.
- [24] M.L. Mena, L. Agüí, P. Martínez-Ruiz, P. Yáñez-Sedeño, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Molecularly imprinted polymers for on-line clean up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 18.
- [25] B.S. Vicente, F.N. Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, Continuous solid-phase extraction and preconcentration of bisphenol A in aqueous samples using molecularly imprinted columns Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 115.
- [26] M.R. Repetto, M. Repetto, Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico (actualización 2005). En: “Aplicación de Toxicología de Postgrado”, M. Repetto ed. Area de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-Rom. Sevilla. 2005. ISBN 84-689-0404-X, Depósito Legal SE-190-05.
- [27] Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, Analyst 112 (1987) 199.

### *Capítulo 3*

# **EXTRAÇÃO DE CLORPROMAZINA E PERFENAZINA EM URINA EMPREGANDO POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP) E SEPARAÇÃO A BAIXA PRESSÃO EM COLUNA C18**

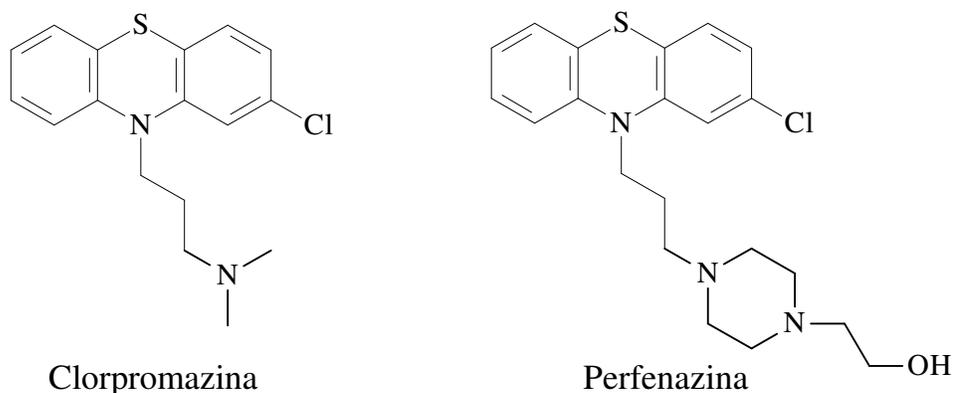
## 1. INTRODUÇÃO

As fenotiazinas são fármacos empregados no tratamento da esquizofrenia, além de apresentarem outras funções como anti-histamínicos, anti-colinérgicos e bloqueadores de receptores alfa-adrenérgicos [1]. Suas ações são mais ou menos potencializadas dependendo da estrutura do respectivo composto fenotiazínico, sendo os mesmos classificados como fármacos de baixa (clorpromazina, tioridazina, mesoridizina), média (perfenazina) e alta potência (flufenazina, trifluofenazina) [2]. Além disso, é importante destacar que doses elevadas de fenotiazinas podem causar sintomas como miose, coma, depressão respiratória, dentre outros [1]. Esse fato torna-se importante uma vez que a disponibilidade e o uso terapêutico freqüente de fenotiazínicos por pacientes psiquiátricos resulta em um considerável número de tentativas de suicídio, e em casos graves de intoxicação medicamentosa [3]. Quanto à biotransformação, esses fármacos sofrem reações de fase 1 catalizadas por enzimas do complexo citocromo P-450, e seus metabólitos são normalmente conjugados com ácidos glucurônicos e excretados principalmente pela urina [4].

Devido à importância terapêutica, bem como pelo aspecto toxicológico inerente às fenotiazinas, diversos trabalhos têm sido propostos para quantificação desses fármacos em amostras biológicas, como fluorescência/quimiluminescência [5-7], imunoenensaio [8], espectrofotometria [9-11], voltametria [12], eletroforese capilar [13,14], cromatografia gasosa [15] e cromatografia líquida [16,17]. Na grande maioria dos casos, o preparo da amostra é a etapa mais demorada do processo analítico, sendo esta ainda mais complexa quando uma técnica cromatográfica é envolvida. Além disso, poucas técnicas de preparo da amostra são capazes de extrair seletivamente cada composto fenotiazínico de uma amostra

biológica. Nesse sentido, uma análise seletiva é feita basicamente empregando técnicas de separação como cromatografia e eletroforese capilar.

Especificamente na análise de amostras biológicas por cromatografia, são requisitados procedimentos prévios de extração, com o objetivo de eliminar interferentes e, em alguns casos, pré-concentrar os analitos. Se o material adsorvente usado na extração for seletivo a uma classe de moléculas (*e.g.* polímeros de impressão molecular), somente os analitos serão retidos na coluna. Esse fato pode ser de grande interesse em separações cromatográficas, uma vez que a seletividade, já obtida na etapa de extração, permite que as condições de separação possam ser mais flexíveis, devido à ausência de interferências. Assim, pode-se aumentar o tamanho das partículas da fase estacionária, bem como a vazão da fase móvel, de forma a reduzir o tempo de análise. Assim, esse Capítulo teve como objetivo empregar um MIP na extração de clorpromazina e perfenazina (Figura C3-1) em amostras de urina, seguido da separação cromatográfica desses fármacos usando uma fase reversa composta de C18 com partículas de tamanho entre 35 e 53  $\mu\text{m}$ , e uma fase móvel percolada a altas vazões.



**Figura C3-1:** Estrutura química da clorpromazina e perfenazina.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Instrumentação

O sistema de extração e separação cromatográfica em linha foi composto por um equipamento FIALab-3200 (FIALab<sup>®</sup> Instruments, Bellevue, EUA), um injetor

2:3:2 mecanizado construído em Teflon<sup>®</sup>, e duas válvulas solenóides 12 VDC/100 PSI (Cole-Parmer Instrument CO, Vernon Hills, EUA). Tubos de Tygon<sup>®</sup> de 0,8 mm de diâmetro interno foram usados nas linhas de transmissão e tubos de Teflon<sup>®</sup> foram usados na propulsão das soluções. Um espectrofotômetro USB-4000 (Ocean Optics, Columbia, EUA) e uma célula de fluxo de quartzo com 1 cm de passo ótico foram empregados na detecção. Um auto-amostrador, como àquele proposto por Figueiredo *et al.* [18], foi também empregado na automação do sistema. A aquisição dos sinais bem como o controle do injetor, do auto-amostrador e das válvulas solenóides, foram feitos pelo equipamento FIALab-3200.

As análises por HPLC foram processadas empregando-se um cromatógrafo PerkinElmer Série 200 e uma coluna Browlee Analytical C18, 5  $\mu$ m, 250x4.6 mm (PerkinElmer, Shelton, EUA).

