

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESE DE DOUTORADO

NANOREATORES BIOMIMÉTICOS À PEROXIDASE BASEADOS EM MIP: UMA ESTRATÉGIA PROMISSORA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Wilney de Jesus Rodrigues Santos

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Campinas - SP Agosto de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Sa59n	Santos, Wilney de Jesus Rodrigues. Nanoreatores biomiméticos à peroxidase baseados em MIP: uma estratégia promissora para determinação de compostos fenólicos / Wilney de Jesus Rodrigues Santos Campinas, SP: [s.n], 2009.
	Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.
	Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	 Polímeros com impressão molecular. Compostos fenólicos. 3. Biomimético. Peroxidase. I. Kubota, Lauro Tatsuo. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Biomimetic nanoreactors to the based peroxidase in MIP: a promising strategy for determination of phenolics compounds

Palavras-chaves em inglês: Molecularly imprinted polymer, Phenolics compounds, Biomimetic, Peroxidase

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota (orientador), Prof. Dr. Lúcio Angenes (IQ-USP), Profa. Dra. Hideko Yamanaka (IQ-UNESP), Profa. Dra. Inez Valeria Pagotto Yoshida (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Pedro Luiz Onófrio Volpe (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 04/08/2009

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu:

Tempo de nascer e tempo de morrer, Tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou; Tempo de matar e tempo de curar; Tempo de chorar e tempo de edificar; Tempo de chorar e tempo de rir; Tempo de prantear e tempo de saltar de alegria; Tempo de espalhar pedras e tempo ajuntar pedras; Tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar; Tempo de buscar e tempo de perder; Tempo de guardar e tempo de itar fora; Tempo de rasgar e tempo de coser; Tempo de ficar calado e tempo de falar; Tempo de amar e tempo de aborrecer; Tempo de guerra e tempo de paz". Eclesiastes 3: 1-8.

DEDICATÓRIA

A DEUS

Pela oportunidade de chegar até mais esta etapa. Ele tem me abençoado todos os dias da minha vida. 'Pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém.'

A MEUS PAIS

Leonel e Valdeci

Por mais uma vez terem me proporcionado o apoio e a confiança necessários para seguir adiante. Foi por eles que hoje cheguei até aqui!

A MEUS IRMÃOS

Walsely, Walseliny, Wesley e Wilsileny

Pelo incentivo e apoio prestados durante esse período.

Á TODOS MEUS FAMILIARES

Que me escutaram, incentivaram, acompanharam meu trabalho ou simplesmente tentaram entender o que eu faço aqui

Quero muito agradecer uma pessoa por tudo que ela me proporcionou com sua atenção, carinho e amizade... Esta extraordinária alma, nunca olha a quem ajuda... sempre faz com dedicação e amor... *E queria agradecer a você por tudo que me ajudou neste trabalho que não é* só meu. é nosso... *Você é uma daquelas pessoas raras com um* objetivo único de dar alegrias as pessoas que lhe cercam... você que sempre está pronto a ajudar não importando quem... quero agradecer de coração por tudo que você me ajudou a realizar... Que Deus pague tudo isso... pois com certeza nunca poderei pagar tanta gentileza... obrigada por tudo... Meu amigo Phabyanno Rodrigues Lima

> "Ser amigos é pra sempre, como eterno é nosso Deus Como amigos nós diremos: até breve, não adeus. Eu agora vou partir sob a mão do Pai seguir. Mas, amigos nada vai nos separar..."

A Murilo Santhiago e ao Caio Nakavaki de Oliveira também meu agradecimento especial, pela amizade, apoio, brincadeiras, zelo, vontade e dedicação árdua aos trabalhos experimentais realizados durante o meu doutorado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lauro T. Kubota (UNICAMP), agradeço pelo período de convívio, ensinamentos de forma segura, pela dedicação, oportunidade, conselhos, incentivo durante minha vida acadêmica e pela paciência demonstrada durante os 3 anos de doutorado;

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley (UNIFAL), pela co-orientação no decorrer do trabalho com valiosas discussões, as quais foram importantíssimas para o bom andamento das atividades;

Ao Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka (UFMA) e Prfa. Dra. Sônia Maria Carvalho Neiva Tanaka (UFMA), meu especial agradecimento pela amizade, incentivo no decorrer desse doutorado e por ter acreditado tanto na minha pessoa, pois sem a ajuda deles não estaria aqui concretizando mais este sonho.

Ao Prof. Dr. Flávio Damos (UFVJM) e Profa. Dra. Rita Luz (UFVJM), por ter me acolhido em sua casa no momento em que mais precisava e também pelas valiosas discussões e incentivo no início das atividades do doutorado, meus sinceros agradecimentos;

Aos ex- e atuais colegas, companheiros e amigos do LEEDS com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado;

A meus amigos do GEA: Esloany, Laura, Sisi, Daisy, André Antonelli, Lorival, André Gâmbaro, Carol, Rodrigo, Salomão, Marcos, Caio, Emily, Biza, Rosalyn, Jonathas, Stefano e Gabriel, pelas horas que passamos juntos, pelas orações e brincadeiras durante anos de convívio;

A meus amigos que em São Luis deixei mais mesmo a distância me acompanharam como Sandra, Junior, Wilde, Gladson, Gleiciany, Elisangela, Andrade, Bianca, Geovani, Jotakerles, João Nirond, Roque, Joyna, Caroline e todos os amigos de São Luis que torceram por mim.

Aos amigos que fiz aqui, como Edvânia Pontes (pelas comidinhas gostosas), Carol e família, Bruno Batista, Ana Paulo Rodrigues, Brunno Rodrigues, José Rui Reys, Jonathan, a todos agradeço pela amizade e apoio;

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Onófrio Volpe, pela ajuda no momento mais importante durante o curso de doutorado;

Aos colegas do Laboratório de Quimiometria em Química Analítica – LQQA;

Aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, em especial a Izabel Aquino Calasso, Izabel Ribeiro Filippi e Miguel da Silva Morel (CPG) e Mário (mecânica fina) pela atenciosa e amigável forma com que sempre se dirigem aos alunos; Aos funcionários da biblioteca do IQ da UNICAMP, cuja eficiência só nos faz enriquecer;

À UNICAMP pela logística e por ter me proporcionado no período inicial do meu doutorado subsídios necessário para minha estada em Campinas, meu eterno agradecimento;

À FAPESP pela bolsa e auxílio concedidos;

Enfim, a todos, que de uma forma direta ou indireta colaboraram com este projeto, os nossos mais sinceros agradecimentos.

CURRICULUM VITAE

Wilney de Jesus Rodrigues Santos

I. Formação Acadêmica I.1. Graduação

I.1.1. Licenciatura em Química

Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís-MA Título da Monografia: Sensor Biomimético para Determinação de Compostos Fenólicos: Eletrodos Modificados com Ftalocianina de

Manganês, (MnPc).

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Carvalho Neiva Tanaka Início: agosto de 1999/Conclusão: agosto de 2003. Local: São Luís – MA

I.2. Pós-Graduação

I.2.1. Mestrado em Química Analítica

Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís-MA Título da Dissertação: Determinação de Nitrito Sobre Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com Camadas Alternadas de Tetra-(N-Metil-4-Piridil)-Porfirina de Ferro (III) e Metaloftalocianinas Tetrassulfonadas

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Carvalho Neiva Tanaka

Início: setembro de 2003/Conclusão: setembro de 2005. Local: São Luís – MA

I.2.2. Doutorado em Ciência

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP Título de Tese: Nanoreatores biomiméticos à peroxidase baseados em MIP: uma estratégia promissora para determinação de compostos fenólicos

Orientador: Prof. Dr. Lauro T. Kubota

Início: março de 2006/Conclusão: agosto de 2009. Local: Campinas - SP

II.1.1. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; HOEHR, N. F.; KUBOTA, L. T. Synthesis and application of a peroxidase-like molecularly imprinted polymer based on hemin for selective determination of serotonin in blood serum. *Analytica Chimica Acta*, 631, 2009, 170-176.

II.1.2. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T. Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode. *Food Chemistry*, 113, 2009, 1206-1211.

II.1.3. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 2009, 820-825.

II.1.4. SANTOS, V. S.; SANTOS, W. J. R.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Speciation of Sb(III) and Sb(V) in meglumine antimoniate pharmaceutical formulations by PSA using carbon nanotube electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50, 2009, 151-157.

II.1.5. SANTOS, W. J. R.; SOUSA, A. L.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DAMOS, F. S.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, A. A. Manganese phthalocyanine as a biomimetic electrocatalyst for phenols in the development of an amperometric sensor. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 2009, 1180-1187.

II.1.6. SANTHIAGO, M.; LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; KUBOTA, L. T. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached on nanoestructured platform for NADH electrooxidation. *Electrochimica Acta*, 2009, *in press* (aceito).

II.1.7. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. An amperometric sensor based on electrochemically triggered reaction: Redox-active Ar NO/Ar NHOH from 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the low voltage cysteine detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612, 2008, 87-96.

II.1.8. SOUSA, A. L.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N. Amperometric sensor for nitrite based on copper tetrasulphonated phthalocyanine immobilized with poly-1-lysine film. *Talanta*, 75, 2008, 333-338.

II.1.9. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Electrocatalytic activity of 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the *L*-glutathione detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 2008, 758-764.

II.1.10. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; GOULART, M. O. F.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T. Alternating layers of iron(III) tetra(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin and copper tetrasulfonated phthalocyanine for amperometric detection of 4-nitrophenol in nanomolar levels. *Electroanalysis*, 20, 2008, 2333-2339.

II.1.11. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Electrochemical investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and redox-active $(NC)_2C_6H_3$ NHOH/ $(NC)_2C_6H_3$ -NO from 4-nitrophthalonitrile $(NC)_2C_6H_3$ -NO₂-modified electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 24, 2008, 448-454.

II.1.12. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. A catalytically active molecularly imprinted polymer that mimics peroxidase based on hemin: application to the determination of p-aminophenol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 2007, 1919-1929.

II.2. Artigo Submetido Durante o Doutorado

II.2.1. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. MIP-based nanoreactor biomimetic to peroxidase: Synthesis, characterization and kinetic Studies. *Journal of Chemical Catalysis. A, Chemical*, (Submetido).

II.3. Participação em Eventos Técnico-Científicos Durante o Doutorado

II.3.1. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Estudo cinético de polímeros biomiméticos a peroxidase com impressão molecular de substratos fenólicos. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II.3.2. SANTHIAGO, M.; LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; KUBOTA, L. T. Detecção eletrocatalítica de *L*-cisteína empregando sistema multicomponente nanoestruturado a base de MWCNT/PEI/NPAu. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II.3.3. SANTHIAGO, M.; LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de uma interface nanoestruturada para detecção eletrocatalítica de NADH. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II.3.4. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; SANTHIAGO, M.; OLIVEIRA, A. B.; ERNSTHAUSER, D.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Configuração de uma plataforma a base de nanotubos de carbono com TCNP para oxidação eletrocatalítica de NADH. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II.3.5. SANTOS, V. S.; SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Emprego de eletrodo de pasta de nanotubo de carbono para determinação de antimônio (III) por redissolução potenciométrica. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil.

II.3.6. TANAKA, A. A.; SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T. Amperometric determination of 4-aminophenol with a catalytically active molecularly imprinted polymer. 60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - 60th ISE. Beijing, China, 2009.

II.3.7. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Sensor amperométrico a base de camadas alternadas de FeT₄MPyP e CuTSPc para determinação de 4-nitrofenol em níveis nanomolar. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.8. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Sensor

amperométrico a base de pasta de carbono modificada com 4-nitroftalonitrila para quantificação de cisteína (CySH). XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.9. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Determinação amperométrica de l-glutationa (GSH) com eletrodo de pasta de carbono modificada com 4-nitroftalonitrila. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.10. DUARTE, J. C.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Sensor amperométrico altamente sensível para O_2 empregando os complexos FeTSPc/FeT4MPyP imobilizados por LBL. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.11. DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S.; LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; KUBOTA, L. T. Comportamento eletroquímico e supramolecular entre SAM de mono-(6-deoxi-6-mercapto)-β-ciclodextrina e antidepressivos tricíclicos. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.12. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de um sensor amperométrico para determinação de NO_2^- usando eletrodo de carbono vítreo modificado com camadas alternadas de FeT₄MPyP e CuTSPc. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.13. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Um polímero com impressão molecular (MIP) a base de ferriprotoporfirina para mimetizar a peroxidase. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.14. SOUSA, A. L.; SANTOS, W. J. R.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N. Sensor amperométrico a base de ftalocianina tetrassulfonada de cobre imobilizada em poli-l-lisina para detecção de nitrito. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II.3.15. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Determinação de *L*-Glutationa (GSH) em extratos de levedura com sensor amperométrico a base de 4-nitroftalonitrila. 31^ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31^ª SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II.3.16. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Síntese, caracterização e cinética de um polímero com impressão molecular a base de hemina para o reconhecimento seletivo do 4-APh. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31^a SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II.3.17. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de um MIP-hemina cataliticamente ativo capaz de mimetizar o sítio ativo da HRP para o reconhecimento da serotonina. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31^a SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II.3.18. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T. Detecção de nitrito em amostra de alimento com eletrodo de carbono vítreo modificado com camadas alternadas de FeT₄MPyP/CuTsPc. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31^a SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II.3.19. BETA, B. E. L.; SANTOS, V. S.; SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Emprego de eletrodo de pasta de nanotubo de carbono (NTC) para determinação simultânea de Zn(II), Cd(II) e Pb(II) por potenciometria de redissolução. 31^ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31^ª SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II.3.22. SANTOS, V. S.; NACANO, L. R.; SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Especiação de Sb (III) e Sb (V) por redissolução potenciométrica em medicamento empregando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono. 1 Encontro Brasileiro sobre Especiação Química – 1 EspeQBrail. São Pedro, São Paulo, Brasil, 2008.