## 2.2. Reagentes e soluções

As soluções aquosas foram preparadas com reagentes de alta pureza analítica e com água desionizada (>18,2 M $\Omega$  cm) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). O HNO<sub>3</sub> empregado em todas as etapas foi sub destilado em um destilador de quartzo (Marconi, Piracicaba, Brasil). Todas as vidrarias foram lavadas com uma solução de HCl 10% (v/v) por 24 h e posteriormente enxaguadas com água ultrapura.

Para a síntese do MIP, empregou-se a clorpromazina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como molécula modelo, o ácido metacrílico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como monômero funcional, o etileno glicol dimetacrilato (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como agente de ligação cruzada, a 2,2'-azobisisobutironitrila (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) como iniciador da reação e o clorofórmio (grau HPLC Tedia, Rio de Janeiro, Brasil) como solvente.

A solução estoque de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de clorpromazina e perfenazina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), foi preparada por meio da dissolução dos fármacos em metanol (J. T. Baker, Phillipsburg, EUA).

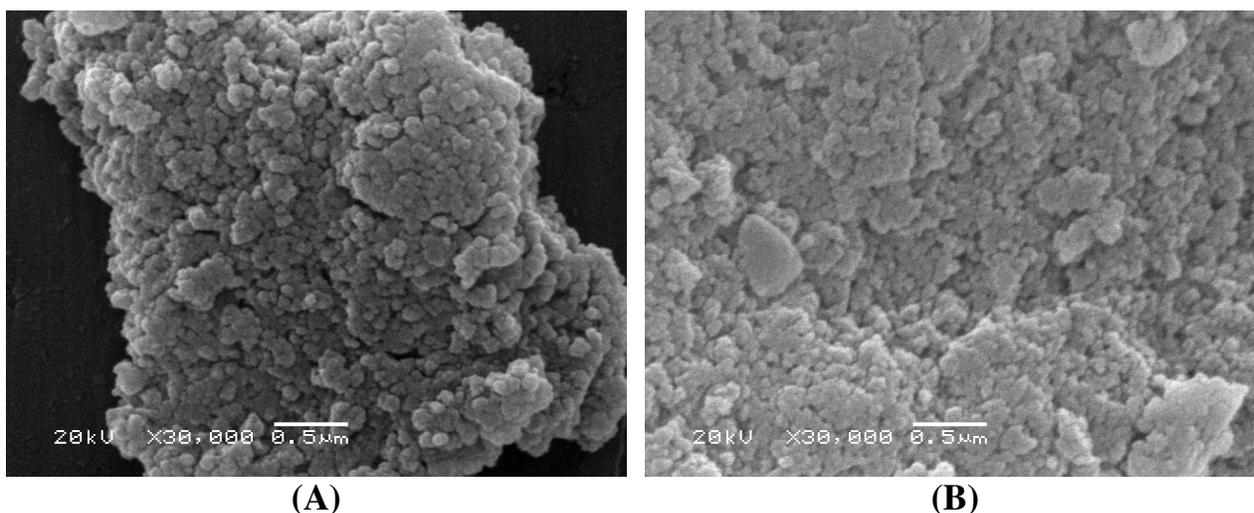
A solução de lavagem foi preparada misturando-se 10 mL de uma solução aquosa de HCl (Merck, Darmstad, Alemanha) pH 2,0 com 90 mL de acetonitrila (Merck, Darmstad, Alemanha).

A fase estacionária foi composta por sílica modificada - C18 (Varian, Harbor City, EUA) retirada de cartuchos comerciais de extração em fase sólida. Para o empacotamento, preparou-se uma suspensão alcoólica (etanol) da sílica e adicionou-se a mesma na coluna a uma vazão de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

### 2.3. Síntese do MIP

A síntese do MIP foi conduzida de acordo com trabalho de Niu *et al.* [19] sendo as interações entre o MF e a MM de natureza não-covalente. Em uma ampola de síntese (como àquela descrita no item 2.3 do Capítulo 1) foram adicionados 12 mL de clorofórmio, 2 mmol de clorpromazina e 8 mmol de ácido metacrílico. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 4 h e as interações, de natureza não-covalente, ocorreram entre o monômero funcional e a clorpromazina. Posteriormente, adicionou-se 20 mmol de etileno glicol dimetacrilato e 50 mg de 2,2' azobisisobutironitrila. A solução foi homogeneizada e purgada com nitrogênio por 30 min. Essa etapa foi necessária para eliminar o oxigênio para evitar problemas relacionados à polimerização (formação de radicais secundários [20,21]) e também evitar a presença de grupos ligantes em posições não complementares à clorpromazina [22]. A ampola de síntese foi acoplada em um banho-maria a  $60^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, tempo necessário para a completa polimerização. Após a síntese, a ampola foi quebrada e o polímero foi pulverizado (empregando-se um almofariz) até

tamanho de partícula menor que 75  $\mu\text{m}$ . A clorpromazina, e os reagentes remanescentes da síntese foram eluídos por meio da percolação contínua de 50 mL de uma solução de ácido acético:metanol: 1:4 (v/v), através de 500 mg de MIP. Por fim, o polímero foi seco a 60°C e estocado a temperatura ambiente. Um polímero controle (NIP) foi também sintetizado como descrito acima, porém na ausência de clorpromazina. A Figura C3-2 apresenta as micrografias eletrônicas de varredura do MIP e do NIP. Como pode ser visto, podemos perceber que o MIP apresenta uma maior porosidade que NIP, o que pode resultar em maiores capacidades adsorptivas. Ressalta-se que as micrografias foram obtidas depositando-se as amostras em uma fita adesiva dupla face de carbono fixada em um suporte de amostra de latão, e posteriormente metalizando-as com ouro até a espessura de 12 nm (metalizador MED 020 da Bal-Tec). O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o Jeol LV-JSM 6360 (Japão) operando em voltagem de 15 keV.

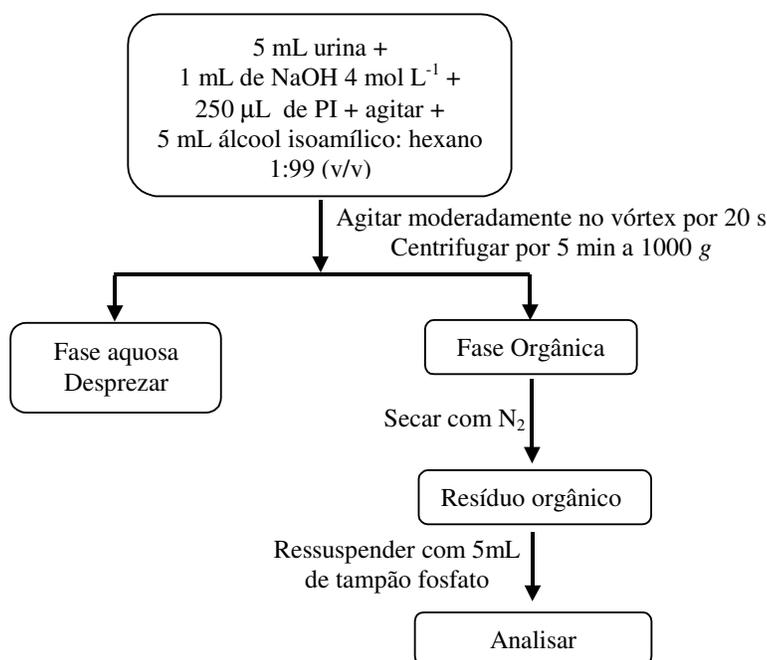


**Figura C3-2:** Micrografias eletrônicas de varredura do MIP (A) e do NIP (B), ambas com aumento de 30000 vezes.

#### 2.4. Amostras

Inicialmente cabe enfatizar que o estudo foi avaliado e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp com o número

de CAAE: 0411.0.146.000-07. As amostras de urina foram submetidas a uma extração do tipo líquido-líquido empregando hexano como solvente extrator, de acordo com o procedimento descrito por Madej *et al.* [23]. Em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL de urina, 1 mL de NaOH 4 mol L<sup>-1</sup>, 250 µL de padrão de clorpromazina e perfenazina e 5 mL de uma solução de álcool isoamílico:hexano 1:99 (v/v). O tubo foi agitado no vórtex por 20 s e centrifugado por 5 min a 1000 g. Em seguida, a fase orgânica foi transferida para outro tubo de ensaio, seca sob nitrogênio, redissolvida com 5 mL de tampão fosfato (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0) e analisada. A Figura C3-3 mostra o esquema da extração líquido-líquido.



**Figura C3-3:** Esquema da extração líquido-líquido. PI: padrão intermediário de clorpromazina e perfenazina.

## 2.5. Sistema de extração empregando MIP e separação a baixa pressão

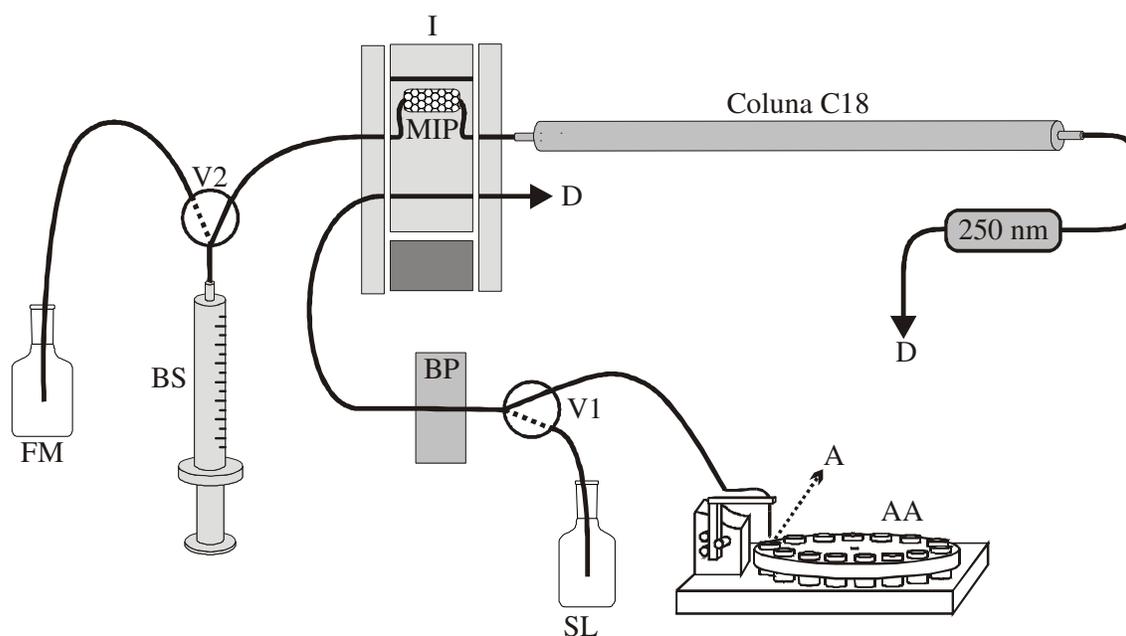
Inicialmente, a amostra/padrão foi percolada pela coluna MIP e os fármacos foram retidos na mesma. Para melhorar a seletividade empregou-se uma solução de

lavagem constituída de HCl (pH 2,0):metanol 1:9 (v/v). Por fim, os fármacos foram eluídos e separados na coluna C18 empregando metanol puro como fase móvel.

O sistema (Figura C3-4) é composto por um injetor comutador 2:3:2, uma bomba de seringa (10 mL), uma bomba peristáltica, duas válvulas solenóides e um auto-amostrador. Um ciclo completo correspondente a uma medida foi dividido em 8 estágios (Tabela C3-1) como mostrado a seguir.

Primeiro estágio: o injetor é colocado na posição de amostragem.

Segundo estágio: 5 mL de amostra/padrão (clorpromazina e perfenazina) são percolados por uma coluna contendo 25 mg de MIP por meio de uma bomba peristáltica a uma vazão de  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ .



**Figura C3-4:** O sistema de extração usando MIP e separação a alta velocidade é composto por uma bomba de seringa (BS) de 10 mL, uma bomba peristáltica (BP), um injetor comutador (I), duas válvulas solenóides (V1-2), uma coluna cilíndrica (3 (d.i.) x 15 mm) contendo 25 mg de MIP seletivo a clorpromazina e uma coluna cilíndrica de 3 x 250 mm (d.i. x comprimento) preenchida com sílica (C18) entre 35 e 53  $\mu\text{m}$ . A fase móvel (FM) empregada foi metanol grau HPLC e a solução de lavagem (SL) foi HCl (pH 2.0):metanol 1:9 (v/v). O sinal foi monitorado a 250 nm, e o restante das soluções foram conduzidas ao descarte (D). As linhas tracejadas indicam a posição alternativa das válvulas.

**Tabela C3-1:** Sequência de trabalho das válvulas solenóides, do injetor e das bombas. L = ligada, D = desligada, Pa = posição de amostragem, Pi = posição de injeção, As = aspirando, Di = dispensando.

Estágio	Válvulas		Injetor	Bomba		Tempo/ s
	V1	V2		Seringa	Peristáltica	
1	D	D	Pa	D	D	10
2	D	D	Pa	D	L	188
3	L	D	Pa	D	L	70
4	D	D	Pi	D	D	10
5	D	L	Pi	As	L	6
6	D	D	Pi	Di	D	60
7	D	L	Pi	As	D	20
8	D	D	Pi	Di	D	200

Terceiro estágio: V1 é acionada e 1 mL de uma solução de lavagem (SL) composta por HCl (pH 2,0):metanol 1:9 (v/v) fluem pela coluna de MIP a uma vazão de 1,6 mL min<sup>-1</sup>, promovendo a eluição dos interferentes.