II.3.23. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Polímero com impressão molecular (MIP) a base de ferriprotoporfirina para mimetizar a peroxidase: Aplicação na determinação de serotonina. 14º Encontro Nacional de Química Analítica - 14º ENQA. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2008.

II.3.24. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Catalytic investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and Ar-NO/Ar-NHOH redox-active couple from 4-nitrophthalonitrile-modified electrode. VI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – VI SBPMat. Natal, Rio Grande do Norte, 2008.

II.3.25. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Molecularly imprinted polymer catalytically active based on hemin to mimic peroxidase: application for the p-aminophenol determination. VI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – VI SBPMat. Natal, Rio Grande do Norte, 2008.

II.4. Prêmios resultantes de Atividade Científica.

II.4.1. Comunicação Premiada apresentada no 1 Encontro Brasileiro sobre Especiação Química - EspeQ-Brasil-2008. Título da comunicação: Especiação de Sb (III) e Sb (V) por redissolução potenciométrica em medicamento empregando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono.

II.4.2. Comunicação Premiada apresentada no 12 Encontro Nacional de Química Analítica – 12 ENQA-2003. Título da comunicação: Sensor amperométrico a base de ftalocianinas de manganês para determinação para determinação de compostos fenólicos.

II.4.3. Comunicação Premiada apresentada no VI Encontro de Química do Maranhão - VI ENQUIMA-2002. Título da comunicação: Ftalocianina de ferro como receptor na detecção de dopamina em sensores sem enzima.

RESUMO

Título: "Nanoreatores biomiméticos à peroxidase baseados em MIP: uma estratégia promissora para determinação de compostos fenólicos".

Autora: Wilney de Jesus Rodrigues Santos

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota

Palavras-chave: Polímeros com impressão molecular, compostos fenólicos, biomimético e peroxidase.

O presente trabalho descreve as aplicações de nanoreatores biomiméticos à peroxidase baseados em MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") como uma ferramenta promissora para determinação de substâncias de grande interesse biológico e ambiental, tais como os compostos fenólicos (4-aminofenol e serotonina). Neste sentido, a síntese dos MIPs foi baseada na polimerização convencional em "bulk". Cada polímero foi sintetizado a partir do ácido metacrílico (monômero funcional), etileno glicoldimetilacrilato (reagente de ligação cruzada). 2'2-azo-bis-isobutironitrila (iniciador radicalar), em presença de Fe(III)protoporfrina(IX) (hemina) como centro catalítico, o qual é responsável pela mimetização do sítio ativo da peroxidase, criando portanto, um polímero com impressão molecular cataliticamente ativo para o reconhecimento do 4-aminofenol e serotonina (moléculas molde). Além disso, a fim de avaliar a seletividade do material, foram preparados, paralelamente, polímeros sem a impressão molecular (NIP - Non Imprinted Polymers) e também na ausência de hemina. Os MIPs foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho, área superficial específica, volume específico dos poros, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura. Parâmetros cinéticos, incluindo valores de velocidade máxima, V_{max} e constante aparente de Michaelis-Menten, K_m foram obtidas pelo gráfico de Lineweaver-Burk. Para aplicação analítica, em amostras de água e soro sanguíneo, sistemas amperométricos foram otimizados através de análise multivariada.

ABSTRACT

Title: "Biomimetic nanoreactors to the based peroxidase in MIP: a promising strategy for determination of phenolics compounds".

Author: Wilney de Jesus Rodrigues Santos

Adviser: Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: Molecularly imprinted polymer, phenolics compounds, biomimetic and peroxidase.

The present work describes the applications of biomimetic nanoreactor to the based peroxidase in molecularly imprinted polymers (MIP) as a promising tool for determination of substances of high biological and environmental interest, such as phenolic compounds (4-aminophenol and serotonin). In this sense, the synthesis of MIPs was based on the conventional polymerization in bulk. Each polymer was synthesized from methacrylic acid (functional monomer), ethylene glycol dimethacrylate (cross-linking reagent), 2,2'-azobis-isobutyronitrile (initiator), the presence of in Fe(III)protoporphyrin(IX) (hemin) as a catalytic center, which is responsible for the mimic of the active site of peroxidase, creating therefore, a molecularly imprinted polymer active catalytically for the recognition of the 4aminophenol and serotonin (template molecules). Furthermore, in order to evaluate the selectivity of the material, were prepared, parallel, polymers without the molecular impression (NIP - Non imprinted polymers) and also in the hemin absence. The MIPs were characterized by the techniques of infrared spectroscopy, specific surface area, specific pore volume, thermogravimetric analysis, scanning electron microscopy. Kinetic parameters, including values for maximum rate, V_{max} and Michaelis-Menten apparent constant, K_m were obtained from Lineweaver-Burk plots. For analytical application, in samples of water and blood serum, amperometric systems were optimized through multivariate analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-APh	4-aminofenol
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ABDV	Azo-bis-dimetilvaléronitrila
Ag/AgCl	Eletrodo de prata cloreto de prata
AIBN	2,2'-azo-bis-iso-butironitrila
ANOVA	Análise de Variância
b	Coeficiente angular da curva analítica
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BPO	Peróxido de benzoíla
СР	Concentração do peróxido
СТ	Concentração do tampão
DIP	1,3 diisopropenil benzeno
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
DVB	p-divinilbenzeno
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EDGMA	Etileno glicol dimetacrilato
Fe(III)PPIX	Fe(III)protoporfirina(IX) (Hemina)
HEPES	[N-(2-hidroxietil(piperazina)-N,N'-bis(2-ácido
	etanosulfônico)]
HPLC	High performance liquid chromatography
I_p	Corrente de pico
ÎTO	Indium tin oxide
$\dot{J}_{ m s}$	Densidade de corrente
KH ₂ PO ₄	Dihidrogeno fosfato de potássio
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAA	Ácido metacrílico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Molecularly Imprinted Polymer
MIP-4-APh	Polímero com impressão molecular para o 4-
	aminofenol
MIP-5-HT	Polímero com impressão molecular para a
MCD	serotonina
MSK	Metodologia de superficie de resposta

Na ₂ HPO ₄	Hidrogeno fosfato de sódio
NIP	Non imprinted polymers
PTMOS	Feniltrimetoxissilano
S _{BET}	Área superficial específica
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Solid phase extraction
TDMA	Tetrametileno dimetacrilato
TEOS	Tetraetoxissilano
TGA	Termogravimetria
TRIM	Trimetilpropano trimetacrilato
TRIS	Tris [(hidroximetil)aminometano
VA	Volume da amostra
V _{máx}	Velocidade máxima
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VT	Vazão do tampão
σ	Desvio padrão

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	XXXI
LISTA DE FIGURAS	XXXIII
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL	1
I. Introdução Geral	3
I.1. Compostos fenólicos: importância e perspectivas	6
I.1.1. Interesse clínico-farmacológico	6
I.1.2. Impacto ambiental	8
I.2. Métodos empregados para determinação de compostos fenólicos	10
I.3. Polímeros com Impressão Molecular (MIP)	13
I.3.1. História dos MIP	13
I.3.2. Estratégias e procedimentos de impressão molecular	14
I.3.3. MIP como material biomimético	23
I.3.4. MIP em Química Analítica	27
I.3.5. Emprego de MIP para determinação de compostos	29
fenólicos	
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	33
II. Objetivos	35
II.1. Geral	35
II.2. Específicos	35
CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL	37
III. Parte Experimental	39
	39
III.1. Reagentes utilizados e soluções	
III.2. Equipamentos	39
III.2.1. Medidas voltamétricas e amperométricas	39
III.2.2. Medidas de área superficial específica (S _{BET})	40
III.2.3. Medidas de volume específico dos poros e diâmetro médio dos poros	41
III.2.4. Medidas de microscopia eletrônica de varredura	41
III.2.5. Medidas de infravermelho	41

III.2.6. Medidas termogravimétricas	
III.3. Preparação dos MIPs	42
III.3.1. Síntese do MIP para o 4-APh	42
III.3.2. Síntese do MIP para 5-HT	45
III.4. Sistema de determinação amperométrica das moléculas moldes	48
III.5. Reação catalítica dos MIPs	50
III.6. Determinação de $K_{\rm m}$ e $V_{\rm máx}$ para os MIPs	51
III.7. Procedimento de Otimização	52
III.7.1. Procedimento usado no planejamento fatorial fracionário	52
III.7.2. Procedimento para aplicação do planejamento Doehlert	53
III.8. Aplicação em amostras reais	53
CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
IV. Resultados e Discussão	57
IV.1. Síntese dos polímeros com impressão molecular	57
IV.2. Caracterização dos polímeros	59
IV.2.1. Espectroscopia de infravermelho	59
IV.2.2. Microscopia eletrônica de varredura e porosimetria de sorção de nitrogênio	61
IV.2.3. Termogravimetria	63
IV.3. Constante de Michaelis-Menten para os MIPs	64 66
IV.5. Otimização da determinação amperométrica para o	00 70
MIP-4-APh e MIP-5-HT	10
IV.5.1. Otimização multivariada	72
IV.5.1.1. Planejamento fatorial fracionário para o MIP-4-APh	72
IV.5.1.2. Planejamento Doehlert para o MIP-4-APh	79
IV.5.1.3. Planejamento fatorial fracionário para o MIP-5-HT	85
IV.5.1.4. Planejamento Doehlert para o MIP-5-HT	91
- Planejamento Doehlert 1	92

- Planejamento Doehlert 2	94
IV.6. Estudo de seletividade para o MIP-4-APh e MIP-5-HT	99
IV.7. Características analíticas dos métodos	101
IV.8. Aplicação dos Métodos	105
CAPÍTULO V. CONCLUSÕES	109
V. Conclusões Gerais	111
CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
VI. Referências Bibliográficas	115
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS	133
VII. Perspectivas	135

LISTA DE TABELAS

I.INTRODUÇÃO

Tabela I.1Monômeros tipicamente usados no preparo dos 17MIP.

I V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Tabela IV.1Porosimetriadospolímerosimpressoenão63impressos
- Tabela IV.2Variáveis com seus respectivos níveis empregados73no planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹.
- Tabela IV.3Combinações empregadas no planejamento 74
fatorial fracionário 25-1 e seus resultados para o 4-
APh.
- Tabela IV.4Estimativasdoscontrastesobtidasparao75planejamentofatorialfracionário2⁵⁻¹tendocomorespostaanalíticaa correntedepicodo4-APh.
- Tabela IV.5Combinações empregadas na matriz de Doehlert e80resultados para o 4-APh.
- Tabela IV.6Análise de variância dos dados apresentados na82Tabela IV.5.
- Tabela IV.7Variáveis com seus respectivos níveis empregados86no planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹ para oMIP-5-HT.
- Tabela IV.8Combinaçõesempregadasnoplanejamento87fatorial fracionário2⁵⁻¹ e seus resultados para o5-HT.
- Tabela IV.9Estimativasdoscontrastesobtidasparao88planejamentofatorialfracionário2⁵⁻¹tendocomorespostaanalíticaa correntedepicodo5-HT.
- Tabela IV.10Matriz de Doehlert para o planejamento 1.92

Tabela IV.11	Matriz de Doehlert para o planejamento 2.	95
Tabela IV.12	Análise de variância dos dados apresentados na Tabela IV.10.	97
Tabela IV.13	Análise de variância dos dados apresentados na Tabela IV.11.	98
Tabela IV.14	Efeito de interferentes na determinação do 4-APh.	100
Tabela IV.15	Efeito de interferentes na determinação do 5-HT.	100
Tabela IV.16	Percentuais de recuperação de 4-APh obtidos para as amostras analisadas.	106
Tabela IV.17	Resultados obtidos para determinação de 5-HT em amostras de sangue.	107

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO GERAL

- Figura I.1 Estrutura química da serotonina ou 5-7 hidroxitriptamina (5-HT).
- Figura I. 2 Estrutura química do (a) 2-aminofenol ou orto- 9 aminofenol, (b) 3-aminofenol ou meta-aminofenol e (c) 4-aminofenol ou para-aminofenol.
- Figura I. 3 Representação esquemática do processo de 15 formação de MIP.
- Figura I. 4 Exemplos de estrutura química de reagentes de 20 cruzada usualmente empregados ligação na impressão molecular. (a) etileno glicol dimetacrilato (EDGMA); (b) tetrametileno dimetacrilato (TDMA); (c) p-divinilbenzeno (DVB); (d) 1,3 diisopropenil benzeno (DIP); (e) N, O, bisacriloil-L-fenilalaninol; (f) 2,6 bisacriloilamidopiridina; (g) 1,4 fenileno diacrilamina; (h) 1,4 diacrilol; (i) N, N'- metileno bisacrilamida; (j) anidroeritrotol dimetacrilato; (l) *isopropilenebis* (*i*,4-*fenileno*) *dimetacrilato;* (*m*) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM).
- Figura I. 5 Estruturas moleculares dos iniciadores radicalares 22 empregados na síntese de MIP. (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-bis-dimetilvaléronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzíla; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).

III PARTE EXPERIMENTAL

- Figura III. 1 Representação do procedimento de preparo do MIP- 43 4-APh.
- Figura III. 2 VPD para 4-APh após as extrações com 44 metanol/ácido acético. Condições: faixa de potencial variando de -0,5 a 0,6 V, velocidade varredura de 40 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 70 mV e eletrólito

suporte NaClO₄ 0,1 mol L^{-1} .