Quarto estágio: V1 e a bomba peristáltica são desligadas e o injetor é comutado de modo a colocar a coluna de MIP no percurso analítico.

Quinto estágio: V2 é acionada e a seringa aspira 3 mL de fase móvel (metanol) do frasco estoque a uma vazão de 30 mL min<sup>-1</sup>.

Sexto estágio: V2 é desligada e a seringa dispensa 3 mL de fase móvel para o percurso analítico a uma vazão de 3 mL min<sup>-1</sup>. Nesse momento o metanol causa a eluição dos fármacos do MIP e os mesmos são direcionados para a coluna C18 onde se inicia a separação.

Sétimo estágio: V2 é novamente acionada e a seringa aspira, do frasco estoque, 10 mL de metanol a uma vazão de 30 mL min<sup>-1</sup>.

Oitavo estágio: inicia-se a aquisição de sinais pelo espectrofotômetro a 250 nm, V2 é desligada e a seringa dispensa 10 mL de metanol para o percurso analítico, completando a separação dos fármacos.

## 2.6. Sistema cromatográfico convencional

As determinações de clorpromazina e perfenazina por HPLC (adaptada da literatura [17]) foram processadas empregando-se uma coluna em fase reversa (C18) de 25 cm de comprimento e a uma temperatura de 20°C. Para as análises empregou-se um cromatógrafo líquido Perkin Elmer Série 200 com coluna analítica Brownlee™ C18 (250x4,6 mm – d.i. de 5µm). O volume injetado foi de 100 µL e a fase móvel foi constituída de uma mistura 90:10 (v/v) de metanol:tampão fosfato (30 µmol L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5,6) a uma vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1. Otimização das variáveis do sistema

As variáveis do sistema foram otimizadas de maneira univariada empregando-se um padrão misto contendo 100 µmol L<sup>-1</sup> de clorpromazina e 100 µmol L<sup>-1</sup> de perfenazina. Para o início da otimização, 5 mL do respectivo padrão foi percolado pela coluna de MIP a uma vazão de 1,6 mL min<sup>-1</sup>. Posteriormente, a coluna de MIP foi lavada com 1 mL de água a 1,6 mL min<sup>-1</sup> para a eliminação dos interferentes, e, por fim, o injetor foi comutado. Os fármacos foram eluídos da coluna de MIP e separados pela coluna C18 a uma vazão de 1,8 mL min<sup>-1</sup>. O sinal analítico empregado foi área integrada do pico.

#### 3.1.1. Natureza da coluna analítica

A coluna analítica foi inicialmente preenchida com MIP (< 53 µm) para a avaliação de sua eficiência de separação. Contudo, verificou-se que não houve qualquer separação dos fármacos presentes em um padrão contendo 100 µmol L<sup>-1</sup> de clorpromazina e 100 µmol L<sup>-1</sup> de perfenazina. Dessa forma, optou-se pelo emprego

de uma coluna (3 (d.i.) x 15 mm) de MIP somente na etapa de extração, e de uma coluna analítica (3 (d.i.) x 250 mm) de C18 para separação.

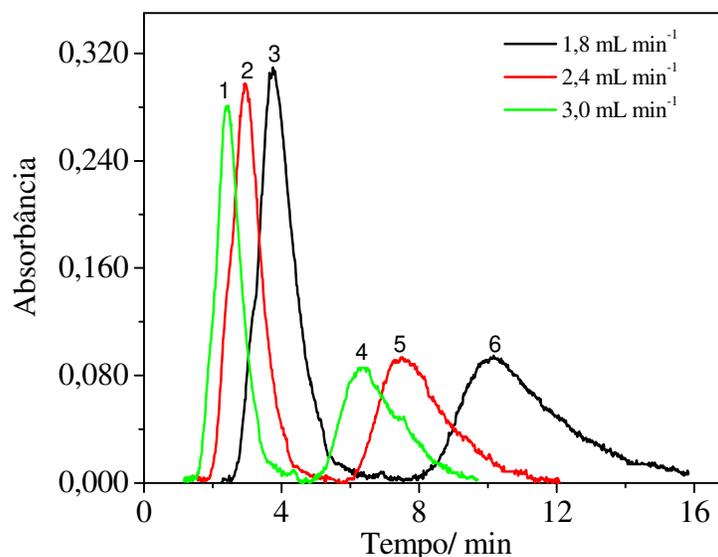
### 3.1.2. Composição da fase móvel

A primeira variável estudada foi a composição da fase móvel. Especificamente para o sistema proposto, a fase móvel tem duas funções: (I) eluir rapidamente os fármacos retidos na coluna MIP, e (II) ser capaz de promover uma boa separação destes fármacos na coluna C18. Nesse sentido, estudou-se a composição da fase móvel em termos de acetonitrila e metanol (solventes comumente empregados como eluentes em MIP). Primeiramente, acetonitrila pura foi avaliada e os resultados demonstraram que a mesma não foi capaz de eluir os fármacos do MIP, descartando-se seu emprego como fase móvel. Já o metanol puro separou completamente a clorpromazina e a perfenazina em um tempo de aproximadamente 18 min. Entretanto, os picos foram largos sendo necessário *ca.* 5,5 e 9,0 min (clorpromazina e perfenazina, respectivamente) para que retornassem à linha base. Verificou-se, também, que qualquer diluição do metanol em água para concentrações de metanol menores que 95% (v/v), não era capaz de eluir os fármacos da coluna MIP. Dessa forma, metanol (grau HPLC) puro foi selecionado como fase móvel.

### 3.1.3. Vazão da fase móvel

Como a coluna de separação apresentava partículas entre 35 e 53  $\mu\text{m}$ , uma baixa eficiência de separação foi observada. Ressalta-se que colunas analíticas comerciais apresentam partículas menores que 5  $\mu\text{m}$  o que favorece a separação, mas aumenta consideravelmente a pressão interna do sistema. Dessa forma, uma alternativa para melhorar a resolução dos picos foi aumentar a vazão da fase móvel.

Essa vazão foi então estudada entre 1,8 e 3,0 mL min<sup>-1</sup> e os resultados (Figura C3-5) demonstraram que, na vazão de 3,0 mL min<sup>-1</sup>, o tempo de corrida foi reduzido de 16 para 9,5 min. Porém, houve uma considerável diminuição no sinal analítico para ambos os fármacos (36 e 44 % para clorpromazina e perfenazina, respectivamente). Contudo, como um compromisso entre sensibilidade e frequência analítica, optou-se pela vazão de 3,0 mL min<sup>-1</sup>.