- *Figura III. 3 Representação do procedimento de preparo do MIP 46 e reconhecimento do 5-HT.*
- Figura III. 4 VPD para 5-HT após as extrações com 47 metanol/ácido acético. Condições: faixa de potencial variando de -0,5 a 0,9 V, velocidade varredura de 40 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 70 mV e eletrólito suporte NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹.
- Figura III. 5 Representação esquemática do sistema FIA para os 49 MIPs. (A) etapa de amostragem, (B) etapa de injeção. L = alça do eluente; C = mini-coluna; WE = eletrodo de trabalho (carbono vítreo); AE = eletrodo auxiliar (platina) e RE = eletrodo de referência (Ag/AgCl).
- *Figura III.6 Mecanismo do processo do para ativação do MIP na* 51 *coluna.*

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura IV.1	Espectros IR dos polímeros antes (a) e após (b) a extração do 4-APh e 5-HT.	60
Figura IV.2	Micrografias eletrônica de varredura do MIP-4- APh (a), MIP-5-HT (b) e NIP (c).	62
Figura IV.3	Curvas de TGA dos polímeros antes (a) e após (b) a extração do 4-APh e 5-HT.	64
Figura IV.4	Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos K _m e V _{máx} .	66
Figura IV. 5	Processo do mecanismo para ativação do MIP na coluna.	67
Figura IV.6	(A) Amperogramas de detecção das espécies reduzidas de 4-APh. Condições: $[4-APh] = 500$ μ mol L ⁻¹ , volume da amostra = 100 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min ⁻¹ , $[H_2O_2]$ na mini-coluna =	69

300 μ mol L⁻¹, [Tampão TRIS-HCl] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0 e potencial aplicado de -0,1 V. (B) Amperogramas de detecção das espécies reduzidas de 5-HT. Condições: [5-HT] = 500 μ mol L⁻¹, volume da amostra = 200 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, [H₂O₂] na mini-coluna = 300 μ mol L⁻¹, [Tampão TRIS-HCl] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0 e potencial aplicado de -0,1 V.

- Figura IV.7 Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para 71 efeito do potencial na corrente de pico para: (A) MIP-4-APh. Condições: $[4-APh] = 500 \ \mu mol \ L^{-1}$, volume da amostra = 100 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 300 μmol L^{-1} , $[Tampão \ TRIS] = 0,1 \ mmol \ L^{-1}$, pH 8,0. (B) MIP-5-HT. Condições: $[5-HT] = 500 \ \mu mol \ L^{-1}$, volume da amostra = 200 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 300 $\mu mol \ L^{-1}$, [Tampão TRIS-HCI] = 0,1 mmol L^{-1} , pH 8,0.
- Figura IV.8 Influência de diferentes eletrólitos na redução 79 do 4-APh. Condições: $[4-APh] = 500 \ \mu mol \ L^{-1}$. Volume da amostra = 100 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 378 μ mol L^{-1} , [Tampões] = 0,1 mmol L^{-1} , pH 8,0.
- Figura IV.9 Superfície de resposta obtida à partir das 85 matrizes de Doehlert para o sistema do MIP-4-APh.
- Figura IV.10 Influência de diferentes Tampões na redução do 5-HT. Condições: $[5-HT] = 500 \ \mu mol \ L^{-1}$, volume da amostra = 200 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 310 μ mol L^{-1} , $[TRIS-HCl] = 0,1 \ mmol \ L^{-1}$, pH 8,0.
- Figura IV.11 Superfície de resposta obtida a partir dos 94 resultados da Tabela IV.10 para a otimização de pH e CP, tendo-se como resposta analítica a corrente de pico para o sistema do MIP-5-HT.

- Figura IV.12 Superfície de resposta obtida a partir dos 96 resultados da Tabela IV.11 para a otimização de VA e CT, tendo-se como resposta analítica a corrente de pico.
- Figura IV.13 (A) Fiagrama obtido para a construção da curva analítica. A = branco; B = 0,8; C = 9,5; D = 90; $E = 250 \ e \ F = 500 \ \mu mol \ L^{-1}$. Condições: Volume da amostra = 100 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min-1, [H₂O₂] na mini-coluna = 378 μ mol L^{-1} , [TIS-HCl] = 0,1 mmol L^{-1} , pH 8,0. (B) Curva analítica.
- Figura IV.14 (A) Fiagrama obtido para a construção da curva 104 analítica. A = branco; B = 1,0; C = 50; D = 100; $E = 500, F = 750 e G = 1000 \mu mol L^{-1}.$ Condições: Volume da amostra = 200 µL, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, [H₂O₂] na minicoluna = 310 µmol L⁻¹, [TRIS-HCl] = 0,1 mmol L^{-1} , pH 8,0. (B) Curva analítica.



I. Introdução Geral

A importância da determinação de compostos fenólicos é reconhecida principalmente na área da saúde e na área ambiental. Nas últimas décadas, compostos fenólicos vêm causando problemas de poluição ambiental de maneira generalizada, praticamente em todas as partes do mundo. Como conseqüência eles estão presentes no meio aquático como resultado de sua ampla aplicação na área industrial. São gerados a partir da produção de plásticos, corantes, fármacos, antioxidantes, papéis, produtos de reação de processos de cloração, assim como, na indústria petroquímica (POCURULL et al., 1995b; GALCERAN e JÁURECGUI, 1995; RODRÍGUEZ et al., 2000). Ocorrem também, como produtos de biodegradação de substâncias húmicas, taninos e ligninas, sendo que a presença destes em alimentos limita sua digestibilidade (SHARMA et al., 1998). Podem ainda, ocorrer como produtos de biodegradação de herbicidas e pesticidas organofosforados, sendo que, os principais produtos de degradação são o clorofenol e o nitrofenol, respectivamente (PUIG e BARCELÓ, 1996). Já na área biológica e farmacológica os compostos fenólicos que mais têm sido pesquisados são os neurotransmissores. Estes são mensageiros químicos que transmitem uma mensagem de um neurônio a outro. Esta transmissão ocorre pela secreção de um neurotransmissor a partir de um neurônio que se liga por um receptor específico localizado na membrana da célula mãe (MICHAEL e WIGHTMAN, 1999). Esta interação entre o neurônio e o neurotransmissor é mais importante caminho de comunicação entre os neurônios, por isso, os neurotransmissores possuem um importante papel no sistema nervoso central (MICHAEL e WIGHTMAN, 1999; DAMIER et al., 1999).

Assim, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção destas espécies em diferentes matrizes é de grande interesse. Desta forma, a determinação de compostos fenólicos é efetuada normalmente por meio de técnicas espectrofotométricas, cromatográficas (incluindo as modalidades de cromatografia líquida de alta eficiência e gasosa) e eletroquímicas (FIAMEGOS *et al.*, 2000; VIÑAS *et al.* 2000; LIU *et al.* 2004; HERNÁNDEZ *et al.* 1993).

A versatilidade das técnicas eletroquímicas e os menores limites de detecção comumente obtidos em relação às espectrométricas, bem como seus baixos custos de aquisição quando comparados às técnicas cromatográficas fazem com que sejam amplamente aplicadas na determinação de compostos fenólicos. Ademais, com dispositivos eletroquímicos adequados pode-se monitorar on-line o analito na amostra (KIM e LEE, 2003).

Assim, o desenvolvimento de novas estratégias visando melhorar ainda mais o desempenho das técnicas eletroquímicas se mostra promissor. Neste contexto, novos materiais têm sido propostos com êxito para a melhoria de sensibilidade e/ou seletividade baseados na confecção de sensores modificados química ou biologicamente (biossensores ou imunossensores) (CUI *et al.*, 2002; LEITE *et al.*, 2003; GRENNAN, *et al.*, 2003).

Este campo de pesquisa contribui sobremaneira na solução de diversos problemas analíticos comumente encontrados na determinação de compostos fenólicos em matrizes complexas. Entre OS sensores modificados biologicamente, imunossensores destacam pela considerável OS se seletividade, os quais são baseados nos princípios de extração em fase sólida de imunoensaios envolvendo a interação antígeno-anticorpo; entretanto, devese salientar o alto custo dos anticorpos e problemas de estabilidade a eles

atribuídos (MARTÍN-ESTEBAN, 2001; STEVENSON, 1999). Face a estas limitações, tem sido reportada na literatura uma nova abordagem de materiais poliméricos seletivos conhecidos como MIP (do inglês, Molecularly Imprinted Polymers), que simulam a interação antígeno-anticorpo (MASQUE *et al.*, 1998; MAYES e MOSBACH, 1997).

Os MIP são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, de tal forma que um sólido rígido polimérico é formado ao redor do futuro analito. Após a polimerização a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito. Com esta estratégia, o resultado é uma "memória" molecular na matriz polimérica, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo do analito. O domínio dessa tecnologia vem permitindo uma melhor seletividade demonstrando vantagens em relação aos imunossorventes em relação à estabilidade química, capacidade de sorção e reprodutibilidade no preparo do polímero.

Com base nas observações efetuadas, o presente trabalho de Tese contempla o desenvolvimento de novos nanoreatores biomiméticos à peroxidase baseados em MIP, onde trata sem dúvida de uma contribuição significativa para a química analítica, principalmente devido o fato de existir, na literatura, uma escassez de dados sobre o emprego de MIP como materiais sintéticos visando à determinação de compostos fenólicos.

I.1. Compostos fenólicos: importância e perspectivas I.1.1. Interesse clínico-farmacológico

As áreas da saúde possuem grande interesse no desenvolvimento de pesquisas que envolvam os compostos fenólicos, pois alguns destes compostos pertencem à classe dos neurotransmissores. Os neurotransmissores são substâncias importantes tanto para o sistema nervoso central (SNC) como para o sistema nervoso periférico.

Recentemente, eles têm atraído muito a atenção, pois foram obtidos progressos valiosos em sua caracterização, sua localização e elucidação dos eventos moleculares que os envolvem. A quantificação destas substâncias no tecido cerebral e nos fluidos extra-celulares vem sendo usada para desenvolver estratégias de tratamento e em diagnósticos de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas.

Os neurotransmissores são conhecidos também como aminas biogênicas como as catecolaminas – dopamina, epinefrina e norepinefrina – e as indolaminas, como a serotonina. Dentre estes neurotransmissores, a serotonina vem destacando por ser intensamente pesquisada em vários setores, tais como medicina e química. Ela é derivada do triptofano e, nos mamíferos, é sintetizada no cérebro e em outros tecidos como, por exemplo, no fígado. Esta molécula está largamente distribuída na natureza, sendo encontrada na maioria dos vertebrados e invertebrados, no veneno de vespas e escorpiões, e em vários frutos, tais como abacate, banana, berinjela, maracujá, tomate, abacaxi e outros (ZANINI e OGA, 1994). Na sua biossíntese, primeiro o triptofano sofre uma hidroxilação pela ação da triptofano hidroxilase, formando o 5hidroxitriptofano, que sofre então uma descarboxilação formando a serotonina (Figura I.1). É também conhecida por 5-HT ou 5-hidroxitriptamina.



Figura I.1: Estrutura química da serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT).

Os neurotransmissores podem ser inibitórios ou excitatórios, sendo a serotonina um neurotransmissor excitatório. No sistema nervoso central, ela está relacionada com a temperatura corporal, percepção sensorial, sono e controle hormonal. Interfere na fisiopatologia de desordens afetivas, estados hiperagressivos e na depressão. Foi sugerida sua participação também nas disfunções mentais, principalmente a esquizofrenia (ZANINI e OGA, 1994; VALLE *et al.*, 1991). Em estudos sobre o envelhecimento humano, a serotonina tem sido estudada em conjunto com os demais neurotransmissores nas funções da memória, pensamento, emoção e comportamento. Uma das explicações para a depressão é o abaixamento no nível de serotonina, que resulta em um humor deprimido (COHEN, 1995).

Os níveis normais de serotonina no organismo estão entre 0,5 - 1,3µmol L⁻¹. Valores acima destes podem indicar a presença de carcinomas. Estes tumores secretam grandes quantidades de serotonina e produzem manchas cutâneas por vaso dilatação.

I.1.2. Impacto ambiental

O interesse no impacto ambiental provocado pelos compostos fenólicos tem sido evidenciado devido à sua ampla aplicação em processos industriais. Por exemplo, o pentaclorofenol é utilizado como conservante para madeiras, o fenol é gerado a partir da degradação de lignina na produção de papel, os clorofenóis originados de fenóis em água clorada e produtos de degradação de herbicidas. Os nitrofenóis são formados fotoquimicamente na atmosfera pela queima de combustíveis e como produtos de degradação de pesticidas organosfosforados, os aminofenóis são intermediários específicos na produção de corante (PULGARIN e KIWI, 1995; POCURULL *et al.*, 1995a; GALCERAN e JÁUREGUI, 1995; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000). Dependendo dos substituintes presentes no anel fenólico, muitos destes compostos tornam-se altamente tóxicos e possivelmente mutagênicos (PUIG e BARCELÓ, 1996; EDER *et al.*, 1998).

Dentre os aminofenóis (Figura I.2), o 4-aminofenol (4-APh) tem sido amplamente utilizado como matéria-prima de reagentes químicos e intermediário importante em vários campos, tais como medicina, corantes, borracha, petróleo, produtos farmacêuticos, ópticos, fotográficos, resinas, vernizes, perfumes, etc (MITCHELL, 1992). Alguns resíduos produzidos por estes processos conduzem a graves problemas de poluição ambiental. Desde 1994, a produção total de 4-APh em todo o mundo vem aumentando em 5% em cada ano, assim a quantidade de águas residuais provenientes das fábrica com 4-APh aumenta. O 4-APh é muito nocivo para o corpo humano devido à sua semelhança estrutural com a anilina e fenol, além de ser um produto metabólico do inseticida paration. Portanto, é de grande importância monitorar
vestígios do 4-APh em águas residuais industriais e em águas ambientais (KAROUSOS e REDDY, 2002).



Figura I.2: Estrutura química do (a) 2-aminofenol ou orto-aminofenol, (b) 3aminofenol ou meta-aminofenol e (c) 4-aminofenol ou para-aminofenol.

É importante ressaltar que vários fenóis substituídos, como cloro e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos (ORTEGA et al., 1994; RUSSELL e BURTON, 1999; CAMPANELLA, 1993; ZIMMERMANN e TAYLOR-MAYER, 1985). Mesmo em pequenas concentrações (<1 ppm), compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes (ORTEGA et al., 1994). Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepato-tóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese (ORTEGA et al., 1994; RUSSELL e BURTON, 1999). Assim, fenóis e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da EC (Comissão Européia) (VINCENT et al., 1991) e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana) (SVITEL e MIERTUS,

1998; EPA, 1984; EPA, 1980). A diretiva (80/778 EEC) (NISTOR *et al.*, 1999; PUIG *et al.*, 1996) da Comunidade Econômica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de 0,5 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹ para fenóis individuais. O Instituto Nacional Norte-Americano para Saúde e Segurança Ocupacional, estabeleceu como limite de exposição a concentração de 5 mg L⁻¹ para o fenol e, por exemplo, 2,3 mg L⁻¹ para isômeros de cresol. Assim, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção e determinação simultânea destas espécies químicas em diferentes matrizes é de grande interesse (PUIG *et al.*, 1996).

I.2. Métodos empregados para determinação de compostos fenólicos

Como são vários os compostos fenólicos de interesse, seja ambiental, clinico ou farmacêutico, atualmente, existem diversos métodos que podem ser aplicados para análise desses compostos em diferentes matrizes. Serão descritos os principais métodos pata determinação de 4-aminofenol (4-APh) e serotonina (5-HT), os quais serão representantes dos compostos fenólicos de interesse ambiental e biológico, respectivamente.

Uma revisão na literatura revelou que muitos métodos têm sido apresentados para a análise de 4-APh, como métodos gravimétricos (YESILADA *et al.*, 1991), titrimétricos (FOGG *et al.*, 1970; SRIVASTAVA *et al.*, 1985), UV (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1993), espectrofotométricos (HEWALA, 1994; YESILADA, 1991; BLOOMFIELD, 2002), fluorimétricos (WANG *et al.*, 1993; ZHU e TAN, 1995), cromatográficos (LI *et al.*, 2002; LI e WANG, 1996; ZHANG *et al.*, 1998; RAU *et al.*, 1991; SCHULTZ, 1984), eletroforéticos capilares (ZHANG *et al.*, 1998), eletroquímicos (ARKADI *et al.*, 1995; LAU, 1989) entre outros.

Apesar de muitos desses procedimentos serem sensíveis, permitindo a quantificação do 4-APh abaixo do limite requerido pela legislação ambiental internacional, eles muitas vezes são lentos, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda da amostra, às vezes são caros e também necessitam de operadores hábeis.

Também tem sido usado no monitoramento ambiental do 4-APh, ensaio baseado em componentes biológicos, tais como enzimas (GHINDILIS, 1995; LAMAS-ARDISANA, 2008; YANG e KULKARNI, 2000) e os immunoensaios (NIWA, 1993; GHINDILIS *et al.*, 1998; TRAU *et al.*, 1997). Entretanto o número de enzimas que podem ser usadas para uma detecção seletiva é muito limitado, por isso o desenvolvimento de imunoensaios para a determinação de derivados fenólicos cresceu bastante nas últimas décadas.

Desta forma, imunoensaios usados para a determinação de 4-APh foram desenvolvidos de forma simples (NIWA, 1993; GHINDILIS *et al.*, 1998; TRAU *et al.*, 1997), ou acoplados a cromatografia líquida (STAIMER, 2001), permitindo limites baixos de detecção. No entanto, a principal desvantagem desse tipo de metodologia é a estabilidade do sistema, já que se trata de uso de espécies biológicas.

Para a determinação de 5-HT geralmente são utilizados os métodos espectrofotométricos (JIN *et al.*, 2008), eletroforéticos capilares (PETERSON *et al.*, 2004), cromatográficos com detecção eletroquímica (QU, 1997), fluorimetrica (YOSHITAKE *et al.*, 2001; YOSHITAKE *et al.*, 2003) e espectrometria de massas (GREGERSEN, 2008), mas como citado anteriormente, esses métodos não são sensíveis o bastante, requerem

instrumentos complicados e caros, consomem muito tempo, usam reagentes tóxicos, ou fornecem altos limites de detecção. No sentido de usar quantidades mínimas de reagentes e menores tempos de análise, métodos eletroquímicos envolvendo o desenvolvimento de sensores químicos também têm sido usados para o monitoramento do 5-HT (YAO *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2009; LI e LIN, 2007; WU *et al.*, 2003; ZENA *et al.*, 1998; ONI e NYOKONG, 2001; GOYAL *et al.*, 2007).

Assim, métodos eletroanalíticos possibilitam a realização de análises com maior versatilidade, baixo custo e simplicidade. No entanto, os principais materiais utilizados para a determinação desses compostos são materiais biológicos como enzimas, entre outros, os quais formam os denominados biossensores. Contudo, a principal desvantagem destas biomoléculas em sensores está associada à baixa estabilidade química e física, resultando em uma falta de estabilidade operacional e de armazenagem, razões pelas quais os receptores artificiais têm atraído interesse crescente.

Uma metodologia alternativa que envolve o uso de receptores artificiais é a de impressão molecular. A alta estabilidade e seletividade destes materiais surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de dispositivos biomiméticos. Desta forma, as vantagens oferecidas pelos polímeros com impressão molecular ficam bastante claras em relação às biomoléculas naturais. Com base no exposto, a seguir são descritas as estratégias que têm sido empregadas para uso e desenvolvimentos desses polímeros com impressão molecular.

I.3. Polímeros com Impressão Molecular (MIP)

I.3.1. História dos MIP

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

Tal interesse foi certamente influenciado por três fatos memoráveis da história da ciência: 1) a primeira teoria sobre as enzimas de Berzelius (1835), 2) a teoria dos receptores de Ehrlich (LIMBIRD, 2004) e 3) a teoria de formação dos anticorpos de Pauling (1940). Nessa última, Pauling preconizava que o antígeno se portava como uma molécula molde e os anticorpos eram modelados ao redor dessa molécula, gerando configurações complementares altamente seletivas (PAULING, 1940). Fundamentado nas notáveis idéias de seu mestre, Dickey (1949) sintetizou um adsorvente seletivo para molécula específica.

A partir daí, tornou-se de grande interesse elaborar materiais com seletividade atribuída principalmente à sua estrutura tridimensional complementar a da molécula molde. Em 1972, Wulff e Sarhan (1972) sintetizaram um polímero orgânico enantioseletivo para ácido glicérico, em que as interações entre tal molécula e os monômeros funcionais eram de natureza covalente. A principal característica desses polímeros era sua alta seletividade, como conseqüência da boa interação entre os monômeros funcionais e a molécula molde. Contudo, cabe ressaltar que o processo de retirada da molécula molde do sítio de ligação mostrou-se difícil, sendo necessário, em alguns casos, o emprego de condições drásticas de hidrólise. Na década de 1980, Arshady e Mosbach (1981) reportaram o primeiro artigo sobre um MIP que interagia com a molécula molde por meio de ligações nãocovalentes, permitindo que o processo de desligamento fosse suscetível a fatores como modificação do pH, força iônica, solvente, dentre outros. Por fim, Whitcombe *et al.* (1995) propuseram um novo MIP, onde a molécula molde e o monômero funcional interagiam por ligações covalentes no momento da síntese e, por ligações não-covalentes no momento de re-ligação (outras ligações da molécula molde com o sítio do MIP). Após a síntese, era necessária uma hidrólise para a retirada da molécula molde do sítio do MIP, permanecendo, nesse local, grupos ligantes capazes de interagir não-covalentemente com a molécula molde em futuras interações. Dessa forma, foi possível associar as vantagens inerentes às metodologias de síntese covalente e não-covalente.

A partir da década de 1990, observou-se um aumento exponencial do número de trabalhos sobre MIP, denotando sua importância em diversas áreas da ciência, com destaque para a química analítica, bioquímica e ciências farmacêuticas.

I.3.2. Estratégias e procedimentos de impressão molecular

O princípio da impressão molecular é baseado em três etapas principais (i) pré-arranjo do monômero ao redor da molécula molde (também referida como molécula chave, molécula alvo, molécula impressa, antígeno impresso ou analito), (ii) polimerização na presença de um reagente de ligação cruzada e (iii) remoção da molécula alvo por um processo de extração (GUPTA e KUMAR, 2008). Esse princípio da impressão molecular é mostrado na Figura I.3.



Figura I.3: Representação esquemática do processo de formação de MIP.

O primeiro passo para síntese dos MIP consiste em estabelecer criteriosamente a escolha do analito e do monômero funcional.

O analito necessita conter em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monômeros, a fim de formar uma espécie de complexo estável. Como já mencionado, a interação analitomonômero pode se dar por meio de ligação covalente ou não covalente, por meio de ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou por interação hidrofóbica (AL-KINDY *et al.*, 2000).

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

Por outro lado, polímeros preparados a partir de ligações não-covalentes freqüentemente apresentam diâmetros de partículas e sítios seletivos menos uniformes. Porém, apesar destas desvantagens, esta abordagem de preparo é mais utilizada, dada a maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes analitos (ANDERSSON *et al.*, 1984).

A escolha do monômero funcional deve ser criteriosamente embasada na complementaridade entre o mesmo e a molécula molde. Dessa forma, é comum o emprego de um monômero funcional doador de próton (caráter ácido) e uma molécula molde aceptora de próton (caráter básico), ou viceversa (TARLEY *et al.*, 2005).

Nesse contexto, dois monômeros funcionais se destacam, o ácido metacrílico e a 4-vinilpiridina, empregados para molécula molde básicas e ácidas, respectivamente. Contudo, outros também têm sido usados, sempre objetivando uma perfeita interação e conseqüente obtenção de sítios específicos e em alto número. A Tabela I.1 (TARLEY *et al.*, 2005) apresenta alguns monômeros funcionais, da qual todos são potenciais de interações iônicas, de ligação de hidrogênio e também de coordenação com a molécula molde.

Monômero funcional	Estrutura química
Ácido acrílico	ОН
Ácido meta-acrílico	ОН
Ácido p-vinilbenzóico	ОН
Ácido acrilamidosulfônico	NH SO ₃ H
Amino metacrilaminada	NH NR ₂
4-Vinilpiridina	
2-Vinilpiridina	N
4-Vinilimidazol	N
1-Vinilimidazol	
Acrilamida	NH ₂

Tabela I.1: Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP.

Outro ponto importante é a concentração. Para tal avaliação é importante ressaltar que a interação analito-monômero é governada por um processo em equilíbrio, quantidades superiores do monômero em relação ao analito (geralmente 4:1) devem ser empregadas com intuito de deslocar o equilíbrio, para formar maior quantidade de sítios específicos de reconhecimento (ANDERSSON *et al.*, 1984; MARTÍN-ESTEBAN, 2001).

O solvente é outro parâmetro importante na síntese de MIP que tem como finalidade solubilizar os reagentes da síntese, além de contribuir na formação adequada de poros (TARLEY *et al.*, 2005). Por outro lado, o solvente não deve interferir na formação do complexo monômero funcionalmolécula molde, uma vez que tal interferência pode conduzir à formação de sítios de ligação pouco seletivos e em pequeno número. Como a maioria das interações entre monômero funcional-molécula molde 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 voláteis conduzem à formação de boas estruturas de poros (alta área superficial) (CORMACK e ELORZA, 2004). Vale também ressaltar que polímeros pouco porosos apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular devido à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos (MARTÍN-ESTEBAN, 2001).

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 (MARTÍN-ESTEBAN, 2001). 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 moléculas molde, devido à necessidade das mesmas de apresentar caráter anfifílico (CARO, 2004; BAGGIANI, 2001).

O reagente de ligação cruzada na síntese de um MIP exerce diferentes funções. Ele é um dos fatores que responde pela estabilidade mecânica da matriz polimérica, e pela textura do material (CORMACK e ELORZA, 2004). Um grande número de reagente de ligação cruzada (Figura I.4) é compatível com impressão molecular, muitos dos quais são capazes de formar complexos com a molécula molde, atuando como monômero funcional.



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

Contudo, cabe destacar que o etileno glicol dimetacrilato tem sido o reagente de ligação cruzado 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 reagentes de ligação cruzada durante a síntese. Porém, o que se pode concluir, sob o ponto de vista da polimerização, é que são requeridas altas proporções de reagente de ligação

cruzada (SELLERGREN, 1989), de modo a acessar permanente os poros do polímero e, assim, gerar materiais com adequada estabilidade mecânica (CORMACK e ELORZA, 2004).

Para que possa ocorrer a reação de polimerização do reagente de ligação cruzada em torno do complexo molde-monômero funcional é acrescentado um iniciador radicalar ao meio.