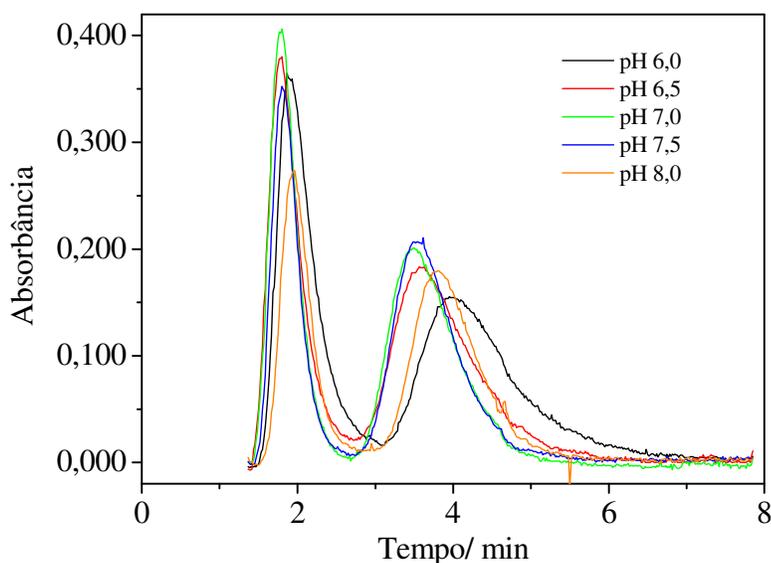


**Figura C3-5:** Separação obtida para vazões de 1,8, 2,4 e 3,0 mL min<sup>-1</sup>. Os três primeiros picos (1, 2 e 3) e os três últimos (4, 5 e 6) correspondem a clorpromazina e perfenazina, respectivamente.

#### 3.1.4. pH do tampão

A ligação de uma molécula com o sítio seletivo do MIP é altamente dependente do pH, uma vez que essa variável pode refletir no estado de ionização da molécula, bem como das terminações ligantes presentes no sítio seletivo. Contudo, em se tratando de amostras complexas, o ideal é que o meio seja tamponado para evitar mudanças significativas do pH. Dessa forma, empregou-se um tampão fosfato na concentração de 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Essa concentração foi otimizada no Capítulo 2 para a adsorção de nicotina em amostras de urina e foi também adotada nesse capítulo

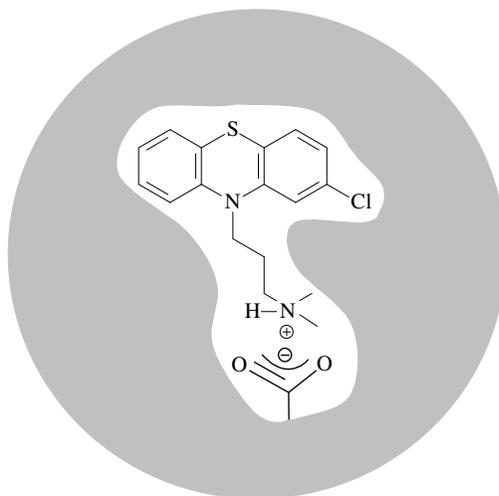
como condição de trabalho. Por outro lado, o valor do pH foi estudado entre 6,0 e 8,0 e os resultados demonstraram que o melhor sinal analítico foi obtido para pH 6,0 (área integrada de 0,216 e 0,244  $\text{min}^{-1}$  para clorpromazina e perfenazina, respectivamente). Para valores maiores de pH (6,5, 7,0, 7,5 e 8,0) houve uma diminuição gradativa do sinal analítico. Porém, ressalta-se que a adição do tampão, bem como a fixação do pH, causaram um deslocamento no tempo de retenção dos dois fármacos como mostrado na Figura C3-6. Como pode ser observado, o tempo de corrida foi minimizado de *ca.* 10 min em um meio sem tampão (ver Figura C3-5), para *ca.* 6 min em um meio tamponado pH 8,0 (ver Figura C3-6).



**Figura C3-6:** Separações obtidas empregando-se diferentes pH do tampão.

Esse fato talvez pode ser atribuído à modificação na natureza das interações entre os fármacos e o MIP devido à presença de íons fosfato oriundos do tampão, bem como pelo ajuste do pH. Entretanto, pode-se afirmar que a adição de tampão e a fixação do pH foram mais importantes no aumento da frequência analítica do que no aumento da sensibilidade propriamente dita. Assim, o pH 7,0 foi selecionado como condição de trabalho. Cabe ressaltar que o nitrogênio do grupo propilamina da clorpromazina apresenta um  $\text{pK}_a$  de 9,3 [24], encontrando-se protonado no pH de

7,0. Por outro lado, a terminação carboxila do monômero funcional (pKa 4,7, [25]) encontra-se desprotonada, resultando em uma interação eletrostática entre a clorpromazina (carregada positivamente) e a terminação carboxila do polímero (carregada negativamente), como mostrado na Figura C3-7.



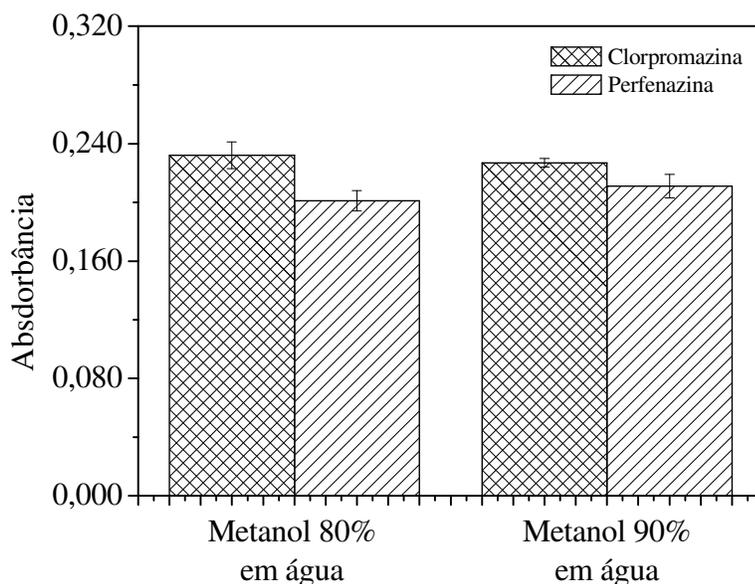
**Figura C3-7:** Esquema da possível interação entre a clorpromazina e o MIP em pH 7,0.