O iniciador radicalar é responsável pela geração dos necessários radicais livres para que ocorra a polimerização, pois somente os reagentes de síntese (monômero funcional, molécula molde, reagente de ligação cruzada e solvente) comentados anteriormente não são suficientes. Assim, é indispensável o emprego de iniciadores radicalares em associação com estímulos físicos como temperatura e radiação UV. O 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) é o mais empregado na síntese dos MIP, mas outros também podem ser utilizados (GORMACK, 2004) (Figura I.5). A escolha destes reagentes é ditada pela natureza da interação do analito com o monômero. Se a interação ocorrer por ligação de hidrogênio, recomenda-se efetuar a polimerização em baixas temperaturas e, nestas circunstâncias, os iniciadores radicalares ativos fotoquimicamente são mais indicados (CORMACK e ELORZA, 2004).



Figura I.5: Estruturas moleculares dos iniciadores radicalares empregados na síntese de MIP. (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-bis-dimetilvaléronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzíla; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).

Vale lembrar que a capacidade de reconhecimento molecular do MIP deve ser avaliada em relação a um polímero não impresso (NIP), do inglês Non Imprinted Polymer. Este material é sintetizado da mesma forma que o MIP, exceto pela adição da molécula molde ao meio reacional. Desta forma, o NIP funciona como um polímero de controle uma vez que não apresenta sítios específicos de ligação (YAN e RAMSTRÖM, 2005).

Os MIP são preparados convencionalmente pelo método conhecido por polimerização em "*bulk*", onde a reação é realizada em sistema homogêneo. Esta reação é conduzida em frascos selados contendo monômero funcional, analito, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigênio sob fluxo de N_2 ou Ar e induzida com aquecimento e/ou radiação UV. O oxigênio deve ser eliminado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar (CORMACK e ELORZA, 2004). Por fim, o sólido polimérico resultante é moído, peneirado e submetido a uma lavagem com solvente para extração do analito, visando seu uso posterior (MASQUE, 1998; PRASAD e BANERJEE, 2002).

Apesar do método de polimerização em "*bulk*", ser considerado um método universal de preparo dos MIP, basicamente devido a sua simplicidade, o processo de quebra e trituração do polímero é laborioso e alguns sítios seletivos formados são parcialmente destruídos, o que diminui a capacidade seletiva de retenção do polímero (SELLERGREN, 1997; MARTÍN-ESTEBAN, 2001).

Diante destas considerações, novas concepções de preparo dos MIP são relatadas na literatura com intuito de produzir partículas com tamanhos uniformes. Ao contrário do método de polimerização em "*bulk*", cuja síntese é realizada num sistema homogêneo, a maioria dos novos métodos de preparo contemplam reações em sistemas heterogêneos, incluindo a polimerização por suspensão (MATSUI *et al.*, 1997), por precipitação (YE *et al.*, 1999) e por expansão em multi-etapas (HOSOYA, 1994).

Outros métodos de preparo dos MIP contemplam reações de polimerização dentro de poros de sólidos (sílica e resinas) (PLUNKETT e ARNOLD, 1995; YILMAZ *et al.*, 2002) e reações de polimerização sobre superfície modificada de suporte sólido (QUAGLIA *et al.*, 2001).

I.3.3. MIP como material biomimético

A designação desta recente e promissora área de estudo científico provém da observação da Natureza e procura estimular novas idéias para produzir sistemas sintéticos parecidos com os encontrados nos sistemas biológicos. Este estudo permite desenvolver ou aperfeiçoar metodologias e estratégias alternativas, encontrando nas estruturas moleculares do mundo natural um modelo perfeito de inspiração e imitação. Mas, quais seriam as vantagens de mimetizar a natureza?

Primeiramente os processos naturais são altamente seletivos e eficientes. Outra vantagem é que essas reações possuem um excelente aproveitamento energético e obtêm alto rendimento em todos os processos. Dessa forma, o grande potencial desses sistemas os tornam extremamente versáteis para a utilização em diversas áreas da química. Assim, o termo MIP como material biomimético refere-se àqueles MIP nos quais os elementos biológicos, usados nos biossensores convencionais, são substituídos por compostos ou materiais que permitem a ocorrência de interações de reconhecimento de forma seletiva para um determinado analito, de forma similar ao que ocorre com as espécies químicas de natureza biológica.

Neste sentido, por muitos anos a mimetização das enzimas tem sido motivo de inspiração para pesquisa. Suas propriedades únicas são atribuídas a sua estrutura tridimensional bem organizada que contém sítios catalíticos para ligação com a molécula alvo. Apesar da grande versatilidade e perspectivas positivas das enzimas, seu uso é muitas vezes limitado devido sua sensibilidade e instabilidade às mudanças de pH, temperatura, solventes orgânicos, etc.

Neste contexto, muitos cientistas investigaram o desenvolvimento de receptores sintéticos que imitam as habilidades moleculares de moléculas biológicas (anticorpos, enzimas, etc.) (WULFF, 195; RAMSTROM *et a.*, 1996). Esses receptores apresentam vantagens em relação aos materiais biológicos como, fácil preparo; baixo custo; possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra

disponível; resistência a ambientes adversos, como na presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão (TARLEY *et al.*, 2005).

Por isso, uma área que oferece grande potencial para minimizar os problemas acima descritos, e conseqüentemente, aumentar a aplicabilidade e eficiência desses sistemas, é a que compreende impressão molecular em associação com receptores artificiais, as metaloporfirinas. Por esta razão, essa nova tendência de pesquisa está relacionada à descoberta de novos materiais e inovações nos processos químicos catalíticos, procurando descobrir novos mecanismos mais seletivos e com maior sensibilidade.

Assim, as metaloporfirinas são hábeis em reproduzir e mimetizar diferentes reações mediadas por enzimas, principalmente reações de oxidação, pois são moléculas receptoras de elétrons, fundamentais na química de materiais moleculares onde são usados como materiais eletroativos. Essa similaridade é, sem dúvida, um grande incentivo para o estudo de reações catalisadas por esses complexos (TOMA, 1984; COTTON *et al.*, 1999; MEUNIER, 1992). E catalisá-las com os polímeros com impressão molecular, espera-se desenvolver novos materiais com características melhoradas.

Assim, somando-se as propriedades dos MIP com a alta seletividade e efeito catalítico dos complexos metálicos, torna-se possível a construção de dispositivos que apresentam alternativas promissoras, em detrimento às enzimas, aos anticorpos e receptores naturais. Por estas razões, esta metodologia pode se destacar por ser um amplo campo a ser explorado, pois poucos são os trabalhos que exploram a atuação desses receptores.

A estratégia de usar a ferriprotoporfirina IX (hemina) como um material sintético na síntese do MIP é para mimetizar a peroxidase. A hemina é um

grupo prostético importante da peroxidase. Devido às características estruturais únicas da hemina, seu uso é justificado pelo fato de atuar como grupo prostético da enzima, além de possuir grupos vinílicos necessários para polimerização e fazer interação com a molécula molde.

Esta característica garante boa seletividade e alta afinidade de ligação para o polímero à base de hemina em comparação aqueles que fazem uso apenas do ácido metacrílico como monômero funcional.

No trabalho desenvolvido por Cheng *et al.* (2004) o MIP foi sintetizado com o substrato ácido homovalínico (HVA) como molde e a heme introduzida como centro catalítico. As propriedades catalíticas foram estudadas sob condições aquosas cuja quantificação foi realizada por espectrofotometria, emissão de florescência e HPLC. Em outro trabalho, Cheng e Li (2006) estudaram o papel de cada reagente da síntese no reconhecimento molecular na atividade catalítica deste mesmo polímero.

Tong *et. al* (2002), realizaram estudos onde os MIP foram sintetizados com a protoporfirina de zinco como monômero funcional fluorescente e aplicados para o reconhecimento seletivo da histamina.

Desta forma, os métodos até então apresentados para a mimetização da peroxidase sintética, mostram o emprego de técnicas laboriosas das quais podem comprometer a rapidez dos experimentos. Todavia, o desenvolvimento de métodos acoplados às técnicas eletroquímicas para esses fins, se faz necessário, por ser um campo ainda pouco explorado.

I.3.4. MIP em Química Analítica

A tecnologia de impressão molecular tem sido amplamente empregada em diversas áreas, com destaque para a química analítica. O primeiro trabalho com emprego de MIP em química analítica é datado de 1972, onde Wulff e Sarhan (1972) descreveram a síntese do polímero com sítios seletivos para separação enantiomérica de racematos de açúcares.

Desde então, os referidos materiais vêm sendo amplamente empregados no preparo de amostras atuando em processos de extração em fase sólida (ANDERSSON, 2000) e microextração em fase sólida (KOSTER *et al.*, 2001), em técnicas de separação, tais como, cromatografia líquida de alta eficiência (HWANG e LEE, 2002), eletroforese capilar (SCHWEITZ *et al.*, 1997), eletrocromatografia capilar (SUEDEE *et al.*, 1999) e cromatografia em camada delgada (KRIZ e MOSBACH, 1995) visando, principalmente, a separação de espécies enantioméricas. Também, há um amplo campo de pesquisa dos MIP em associação com técnicas eletroanalíticas (CHOW *et al.*, 2002) enfocando o desenvolvimento de sensores químicos.

O primeiro sensor a base de MIP foi reportado em 1993 por Hedborg *et al.* (1993). 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.

Outros importantes sensores químicos são aqueles sensíveis à massa como a microbalança de cristal de quartzo (MALITESTA *et al.*, 1999). Quando se processa a passagem do analito pelo sistema, esse se liga seletivamente às cavidades do MIP causando um aumento da massa e, como conseqüência, uma diminuição da freqüência de oscilação (sinal analítico). Tai *et al.* (2005) propuseram 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. Feng *et al.* (2005) 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.

Embora, atualmente, as aplicações de MIP como sensores estejam em crescimento, o maior número de trabalhos encontrados ainda é nas ciências das separações. O trabalho de Fernandez-Llano *et al.* (2007) relatou a síntese de um MIP seletivo a diclofenaco empregando-se 2-(dimetilamino)etilmetacrilato 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.* (2007) 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 sangüíneo, sem nenhum tratamento prévio (e.g. precipitção de proteínas, filtração). A metodologia permitiu nas melhores condições de trabalho, a determinação de ácido úrico em concentrações de até 0,024 mg L⁻¹. Além disso, uma avaliação com moléculas estruturalmente semelhantes ao ácido úrico demonstrou haver maior afinidade do ácido úrico pelo MIP. Zurutuza *et al.* (2005) sintetizaram um MIP para benzoilecgonina, um metabólito da cocaína, empregando ácido metacrílico com o 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.

I.3.5. Emprego de MIP para determinação de compostos fenólicos

A literatura mostra um crescimento rápido no desenvolvimento de vários métodos, como pode ser observado, onde o MIP é empregado somente como um material adsorvente seletivo. Além disso, estudos dedicados para analitos de interesse ambiental e biológico, como os compostos fenólicos envolvendo MIP ainda são escassos na literatura se comparados com outras classes de compostos (drogas, pesticidas, etc.), sendo ainda, a maioria destes associados com desenvolvimento de fases estacionárias seletivas para HPLC ou como extratores sólidos para SPE (CARO, *et al.*, 2003; SCHWARZ *et al.*, 2004).

Neste contexto, destacaremos alguns trabalhos reportados na literatura referentes ao emprego de MIP na determinação de compostos fenólicos.

No trabalho efetuado por Masqué *et al.* (2000), os autores descrevem a extração on-line de 4-nitrofenol em amostras de água, seguido da separação cromatográfica por HPLC. A síntese do polímero foi realizada em acetonitrila empregando-se como "*template*" o 4-nitrofenol. Ressalta-se que a estratégia de síntese adotada neste trabalho é um exemplo de aplicação de MIP em amostras de água, cuja síntese é realizada em solvente orgânico aprótico.

Em outro trabalho, Caro *et al.* (2003) desenvolveram um sistema de extração em fase sólida com MIP acoplado a um cromatógrafo líquido para a determinação seletiva de 4-clorofenol e 4-nitrofenol em amostras de água na presença de 11 compostos fenólicos. A síntese e avaliação do desempenho extrator de MIP para 2,4,6-triclorofenol tem sido realizada por Schwarz *et al.* (2004). Neste trabalho foi demonstrado que o MIP sintetizado em diclorometano apresentou um caráter seletivo mais pronunciado para o 2,4,6-triclorofenol em detrimento a outros compostos fenólicos com estruturas similares.

Figueiredo *et al.* (2007), sintetizaram e caracterizaram 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 mmol L⁻¹, n=10) e uma freqüência analítica de 2,7 mmol L⁻¹, <5% e 15h⁻¹, respectivamente. A exatidão foi comprovada por comparação dos resultados obtidos pelo método proposto e por HPLC.

Tarley *et al.* (2006), desenvolveram um método de pré-concentração para o cloroguaicol empregando um sistema de análise em fluxo. O método proposto forneceu um fator de pré-concentração de 110 vezes e respectivos limites de detecção e quantificação de 27 e 78 nmol L⁻¹. A faixa linear esteve compreendida de 0,05 a 5,0 μ mol L⁻¹ (r > 0.999) enquanto a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (n=8) foi de 5,5 e 4,2 % para as respectivas concentrações de 1,0 e 5,0 μ mol L⁻¹. Outros parâmetros associados com o desempenho do sistema de pré-concentração em fluxo também foram avaliados incluindo a eficiência de pré-concentração de 27,5 min⁻¹ e índice de consumo de 0,09 mL. Para averiguar a aplicabilidade e exatidão do método, foram empregadas amostras de água potável e amostras de água de rio. Testes de adição e recuperação, com valores de recuperação variando de 93 a 112 % atestaram a validação do método para as amostras avaliadas.