### 3.1.5. Solução de lavagem

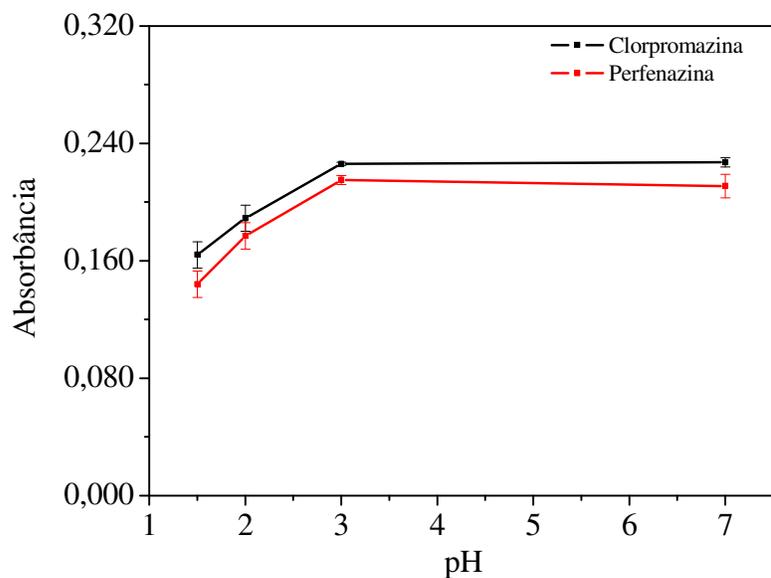
Em procedimentos de extração empregando MIP, a seletividade é altamente dependente da solução de lavagem. Essa solução tem como objetivo eliminar interferentes retidos pela coluna MIP, obtendo-se assim melhores separações. Especificamente nesse trabalho, é importante destacar que a separação não é tão eficiente como em HPLC convencional, devido ao maior tamanho de partículas da fase estacionária. Assim, é de extrema importância que a etapa de lavagem consiga eliminar os interferentes, permanecendo ligados ao MIP somente os analitos de interesse. Esta necessidade faz com que a otimização da solução de lavagem se torne uma das etapas mais importantes para o sucesso da metodologia proposta. A estratégia para o estudo desta variável consiste no aumento da força de eluição da solução até o ponto em que a mesma comece a eluir os próprios analitos. Nesse

caso, avaliou-se uma mistura água:metanol nas proporções de 1:4 e 1:9 (v/v), com o pH da parte aquosa, ajustado em 6,0 sem tampão. Os resultados mostraram não haver diferença significativa entre os sinais analíticos para as duas soluções (ver Figura C3-8), e, por isso, foi adotada para futuros experimentos a condição água:metanol 1:9 (v/v).

O pH da água usada no preparo da solução de lavagem também foi avaliado entre 1,5 e 7,0, sendo que o ajuste do mesmo foi feito empregando-se HCl e NaOH. Como pode ser visto na Figura C3-9, para pH 2,0 houve uma diminuição de *ca.* 17% no sinal analítico em relação ao pH 3,0. Para valores entre 3,0 e 7,0 não houve diferença nos sinais analíticos. Esse fato pode ser explicado pela menor força iônica da solução e pela restrita capacidade do meio em protonar o MIP e o analito, causando sua eluição por repulsão eletrostática. Assim, optou-se pelo pH 2,0 com o objetivo de minimizar, ao máximo, as interferências.



**Figura C3-8:** Sinais analíticos (área) obtidos para clorpromazina e perfenazina empregando-se soluções de lavagem água (pH 7,0):metanol 1:9 e 1:4 (v/v).



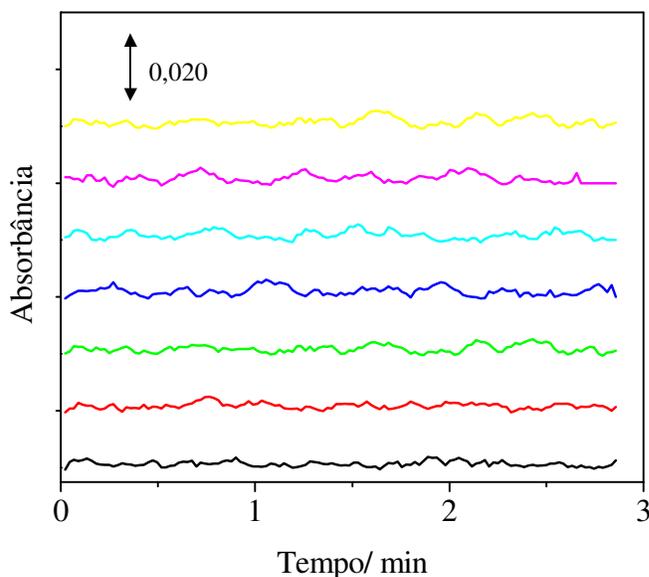
**Figura C3-9:** Efeito do pH da fração aquosa da SL no sinal analítico.

### 3.2. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido empregada no método proposto foi adaptada do trabalho de Madej *et al.* [23]. A única modificação foi o aumento do volume de urina de 1 para 5 mL com o objetivo de aumentar a sensibilidade. A alcalinização do meio foi feita adicionando-se um volume menor (1 mL) de uma solução mais concentrada de NaOH ( $4 \text{ mol L}^{-1}$ ), resultando na mesma concentração final da amostra proposta por Madej *et al.* [23].

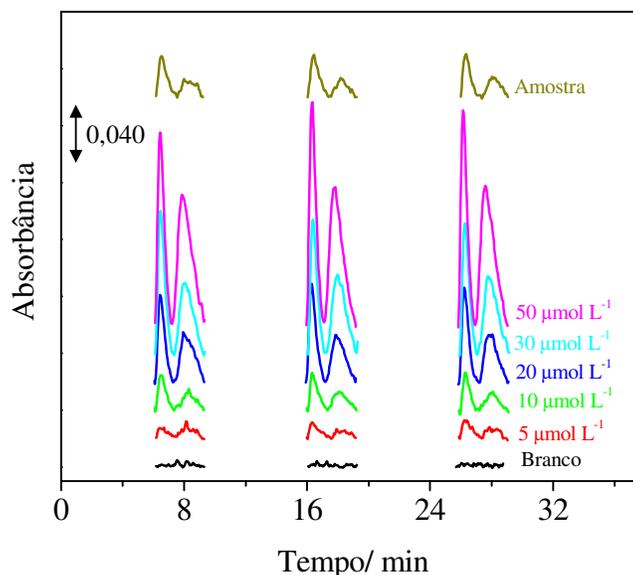
### 3.3. Figuras de mérito e aplicações

Com o objetivo de reproduzir a influência da matriz mediante os processos de extração das amostras de urina, os padrões da curva analítica foram preparados na presença de uma mistura de sete amostras de urina de indivíduos que não usam fenotiazínicos. Além disso, os sinais analíticos destas sete amostras foram obtidos individualmente (após uma LLE), e, como mostrado na Figura C3-10, nenhum pico foi observado .



**Figura C3-10:** Sinais obtidos na medida de sete amostras de urina de indivíduos que não utilizam fenotiazínicos. Todas as amostras foram inicialmente submetidas a uma LLE.

A faixa de concentrações de clorpromazina e perfenazina nas curvas analíticas foi de 5,0 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e os coeficientes de correlação foram maiores que 0,996 (cinco níveis de concentração,  $n = 3$ ) para ambos os fármacos. A Figura C3-11 apresenta os sinais obtidos para o branco, para os padrões da faixa analítica, bem como para uma amostra de urina fortificada com clorpromazina e perfenazina, respectivamente. O limite de quantificação foi de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para clorpromazina e perfenazina, e calculado de acordo com as recomendações da IUPAC [26]. A frequência analítica do sistema foi de 6  $\text{h}^{-1}$  (sem contar a etapa de LLE). As precisões intra-ensaio e inter-ensaio (Tabela C3-2) foram obtidas empregando-se uma amostra de urina adicionada de três níveis de concentração de clorpromazina e perfenazina (10, 30 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), e analisada no mesmo dia ( $n = 5$ ) e em dias diferentes ( $n = 3$ ), respectivamente (Tabela C3-2).



**Figura C3-11:** Separações para o branco analítico, padrões de 5, 10, 20, 30 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de clorpromazina e perfenazina, e uma amostra de urina adicionada de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos fármacos. O branco analítico e os padrões da curva foram preparados em “pool” de urina de indivíduos que não tomam os medicamentos.

A exatidão foi comprovada pela comparação das concentrações de clorpromazina e perfenazina em amostras de urina fortificadas, obtidas pelo método proposto e por HPLC. O método cromatográfico apresentou faixa analítica de 5 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de quantificação de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para ambos os fármacos (clorpromazina e perfenazina). O coeficiente de correlação foi maior que 0,998 e as precisões (inter e intre-ensaio) foram todas menores que 10% (para todos os pontos da curva analítica).

Os resultados são apresentados nas Tabelas C3-3 C3-4. O teste  $t$  foi usado para a comparação dos resultados, sendo que os mesmos foram estatisticamente semelhantes, ao nível de 95% de confiança.

**Tabela C3-2:** Precisão intra-ensaio e inter-ensaio obtida com amostras de urina de indivíduos que fazem uso de fenotiazínicos, fortificadas em três níveis de concentração.

Padrões/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Precisões/ %			
	Clorpromazina		Perfenazina	
	Intra-ensaio (n = 5)	Inter-ensaio (n = 3)	Intra-ensaio (n = 5)	Inter-ensaio (n = 3)
10	6	13	9	12
30	7	9	5	9
50	6	10	7	12

**Tabela C2-3:** Determinação de clorpromazina em amostras de urina fortificadas, pelo sistema proposto (n = 3) e por HPLC (n = 3). NA: não analisada.

Amostra	Adição/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sistema proposto/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação/ %	HPLC/ $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	5	$4,7 \pm 0,7$	94	$4,5 \pm 0,1$
2	5	$4,3 \pm 0,6$	86	NA
3	10	$10,9 \pm 0,4$	109	$9,2 \pm 0,6$
4	10	$10 \pm 1$	100	$9,3 \pm 0,1$
5	15	$14 \pm 1$	93	NA
6	15	$15 \pm 1$	100	NA

**Tabela C2-4:** Determinação de perfenazina em amostras de urina fortificadas, pelo sistema proposto (n = 3) e por HPLC (n = 3). NA: não analisada.

Amostra	Adição/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sistema proposto/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação/ %	HPLC/ $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	5	$5,4 \pm 0,5$	108	$4,5 \pm 0,1$
2	5	$5,7 \pm 0,2$	114	NA
3	10	$9,1 \pm 0,5$	91	$9,2 \pm 0,6$
4	10	$10 \pm 1$	100	$9,1 \pm 0,2$
5	15	$14,2 \pm 0,6$	95	NA
6	15	$15 \pm 1$	100	NA

## 4. CONCLUSÕES

A presença de concomitantes sempre é o principal problema para o monitoramento de fármacos em amostras biológicas. Grande parte das metodologias da literatura faz uso de uma etapa inicial de extração, seguida da separação dos compostos por cromatografia. Uma alternativa é empregar materiais seletivos na etapa de extração, possibilitando, com isso, que as separações cromatográficas sejam menos resolvidas e mais rápidas. Dessa forma, esse trabalho permitiu a quantificação de clorpromazina e perfenazina em amostras de urina, por meio de uma extração seletiva usando MIP, seguida de uma separação cromatográfica a baixa pressão e alta velocidade.

Algumas vantagens do método proposto podem ser enfatizadas como a velocidade de análise e o baixo custo quando o sistema é comparado a técnicas de separação comerciais como HPLC. Uma boa seletividade foi obtida, já que nenhum interferente foi observado na análise de amostras de urina. Por outro lado, a sensibilidade do método não foi tão boa quando comparada a outras técnicas. Entretanto, é importante destacar que o método permite a quantificação de clorpromazina e perfenazina em urina em níveis terapêuticos e tóxicos, respectivamente.

Verificou-se também que um MIP sintetizado para clorpromazina foi capaz de reter perfenazina mesmo havendo diferença estrutural entre as moléculas. Assim, conclui-se que, embora os MIP sejam considerados materiais altamente seletivos, as condições de extração e lavagem se apresentam como fatores limitantes na seletividade desses polímeros.

Por fim, foi possível separar fenotiazínicos empregando-se uma coluna analítica com partículas de C18 entre 32 e 53  $\mu\text{m}$ . Obviamente, a eficiência de

separação não foi comparada a HPLC, mas o emprego de uma extração seletiva eliminou os interferentes, resultando em cromatogramas com somente os sinais dos analitos. Por outro lado, essa coluna com partículas maiores permitiu o trabalho com vazões mais altas, garantindo, assim, uma maior velocidade de análise dos fármacos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Larini, *Toxicologia*, 3 ed., Manole, São Paulo, 1997.
- [2] J. N. Love, J. A. Smith, R. Simmons, Are one or two dangerous? Phenothiazine exposure in toddlers, *J. Emerg. Med.* 31 (2006) 53.
- [3] N. A. Buckley, I. M. Whyte, A. H. Dawson, Cardiotoxicity more common in thioridazine overdose than with other neuroleptics, *Clin. Toxicol.* 33 (1995) 199.
- [4] R. J. Baldessarini, F. I. Tarazi, Fármacos e o tratamento dos transtornos psiquiátricos. In: J. G. Hardman, L. E. Limbird (Eds), *Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica*, McGraw, Rio de Janeiro, Brasil, 2003, p. 330.
- [5] B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, Photochemically induced fluorescence determination of biomedically important phenothiazines in aqueous media at different pH values, *Anal. Chim. Acta* 290 (1994) 27.
- [6] B. Laassis, M. Maafi, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, Fluorimetric and photochemically induced fluorimetric determination of ethopropazine, levomepromazine, thioproperazine and trifluoperazine, *Anal. Lett.* 30 (1997) 1541.
- [7] Y. Li, W. Niu, J. Lu, Sensitive determination of phenothiazines in pharmaceutical separation and biological fluid by flow injection chemiluminescence method, *Talanta* 71 (2007) 1124.
- [8] A. Mounsey, D. Strachan, F.J. Rowell, V. Rowell, J.D. Tyson, Direct determination of some phenothiazine sedatives in greyhound urine by fluoroimmunoassay, *Analyst* 121 (1996) 955.
- [9] T. Aman, A. Ali, I. Khokhar, A. Rashid, Spectrophotometric determination of some antipsychotic phenothiazines, *Mikrochim. Acta* 126 (1997) 295.