Hsu *et al.* (2008), confeccionaram receptores adrenérgicos artificiais com impressão molecular em sílica para epinefrina. O MIP foi preparado pelo emprego de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos, onde a epinefrina foi impressa em um filme de sílica a partir da reação de hidrólise e condensação de feniltrimetoxissilano (PTMOS) e tetraetoxissilano (TEOS) sobre ITO. A afinidade da epinefrina para o filme impresso foi determinada pela corrente de oxidação demonstrando boa seletividade frente a vários compostos fenólicos com estruturas análogas.

Alizadeh *et al.* (2009), sintetizaram um MIP para determinação de *p*nitrofenol por pré-concentração utilizando um sensor voltametrico baseado em um eletrodo de pasta de carbono. O sensor apresentou uma faixa linear de resposta de 8 x 10⁻⁹ a $5x10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de 3 x 10⁻⁹ mol L⁻¹ e foi aplicado sucessivas vezes para determinação de *p*-nitrofrofenol em diferentes amostras de água.

Como foi observado, muitos dos sistemas desenvolvidos para determinação de compostos fenólicos utilizando MIP, empregam extração em

Wilney de Jesus Rodrigues Santos – Tese de Doutorado – IQ/VNICAMP

fase sólida, pré-concentração, mas outro campo de atuação dos MIP que deve ser expandido é o da mimetização de sistemas enzimáticos. Com o emprego de MIP como material catalítico, métodos seletivos e ainda mais sensíveis podem ser obtidos.

Alguns trabalhos empregam esta estratégia de protocolo, entretanto não focalizam a mimetização da peroxidase para a determinação de compostos fenólicos. Para isso, é necessário que substâncias redox apresentem propriedades que justifiquem sua utilização no desenvolvimento desse MIP para então serem aplicados em amostras de interesse.

Neste sentido, estes poucos trabalhos citados mostram que o emprego de MIP catalíticos e seletivos para compostos fenólicos ainda é um campo pouco explorado. Assim, o presente trabalho procura utilizar a versatilidade dos MIP associados com receptores artificiais para a análise de diferentes analitos em amostras biológicas e ambientais.



II. Objetivos

II.1. Geral

Este trabalho propõe o desenvolvimento de sistemas com nanoreatores biomiméticos à base de novos tipos de polímeros cataliticamente ativos preparados pela tecnologia de impressão molecular, contendo a Fe(III)protoporfirina(IX) (Hemina, Fe(III)PPIX) como centro catalítico para mimetizar a peroxidase visando o reconhecimento de espécies de interesse biológico e ambiental.

II.2. Específicos

Para atingir o objetivo proposto os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos

- i) Sintetizar dois diferentes MIPs contendo hemina como o centro catalítico. Um para o reconhecimento do 4-aminofenol (MIP-4-APh) e o outro para o reconhecimento da serotonina (MIP-5-HT) empregando o método de polimerização convencional (polimerização em "bulk");
- ii) Caracterizar os materiais sintetizados;
- iii) Avaliar parâmetros cinéticos, incluindo valores de velocidade máxima e constante aparente de Michaelis-Menten, para os MIPs;

- iv) Desenvolver o método amperométrico para a determinação do 4-APh e 5-HT;
- V) Otimizar a detecção amperométrica por meio de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta para os respectivos MIPs;
- vi) Verificar o desempenho seletivo e catalítico dos MIPs frente à detecção eletroquímica do 4-APh e 5-HT;
- vii) Aplicar os sistemas desenvolvidos com os dois difrentes MIPs (MIP-4-APh e MIP-5-HT), submetendo a amostras de água e soro sanguíneo fortificadas como os respectivos analitos.

CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL

III. Parte Experimental

III.1. Reagentes utilizados e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando água destilada/deionizada. Os reagentes, soluções e ácidos empregados estão descritos a seguir: Fe(III)protoporfirina(IX) (Hemina, Fe(III)PPIX), ácido metacrílico (MAA), etileno glicoldimetacrilato (EGDMA), 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), 4-cloro-2-metoxifenol, catecol, 4-cloro-3-metilfenol, 4-aminofenol, 2-cresol, serotonina, epinefrina, neuroepinefrina e dopamina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim - Alemanha). O metanol (grau HPLC) e o ácido acético foram adquiridos da Tedia (Brazil). O TRIS [tris(hidroximetil)aminometano], HEPES [(N-2-hidroxietil) piperazina-N-(2-ácido etanosulfonico)] foram adquiridos da Sigma (St. Louis - USA). Peróxido de Hidrogênio (Merck, Darmstadt - Alemanha). Diidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e hidrogeno fosfato de sódio (Na₂HPO₄) foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil).

III.2. Equipamentos

III.2.1. Medidas voltamétricas e amperométricas

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas com um potenciostato da Eco Chemie (Autolab® modelo PGSTAT-30) (Utrecht, Netherlands) controlado por um microcomputador com Software GPES 4.9, para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados. O sistema voltamétrico utilizado foi constituído de uma célula eletroquímica com capacidade para 5,0 mL com entrada para os eletrodos de referência (Ag/AgCl), eletrodo auxiliar (fio de platina em espiral) e eletrodo de trabalho (carbono vítreo).

Para o sistema amperométrico foi utilizada ainda uma cela eletroquímica de fluxo (tipo Wall-Jet) feita em acrílico para três eletrodos. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo (0,071 cm²); Eletrodo de referência Ag/AgCl (1,0 mol L⁻¹ KCl); Eletrodo auxiliar – fio de platina; Bomba peristáltica, modelo IPC Ismatec (Zurique, Suíça); Injetor proporcional feito em acrílico. Todos os experimentos foram conduzidos em potencial fixo e com o monitoramento da corrente de pico resultante.

III.2.2. Medidas de área superficial específica (S_{BET})

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

O aparelho na determinação de S_{BET} foi o medidor de área superficial foi da Quantachrome Autosorb Automated Gás Sorption.

III.2.3. Medidas de volume específico dos poros e diâmetro médio dos poros

As medidas de volume específico dos poros dos polímeros utilizados foram feitas no Quantachrome Autosorb Automated Gás Sorption. O aparelho se encontra interfaciado com um micro computador, que fornece diretamente os resultados de volume médio dos poros.

III.2.4. Medidas de microscopia eletrônica de varredura

Com o objetivo de verificar a morfologia das partículas dos MIPs e suas respectivas superfícies, foram realizadas ovservações por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens de MEV foram obtidas pela dispersão dos polímeros sobre uma fita de carbono condutora com dupla face (3MTM) previamente fixada sobre um porta amostra. Os polímeros assim fixados foram recobertos com um filme condutor de ouro utilizando-se a técnica de deposição em um metalizador Balzers, modelo MED 020. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um JEOL JEM-3010 (Japão) operando em voltagem de 300 kV.

III.2.5. Medidas de infravermelho

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram feitos em pastilhas de KBr 1 % no Bomem MB Series, (Canadá) modelo B100, em resolução de 4 cm^{-1} .

III.2.6. Medidas termogravimétricas

Análises termogravimétricas dos MIPs foram feitas para verificar as suas respectivas estabilidades térmicas. Para isso, utilizou-se o analisador TGA 2050 da PA Instrument onde, através de uma micro balança, se obteve a porcentagem de perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio, com velocidade constante de aquecimento de 10 °C min⁻¹, desde a temperatura ambiente.

III.3. Preparação dos MIPs

III.3.1. Síntese do MIP para o 4-APh

O MIP para 4-aminofenol (MIP-4-APh) foi baseado na polimerização convencional em "*bulk*" de acordo com o trabalho de Tong *et al.* (2002), as interações entre o 4-APh e os monômeros funcionais 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 2 mL de clorofórmio/DMSO (1:1), 450,0 µmol de ácido meta-acrílico (MAA – monômero funcional), 30,0 µmol de Fe(III)PPIX (atuando como grupo prostético – monômero), e 45,0 µmol de 4-APh (molécula molde). A solução foi então homogeneizada e interações de natureza não-covalente ocorreram entre o MAA e o 4-APh. Posteriormente, adicionou-se 7,95 mmol de etileno glicol dimetacrilato (EGDMA – reagente

de ligação cruzada) e 0,18 mmol de 2,2' azobisisobutironitrila (AIBN – inicador radicalar) (Figura III.1).



Figura III.1: Representação do procedimento de preparo do MIP-4-APh.

O frasco foi colocado em banho frio ($<5^{\circ}$ C) e purgado com nitrogênio por 5 min. Terminada a etapa, o frasco foi selado e colocado em um banho maria a 60°C. A temperatura favoreceu a reação que se processou por um período de 24 h. Após a completa polimerização, a ampola da 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 μ m. A remoção do 4-APh 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 (VPD) até não mais ser observado sinal analítico inerente ao 4-APh (Figura III.2). Por fim, o polímero foi seco e estocado à temperatura ambiente. A fim de avaliar a seletividade dos polímeros, foram preparados, paralelamente, polímeros sem a impressão molecular (síntese na ausência da molécula molde). Estes polímeros são conhecidos como NIP (non imprinted polymers).



Figura III.2: VPD para 4-APh após as extrações com metanol/ácido acético. Condições: faixa de potencial variando de -0,5 a 0,6 V, velocidade varredura de 40 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 70 mV e eletrólito suporte NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹.

III.3.2. Síntese do MIP para 5-HT

O procedimento adotado para a síntese do MIP para serotonina (MIP-5-HT) também foi baseado na polimerização convencional em "*bulk*" de acordo com o método descrito por Tong *et al.* (2002). A molécula molde (5-HT, 45,0 µmol), grupo prostético (hemina 30,0 µmol), monômero (MAA 45,0 µmol), reagente de ligação cruzada (EDGMA, 7,95 mmol) e o iniciador radicalar (AIBN, 0,18 mmol) foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio/DMSO (1:1) em uma ampola de vidro. Uma representação esquemática desta síntese é mostrada na Figura III.3.



Figura III.3: Representação do procedimento de preparo do MIP e reconhecimento do 5-HT.

A solução foi resfriada em banho de gelo e fez-se passar nitrogênio pela mesma por 15 minutos. Após esta etapa, o reator foi vedado e colocado em um banho termostatizado (60 °C) de óleo de silicone o qual permaneceu por 24
horas. Após o término da síntese, o reator foi fragmentado, e o polímero foi retirado e triturado manualmente em almofariz de porcelana, peneirado até obtenção de partículas com diâmetros $\leq 106 \mu m$. A extração do 5-HT das cavidades do MIP foi realizado com solução de metanol/ácido acético (4:1, v/v) até que nenhum teor do molde fosse determinado no eluato (Figura III.4).

A determinação de 5-HT no eluato foi realizada por voltametria de pulso diferencial sob as seguintes condições: faixa de potencial variando de - 0,5 a 0,9 V, velocidade varredura de 40 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 70 mV e eletrólito suporte NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹. Um NIP foi preparado para avaliar a seletividade dos polímero para serotonina.



Figura III.4: VPD para 5-HT após as extrações com metanol/ácido acético. Condições: faixa de potencial variando de -0,5 a 0,9 V, velocidade varredura de 40 mV s⁻¹, amplitude de pulso de 70 mV e eletrólito suporte NaClO₄ 0,1 mol L^{-1} .

III.4. Sistema de determinação amperométrica das moléculas moldes

O mesmo sistema de análise em fluxo (FIA) foi usado para determinação amperométrica das moléculas moldes (Figura III.5). Na etapa de amostragem, solução de peróxido de hidrogênio é percolado por uma minicoluna de plástico (3 cm de comprimento) contendo 35 mg de MIP numa vazão de 2,0 mL min⁻¹.

A solução remanescente é descartada. Neste mesmo tempo, a solução do analito preenche a alça (L) enquanto que o carregador (peróxido de hidrogênio em 0,1 mmol L⁻¹ tampão TRIS pH 8,0) é bombeado para a célula eletroquímica de fluxo. Após esta etapa, a posição de injeção é acionada pela alteração da posição do injetor (Figura III.5B), e solução do analito é deslocada da alça pelo carregador numa vazão de 2,0 mL min⁻¹ e é bombeada diretamente para a célula eletroquímica.

Nota-se que a posição de amostragem é realizada no mesmo sentido da injeção o que evita problemas de vazamentos na coluna e sinais analíticos com caudas podendo diminuir a precisão do método por efeito de memória. Todos os sinais analíticos foram registrados como corrente de pico (I_{pc}) máxima dada pela altura de pico.



Figura III.5: Representação esquemática do sistema FIA para os MIPs. (A) etapa de amostragem, (B) etapa de injeção. L = alça do eluente; C = minicoluna; WE = eletrodo de trabalho (carbono vítreo); AE = eletrodo auxiliar (platina) e RE = eletrodo de referência (Ag/AgCl).

III.5. Reação catalítica dos MIPs

Para verificar o efeito catalítico dos MIPs, duas etapas fundamentais foram adotadas, a etapa de amostragem e a etapa de injeção. Na posição de amostragem o MIP contendo a hemina (sítio ativo: Fe^{3+} protoporfirínico), catalisa a redução do peróxido e seu sítio ativo é oxidado. Quando o injetor é comutado para a posição de injeção a hemina oxidada é reduzida pelo analito. Durante esta ultima reação, os fenóis são basicamente convertidos em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos, usualmente eletroativos, podem ser reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais próximos de 0 V *vs* ECS (Figura III.6). A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico no sistema.



Figura III.6: Mecanismo do processo para ativação do MIP na coluna.

III.6. Determinação de $K_{\rm m}$ e $V_{\rm máx}$ para os MIPs

Para verificar o comportamento do sistema, parâmetros cinéticos como constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) também foram avaliados empregando o gráfico de Lineweaver-Burk (CORMACK e ELORZA, 2004).

III.7. Procedimento de Otimização

Durante todo o processo de otimização tanto para o MIP-4-APh, quanto para o MIP-5-HT, um sistema em fluxo foi operado no modo de amostragem baseado no volume, usando-se 200 μ L de uma solução de 4-APh 500 μ mol L⁻¹ e 200 μ L de uma solução de 5-HT 500 μ mol L⁻¹. Como resposta analítica, foram utilizadas as correntes de pico. Os dados experimentais foram processados no programa STATISTICA (versão 6.0) tendo-se um nível de confiança fixo a 95 %.

III.7.1. Procedimento usado no planejamento fatorial fracionário

Um planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹, envolvendo 16 ensaios foi utilizado como uma primeira aproximação dos resultados para a superfície de resposta, através de sua utilização nos cálculos das estimativas dos contrastes. Neste experimento, o sistema em fluxo descrito na Figura III.5 foi usado para determinação 4-APh e 5-HT. As variáveis estudadas foram: vazão do tampão (VT), volume da amostra (VA), concentração do peróxido (CP), concentração do tampão do tampão (CT) e pH. Os valores dos níveis altos e baixos para cada variável são apresentados na Tabela IV.2 e Tabela IV.7. Os valores dos níveis máximo e mínimo de cada variável foram escolhidos de acordo com experimentos prévios.

III.7.2. Procedimento para aplicação do planejamento Doehlert

Para a otimização das variáveis significativas obtidas pelos efeitos das estimativas dos contrastes, foi utilizado planejamentos de Doehlert. Assim, a partir dos resultados dos planejamentos de Doehlert foram geradas superfícies de respostas das quais foi possível estabelecer as condições ótimas para operação do sistema com MIP-4-APh e o MIP-5-HT. Esses planejamentos são apresentados nas Tabelas IV.5, Tabelas IV.10 e Tabelas IV.11.

III.8. Aplicação em amostras reais

Foram realizados alguns testes para verificar a possibilidade de aplicação dos MIPs em amostras reais.

Para o MIP-4-APh, amostras de água de torneira e amostras de água da lagoa do campus da Unicamp foram analisadas. As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose (0,45 µm) sob vácuo e enriquecidas com 4-APh. Posteriormente, as referidas amostras foram estocadas em frascos de poletileno para análise imediata.

Para o MIP-5-HT, amostras de plasma humano foram fornecidas pelo Departamento de Patologia Clínica da FCM-UNICAMP. Estas amostras foram coletadas segundo as normas do Hospital de Clínicas UNICAMP. Para tratamento das amostras, ácido tricloroacético (20 % m/v) foi adicionado em um tubo com 2,0 mL de plasma de cada amostra. O conteúdo dos tubos foi misturado em um vortex por 1 min e em seguida, centrifugado por 10 minutos em 1000 × g para precipitação das proteínas. As amostras do soro foram diluídas 1:100.

CAPÍTULO IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

Wilney de Jesus Rodrigues Santos – Tese de Doutorado – IQ/VNICAMP

IV. Resultados e Discussão

IV.1. Síntese dos polímeros com impressão molecular

Com o propósito de serem avaliadas amostras de interesse ambiental e biológico, foram sintetizados dois MIPs, um seletivo ao 4-aminofenol e o outro seletivo à serototina, respectivamente. Inicialmente, discutiremos a importância de cada componente nas sínteses dos respectivos MIPs.

Neste contexto, a ferriprotoporfirina IX (hemina) foi empregada como um material sintético na síntese dos MIPs com intuito de mimetizar a peroxidase. Seu uso é justificado, não apenas por representar um grupo prostético importante da peroxidase, mas também por: atuar como monômero de síntese, pois possui grupos vinílicos; e por estabelecer interação com a molécula molde (GREGG e SING, 1982). A escolha do monômero funcional ácido, MAA, é justificada pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico do ácido metacrílico e os grupos NH₂ e OH das moléculas moldes.

Como reagentes de ligação cruzada, optou-se por utilizar o etileno glicoldimetacrilato (EGDMA), uma vez que o mesmo tem sido empregado em larga escala e com grande sucesso na síntese de MIP (AL-KINDY *et al.*, 2000; TARLEY *et al.*, 2005; YAN e RAMSTRÖM, 2005). Este composto apresenta grupos vilínicos que são reativos frente a radicais livres, cátions ou ânions, participando da reação de polimerização. A polimerização radicalar prossegue até o consumo das duplas ligações reativas do sistema (SELLERGREN, 2001).

Assim, o EGDMA atua como um monômero estrutural uma vez que ele cria uma estrutura polimérica tridimensional que preserva os grupos do monômero funcional em uma posição fixa e complementar à molécula molde, garantindo rigidez e estabilidade aos sítios de ligação (YAN e RAMSTRÖM, 2005). Por isto, o EGDMA deve ser utilizado em excesso em relação à quantidade de monômero funcional, a fim de que a estabilidade do material seja garantida (SPIVAK, 2005).

A iniciação do processo de polimerização somente é possível quando radicais livres estão presentes no meio reacional (ALLCOCK, 1990; KROSCHWITZ, 1990). Neste sentido, a presença do iniciador 2,2`-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) fez-se necessária uma vez que esta substância sofre reação de homólise por irradiação (por uma lâmpada de vapor de mercúrio com emissão em 345 nm) ou por aquecimento (a 65 °C) para gerar os radicais livres requeridos (SELLERGREN, 2001).

Em conseqüência das ligações químicas entre as cadeias, o polímero adquiriu alta rigidez, características pertencentes aos MIP (CORMACK e ELORZA, 2004). Desta forma, o material obtido ao final da polimerização foi um monolito que precisou ser triturado, peneirado e lavado para a eluição da molécula molde.

Vale ressaltar que a desgaseificação do meio reacional, feita no início da polimerização, foi necessária para que ocorresse a retirada de oxigênio do meio, uma vez que o mesmo retarda reações de polimerização por radical livre (CORMACK e ELORZA, 2004).

Como já se sabe, a escolha do solvente de síntese é um fator crítico para o sucesso do processo de reconhecimento molecular, uma vez que além de solubilizar todos os componentes, ele interfere nas interações entre e molécula molde e o monômero (TARLEY *et al.*, 2005; SPIVAK, 2005; CORMACK e ELORZA, 2004). Assim, foi usado o clorofórmio e DMSO em uma proporção de (1:1).

IV.2. Caracterização dos polímeros

Os Polímeros com Impressão Molecular do estudo em questão (MIP-4-APh e o MIP-5-HT), foram obtidos pela polimerização em *"bulk"*, e caracterizados por análise de área superficial, porosidade, microscopia eletrônica de varredura, espectro infravermelho e curvas termogravimétricas para que alguns aspectos químicos, morfológicos e físicos dos materiais fossem conhecidos (CORMACK e ELORZA, 2004).

IV.2.1. Espectroscopia infravermelho

Os espectros IR relativos aos MIP-4-APh e MIP-5-HT antes e após a extração das respectivas moléculas moldes estão apresentados na Figura IV.1.



Figura IV.1: Espectros IR dos polímeros antes (a) e após (b) a extração do 4-APh e 5-HT.

Nos espectros IR Figura IV.1 nota-se grande similaridade do conjunto de bandas em todos os espectros. O MIP-4-APh e o MIP-5-HT apresentaram bandas de estiramento C-H a 3440 cm⁻¹ (do grupo COOH monomérico), de O-H a 3001 cm⁻¹ (do grupo COOH dímero), de CO a 1724 cm⁻¹ (do grupo éster e COOH), de C=C a 1639 cm⁻¹ (de grupos vinila não reagidos), bandas de deformação angular -O-CH₂ a 1400-1460 cm⁻¹, de C-O do grupo éster a 1267 cm⁻¹ e bandas de deformação angular fora do plano do grupo CH (vinila) a 750 cm⁻¹. Os espectros correspondentes aos MIPs antes da extração exibem, além das bandas apresentadas anteriormente, bandas adicionais de estiramento de picos intensos em 1020-1047 cm⁻¹ referentes às ligações C-NH₂ dos compostos fenólicos. Portanto, este é um indício de que a lavagem dos MIPs

foi eficiente para a remoção do 4-APh e 5-HT. Além disso, a ausência de diferença no que diz respeito à composição química dos polímeros é um fato esperado, uma vez que ambos os materiais foram sintetizados da mesma forma, exceto pela adição da molécula molde aos polímeros antes da extração. Pode-se ressaltar também, que as bandas (3447, 2949, 1729, 1160 cm⁻¹) dos espectros antes e após a extração são bandas típicas da porfirina que caracteriza a hemina (CHEN *et al.*, 2007).

IV.2.2. Microscopia eletrônica de varredura e porosimetria de sorção de nitrogênio

As características morfológicas dos MIPs foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. De acordo com os resultados de MEV inseridos na Figura IV.2, nota-se que tanto os polímeros impressos (para 4-APh e 5-HT) quanto o não impresso apresentam partículas bastante irregulares e a distribuição dos tamanhos não uniformes, por conta do processo de trituração dos materiais. Contudo, a diferença na porosidade dos materiais foi nítida, onde os MIPs apresentaram-se mais granulados e porosos que o NIP. Por causa desta característica os polímeros impressos possuem maior áreas superficiais do que os polímeros não impressos (FARRINGTON e REGAN, 2007).



Figura IV.2: Micrografias eletrônica de varredura do MIP-4-APh (a), MIP-5-HT (b) e NIP (c).

A diferença na porosidade dos materiais foi confirmada por ensaios de porosimetria de sorção de nitrogênio, empregando o método BET (Tabela IV.1).

Polímeros	Área superficial	Volume do poro	Diâmetro médio do
	(m^2/g)	(cm^3/g)	poro (nm)
MIP-4-APh	172	0,28	4,93
MIP-5-HT	166	0,21	5,05
NIP	6,9	0,03	1,69

Tabela IV.1: Porosimetria dos polímeros impresso e não impressos

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

IV.2.3. Termogravimetria

As curvas TGA para o MIP-4-APh e MIP-5-HT antes e após a extração das respectivas moléculas moldes estão apresentados na Figura IV.3. As curvas revelaram que esses materiais são termicamente estáveis até ~ 250 °C. Porém, os polímeros antes da extração apresentam perda de voláteis a ~ 130 °C, que pode estar relacionada com a volatização do analito e de solvente residual.



Figura IV.3: Curvas de TGA dos polímeros antes (a) e após (b) a extração do 4-APh e 5-HT.

IV.3. Constante de Michaelis-Menten para os MIPs

A constante de Michalis-Menten (K_m^{app}) representa a afinidade da enzima pelo substrato e quanto menor o seu valor, maior a afinidade refletindo na sensibilidade. Seu valor pode ser calculado utilizando-se o método gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) (DIXON e WEBB, 1979).

Para determinação de K_m e $V_{máx}$ do MIP-4-APh e MIP-5-HT, medidas amperométricas foram realizadas utilizando diferentes concentrações de 4-APh e 5-HT.

Na Figura IV.4, estão inseridos gráficos das respostas de corrente em função da concentração dos substratos, apresentando uma curva típica compatível com a de Michalis-Menten. Também, a Figura IV.4 apresenta, os gráficos de duplo recíproco (gráfico de Lineweaver-Burk), da corrente *versus* concentração dos substratos, a partir do qual foi possível obter os valores de $K_m = 196 \ \mu\text{mol} \ \text{dm}^{-3} \ \text{e} \ V_{máx} = 6,53 \ \mu\text{A} \ \text{cm}^{-2} \ \text{para} \ \text{MIP-4-AP} \ \text{e} \ K_m = 818 \ \mu\text{mol} \ \text{dm}^{-3} \ \text{e} \ V_{máx} = 9,05 \ \mu\text{A/cm2} \ \text{para} \ \text{o} \ \text{MIP-5-HT}, \ \text{através} \ \text{da equação:}$

$$\frac{1}{\Delta j_{s}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_{m}^{app}}{V_{max} [analito]}$$
(Eq.IV.1)

onde j_s é a densidade de corrente no estado estacionário após a adição do substrato. [analito] é a concentração do analito em solução, $V_{máx}$ é a velocidade máxima medida sob condições não saturadas do substrato e K_m^{app} é a constante aparente de Michaelis-Menten. Embora os valores do K_m obtidos sejam maiores em relação ao K_m de enzima de peroxidase (1,5 µmol dm⁻³ para oxidação de compostos fenólicos) (KUMAR e TRIPATHI, 1999), a aplicação dos MIPs com ação catalítica em propósitos analíticos ainda se justifica, tendo em vista as vantagens inerentes dos MIPs em detrimento às enzimas naturais.



Figura IV.4: Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$.

IV.4. Estudo do efeito catalítico dos MIPs

Inicialmente, investigações prévias foram realizadas para verificar o efeito catalítico de cada um dos polímeros (MIP-4-APh e MIP-5-HT). Os sítios dos MIPs primeiramente foram ativados pela percolação de solução de peróxido através do polímero empacotado em uma mini-coluna (Figura IV.5). Ao mesmo tempo, a alça de amostragem foi preenchida com solução padrão de analito (4-APh ou 5-HT). Quando o analito foi injetado no fluxo carregador na forma reduzida, era oxidado quando interagia com os sítios ativos do MIP. A quantidade de analito oxidado no MIP foi monitorada pela corrente de redução sobre um eletrodo de carbono vítreo (potencial aplicado de -100 mV *vs.* Ag/AgCl).



Figura IV.5: Processo do mecanismo para ativação do MIP na coluna.