- [10] R. Wang, Y. Lu, Kinetic spectrophotometric method for determination of perphenazine based on monitoring the oxidation intermediate by applying a stopped-flow technique, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2005) 791.
- [11] C. C. Nascentes, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, Continuous photometric method for the screening of human urines for phenothiazines, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 275.
- [12] F. Belal, S. M. El-Ashry, I. M. Shehata, M. A. El-Sherbeny, D. T. El-Sherbeny, Differential-pulse polarographic determination of some N-substituted phenothiazine derivatives in dosage forms and urine through treatment with nitrous acid, *Mikrochim. Acta* 135 (2000) 147.
- [13] F. J. Lara, A. M. Garcia-Campana, L. Gamiz-Gracia, J. M. Bosque-Sendra, F. Ales-Barrero, Determination of phenothiazines in pharmaceutical formulations and human urine using capillary electrophoresis with chemiluminescence detection, *Electrophoresis* 27 (2006) 2348.
- [14] J. Li, F. Zhao, H. Ju, Simultaneous determination of psychotropic drugs in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 57.
- [15] M. L. Olmos-Carmona, M. Hernández-Carrasquilla, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of veterinary tranquilizers in urine: evaluation of method performance, *J. Chromatogr. B* 734 (1999) 113.
- [16] M. A. Saracino, M. Amore, E. Baioni, C. Petio, M. A. Raggi, Determination of selected phenothiazines in human plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with coulometric detection, *Anal. Chim. Acta* 634 (2008) 308.
- [17] E. Tanaka, T. Nakamura, M. Terada, T. Shinozuka, C. Hashimoto, K. Kurihara, K. Honda, Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 854 (2007) 116.
- [18] E. C. Figueiredo, L. R. Souza, C. S. Magalhães, C. Wisniewski, P. O. Lucas, A homemade autosampler/injector commutator for flow injection analysis, *J. Autom. Methods Manag. Chem.* 2006 (2006) 1.
- [19] W. Niu, N. Feng, F. Nie, J. Lu, Investigating the post-chemiluminescence behavior of phenothiazine medications in the luminol-potassium ferricyanide system: molecular imprinting-post-chemiluminescence method for the determination of chlorpromazine hydrochloride. *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 153.
- [20] P. A. G. Cormack, A. Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 173.

- [21] C. R. T. Tarley, M. D. T. Sotomayor, L. T. Kubota, Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação, *Quim. Nova* 28 (2005) 1076.
- [22] B. Sellergren, A. J. Hall, Fundamental aspects on the synthesis and characterisation of imprinted network polymers, In: B. Sellergren (Ed), *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2001, p. 557.
- [23] K. Madej, M. Kala, M. Waźniakiewicz, LC and non-aqueous CE determination of phenothiazines in autopsy samples, *Chromatographia* 62 (2005) 533.
- [24] R. Joshi, T. K. Ghanty, T. Mukherjee, Reactions and structural investigation of chlorpromazine radical cation, *J. Mol. Struct.* 888 (2008) 401.
- [25] Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations (INCHEM), <<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/79414.pdf>>, Acessado 06-01-2008.
- [26] Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, *Analyst* 112 (1987) 199.

# CONCLUSÕES GERAIS

Os polímeros de impressão molecular certamente se evidenciam como sorventes promissores em aplicações analíticas. Várias moléculas são compatíveis com os MIP, devido às suas diversas composições em termos de reagentes/estratégias de síntese. Contudo, as reais potencialidades desses polímeros frente à complexidade de algumas amostras, ainda são escassas na literatura, devido a problemas freqüentes de seletividade. Assim, é importante salientar que a seletividade dos MIP é dependente, não somente da presença de sítios específicos de reconhecimento, mas, também, das etapas de extração, lavagem e eluição. Essas etapas analíticas devem ser bem otimizadas, levando em consideração a sensibilidade e a seletividade à molécula alvo (analito). Esse fato é de grande importância porque permite ao analista dosar o grau de seletividade da extração. Como exemplo, quando o objetivo é extrair uma molécula específica para análise por uma técnica pouco seletiva, deve-se sempre buscar a maior seletividade possível dos polímeros como apresentado nos Capítulos 1 e 2 dessa Tese. Por outro lado, quando o objetivo é extrair mais de uma molécula (como no Capítulo 3), deve-se empregar uma estratégia de lavagem mais suave. Essa flexibilidade na extração, estende o campo de aplicação desses polímeros tanto para técnicas pouco seletivas como espectrofotometria, como também para técnicas de separação como cromatografia.

Outra vantagem relevante dos MIP é certamente a sua longa vida útil devido à compatibilidade com diversos solventes, soluções ácidas ou alcalinas e também pela alta resistência térmica. Assim, por meio de uma etapa de condicionamento, a vida útil desses polímeros pode ser estendida, permitindo que os mesmos sejam empregados em sistemas “on-line” onde uma única coluna pode ser usada por diversos meses.

Especificamente para a análise de amostras biológicas, as vantagens dos MIP frente a outros sorbentes se sobressaem, uma vez que a presença de metabólitos do analito e compostos endógenos sempre se destacam como principais interferentes nessas determinações, mesmo para técnicas cromatográficas.

Outro importante ponto a ser ressaltado é que os MIP certamente podem ser empregados como elementos de seletividade na extração de analitos em amostras complexas, permitindo, assim, a quantificação desses analitos por técnicas pouco seletivas como espectrofotometria.

Finalmente, o desenvolvimento desta Tese nos permitiu concluir que a tecnologia de impressão molecular certamente é uma ferramenta vantajosa para a busca por seletividade em Química Analítica. Entretanto, somente a presença de sítios específicos de reconhecimento não é garantia de extrações altamente seletivas. A síntese de um MIP específico para uma molécula é apenas a primeira etapa importante para a elaboração de uma extração seletiva, sendo fundamentais as etapas posteriores que sucedem a síntese. Assim, pode-se dizer que os sítios específicos de reconhecimento estão presentes nos MIP. Contudo, cabe ao analista evidenciar a seletividade desses polímeros por meio da escolha das melhores condições de extração.