Na Figura IV.6 é apresentado os resultados dos efeitos catalíticos mencionados acima através de amperogramas com polímeros sintetizados com e sem hemina, com o polímero não impresso e com o sistema sem polímero. Como pode ser observado, nenhuma corrente de redução foi observada sem a utilização da coluna, sugerindo que a interação entre o peróxido e analito é incapaz de oxidar o analito. Quando o NIP ou os MIPs sem hemina foram usados na coluna, uma corrente de redução muito pequena foi observada, sugerindo que a oxidação do analito não foi significante, mesmo passando

pela coluna. O baixo sinal do NIP pode ser atribuído à falta de reconhecimento molecular, pois não possui cavidade seletiva que poderia permitir agir como um sítio ativo, além da baixa área superficial. Entretanto, quando os MIPs sintetizados com hemina foram usados na coluna, uma considerável corrente de redução foi observada, confirmando o efeito de impressão e catalise nos MIPs. Isto é confirmado pelo efeito catalítico do grupo prostético e reconhecimento molecular do 4-APh e/ou 5-HT pelas cavidades seletivas impressas nos MIPs.



Figura IV.6: (A) Amperogramas de detecção das espécies reduzidas de 4-APh. Condições: $[4\text{-}APh] = 500 \ \mu\text{mol L}^{-1}$, volume da amostra = 200 \ \muL, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 300 \ \mumol mol L⁻¹, [Tampão TRIS-HCl] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0 e potencial aplicado de -0,1 V. (B) Amperogramas de detecção das espécies reduzidas de 5-HT. Condições: [5-HT] = 500 \ \mumol L⁻¹, volume da amostra = 200 \ \muL, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 300 \ \mumol L⁻¹, [Tampão TRIS-HCl] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0 e potencial aplicado de -0,1 V.

IV.5. Otimização da determinação amperométrica para o MIP-4-APh e MIP-5-HT

Para a determinação amperométrica dos MIP-4-APh e MIP-5-HT, variáveis químicas e de fluxo foram otimizadas após a otimização do efeito do potencial redução de cada analito. Para tanto, neste estudo foram fixadas as seguintes variáveis: eletrólito suporte tampão TRIS 0,1 mmol L⁻¹, vazão de eluição de 2,0 mL min⁻¹ e alça de amostragem 200 μ L. O procedimento consistiu da introdução da solução dos analitos por meio da alça de amostragem no fluxo do eletrólito suporte, o qual era bombeado diretamente para célula eletroquímica. Os potenciais estudados foram investigados dentro da faixa de -0,2 a 0,15 V, cujos efeitos nas correntes de pico para 4-APh e 5-HT estão apresentados na Figura IV.7. Como pode ser observado em cada sistema, o comportamento da corrente de pico em função do potencial aplicado, permanecem constantes a partir -0,1 V, sendo este valor empregado para os estudos posteriores.

Cabe ressaltar que outras variáveis associadas ao sistema foram préfixadas tais como, massa dos MIPs (35 mg) e concentração das soluções de 4-APh (500 μ mol L⁻¹) e 5-HT (500 μ mol L⁻¹). Adotou-se a massa de 35 mg para cada MIP, pois a partir de estudos preliminares, foi notado que o emprego de massas maiores ocasiona vazamento na mini-coluna devido o efeito de entumescimento dos MIPs durante a etapa de injeção.



Figura IV.7: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para efeito do potencial na corrente de pico para: (A) MIP-4-APh. Condições: $[4-APh] = 500 \ \mu\text{mol L}^{-1}$, volume da amostra = 100 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 300 μ mol L⁻¹, [Tampão TRIS] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0. (B) MIP-5-HT. Condições: $[5-HT] = 500 \ \mu\text{mol L}^{-1}$, volume da amostra = 200 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[H_2O_2]$ na mini-coluna = 300 μ mol L⁻¹, [Tampão TRIS-HCI] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0.

IV.5.1. Otimização multivariada

Planejamentos estatísticos, através da escolha de modelos, auxiliam na criação de condições ideais para a interpretação correta do comportamento de um determinado sistema. A escolha do planejamento experimental apropriado depende dos objetivos do estudo e também das limitações e condições experimentais do sistema.

Na otimização de um procedimento analítico, existe a necessidade de ajustar muitas variáveis no estabelecimento das melhores condições para a análise. Este processo pode consumir muito tempo, trabalho e material se uma otimização univariada convencional for realizada. Outro inconveniente da estratégia univariada está em não levar em conta as interações existentes entre as variáveis, o que torna improvável encontrar os valores ótimos procurados. Recentemente, procedimentos envolvendo otimização por técnicas multivariadas vêm sendo muito utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos por serem mais econômicos e efetivos, além de permitir que mais de uma variável seja otimizada simultaneamente.

IV.5.1.1. Planejamento fatorial fracionário para o MIP-4-APh

Com o potencial otimizado deu-se inicio à otimização dos sistemas de mimetização da peroxidase para determinação do 4-APh. O planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹ foi realizado com a intenção de investigar de forma preliminar a influência das variáveis químicas e de fluxo desse processo. A Tabela IV.2 apresenta as variáveis e os níveis em que as mesmas foram estudadas. A Tabela IV.3 mostra a matriz de planejamento experimental e os resultados obtidos em duplicata em cada ensaio expresso em corrente de pico.

Ademais, por se tratar de um planejamento fatorial fracionário adotou-se para o estudo com MIP-4-APh a geratriz *I*=abcde.

Tabela IV.2: Variáveis com seus respectivos níveis empregados no planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹.

Variáveis	Níveis			
	Mínimo (-)	Máximo (+)		
Vazão do tampão ^a (VT) (mL min ⁻¹)	1,0	2,0		
Volume da amostra ^b (VA) (μ L)	100	200		
Concentração do peróxido (CP) (µmol L ⁻¹)	50	150		
pH	7,0	9,0		
Concentração do tampão (CT) (mmol L ⁻¹)	0,1	1,0		
^a Tampão TRIS - HCl				

^b4-APh (500 μmol L⁻¹)

Ensaios	VT	VA	СР	рН	СТ	Resposta Δi (μΑ)	Valor médio da Resposta	Variância
1	-	-	-	-	+	0,33 / 0,30	0,32	0,00045
2	+	-	-	-	-	0,16 / 0,17	0,17	0,00005
3	-	+	-	-	-	0,18 / 0,18	0,18	0
4	+	+	-	-	+	0,31 / 0,30	0,31	0,00005
5	-	-	+	-	-	0,36 / 0,37	0,37	0,00005
6	+	-	+	-	+	0,44 / 0,42	0,43	0,0002
7	-	+	+	-	+	0,46 / 0,47	0,47	0,00005
8	+	+	+	-	-	0,28 / 0,28	0,28	0
9	-	-	-	+	-	0,14 / 0,14	0,14	0
10	+	-	-	+	+	0,11 / 0,09	0,10	0,0002
11	-	+	-	+	+	0,20/0,17	0,19	0,00045
12	+	+	-	+	-	0,12/0,12	0,12	0
13	-	-	+	+	+	0,18 / 0,19	0,19	0,00005
14	+	-	+	+	-	0,24 / 0,23	0,24	0,00005
15	-	+	+	+	-	0,27 / 0,29	0,28	0,0002
16	+	+	+	+	+	0,19 / 0,18	0,19	0,00005

Tabela VI.3: Combinações empregadas no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e seus resultados para o 4-APh.

VT = vazão do tampão; VA = volume da amostra; CP = concentração do peróxido; CT = concentração do tampão.

As estimativas dos contrastes foram inicialmente avaliadas utilizando-se como resposta analítica as correntes de pico, ou seja, foram calculadas pelas médias dos valores positivos menos as médias dos valores negativos, cujos resultados estão reunidos na Tabela IV.4. Cabe lembrar, que num planejamento fatorial fracionário, não se utiliza o efeito para definir a significância das variáveis, mas as estimativas dos contrastes.

Padrão de confundimento	Contraste	Estimativa dos contraste	
a=bcde	$l_a \rightarrow a + bcde$	$l_a = -0,0369$	
b=acde	$l_b \rightarrow b + acde$	$l_b = 0,0081$	
c=abde	$l_{\rm c} \rightarrow {\rm c} + {\rm abde}$	$l_c = 0,1144$	
d=abce	$l_{\rm d} \rightarrow {\rm d} + {\rm abce}$	$l_d = -0,1344$	
e=abcd	$l_{\rm e} \rightarrow {\rm e} + {\rm abcd}$	$l_e = 0,0656$	
ab=cde	$l_{ab} \rightarrow ab + cde$	$l_{ab} = -0,0181$	
ac=bde	$l_{\rm ac} \rightarrow {\rm ac} + {\rm bde}$	$l_{ac} = -0,0044$	
ad=bce	$l_{\rm ad} \rightarrow {\rm ad} + {\rm bce}$	$l_{ad} = 0,0006$	
ae=bcd	$l_{\rm ae} \rightarrow {\rm ae} + {\rm bcd}$	$l_{ae} = 0,0044$	
bc=ade	$l_{\rm bc} \rightarrow \rm bc + ade$	$l_{bc} = -0,0094$	
bd=ace	$l_{\rm bd} \rightarrow \rm bd + ace$	$l_{bd} = 0,0194$	
be=acd	$l_{\rm be} \rightarrow {\rm be} + {\rm acd}$	$l_{be} = 0,0194$	
cd=abe	$l_{\rm cd} \rightarrow \rm cd + abe$	$l_{cd} = -0,0294$	
ce=abd	$l_{ce} \rightarrow ce + abd$	$l_{ce} = -0,0244$	
de=abc	$l_{\rm de} \rightarrow {\rm de} + {\rm abc}$	$l_{de} = -0,0806$	
I=abcde	$l_{\rm I} \rightarrow$ medium +	$l_I = 0,2458$	
	1/2(abcde)		

Tabela IV.4: Estimativas dos contrastes obtidas para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} tendo como resposta analítica a corrente de pico do 4-APh.

a = fluxo do tampão (VT); b = volume da amostra (VA); c = concentração do peróxido (CP); d = pH e e = concentração do tampão (CT)

Wilney de Jesus Rodrigues Santos – Tese de Doutorado – IQ/UNICAMP

Assim, para avaliar a significância das variáveis, deve-se calcular primeiramente a estimativa conjunta da variância padrão (experimental) ou na realidade a variância das respostas [notar que tem respostas (+) e (-)]. Isto é feito usando a equação abaixo:

$$s_{p}^{2} = \frac{(n_{A} - 1)s^{2}_{A} + (n_{B} - 1)s^{2}_{B}}{(n_{A} - 1) + (n_{B} - 1)}$$
(Eq.IV.2)

onde *n* é número de repetições no ensaio. Neste caso é 2 (duplicata), S^2 é a variância obtida no ensaio.

O valor obtido para a estimativa conjunta da variância padrão foi de 0,000116. Em seguida o cálculo da variância do efeito V(efeito), foi realizado a partir da Eq.IV.3:

$$V(efeito) = V[\bar{R}(+)] + V[\bar{R}(-)] = \frac{s_{p}^{2}}{n} + \frac{s_{p}^{2}}{n}$$
 (Eq.IV.3)

Assim tem-se V(efeito) = $0,000116/16 + 0,000116/16 = 1,45 \times 10^{-5}$. Extraindo a raiz desta variância, tem-se o erro do efeito,

$$s(efeito) = \sqrt{V(efeito)}$$
 (Eq.IV.4)

 $S(efeito) = (1,45 \times 10^{-5})^{1/2} = 3,807 \times 10^{-3}$

O erro do efeito para o planejamento para o 4-APh foi de 3,807 x 10^{-3} . Quando este valor for maior que o efeito a variável não é significativa, ou seja, o erro é maior que o efeito. No entanto, esta avaliação não fornece uma indicação populacional e sim amostral. Para inferir o erro do efeito populacional usa-se o intervalo de confiança de 95% (MONTGOMERY, 2000). Assim, teremos:

IC (intervalo de confiança) = Efeito (neste caso estimativa de contraste) \pm s(efeito). t_{n-1}

Desta forma, multiplicando o referido erro pelo valor de t_{n-1} (2,120) com intervalo de confiança de 95% obteve-se o valor de 0,0081 para o sistema do MIP-4-APh. Ao se comparar este valor com as estimativas dos contrastes das variáveis (Tabela IV.4), constata-se que as variáveis, vazão do tampão (VT), concentração do peróxido (CP), pH e concentração do tampão (CT) são significativas. As interações: VT-CA, CA-CP, CA-pH, CA-CT, CP-pH, CP-CT e pH-CT são também significativas.

Quando o valor da estimativa é positivo, o aumento do fator favorece um aumento de sinal analítico, ao passo se o fator for negativo, um aumento no nível do fator ocasionaria uma diminuição do sinal.

A estimativa do contraste negativa (-0,0367) obtida para o pH, indica que com o aumento de pH o sinal analítico é diminuído, bem como as interações (pH-CT e CP-pH) que se apresentam com os valores -0,0806 e -0,0294 respectivamente, ou seja, a interação entre as variáveis foi importante, ocorre um aumento significativo do sinal analítico quando as duas variáveis, tanto pH como CT são usadas em menores níveis.

A estimativa do contraste da concentração do peróxido também se mostra significativa com um efeito positivo de (0,1144). Este resultado sugere que elevando os níveis da variável há um aumento da resposta. Este resultado possivelmente sugere que o peróxido decompõe em soluções com baixas concentrações, conduzindo uma instabilidade do sistema analítico (LINDGREN et al., 1997). Conseqüente, a regeneração dos sítios ativos do MIP é afetada.

A estimativa do contraste da concentração do tampão se mostra significativa com o valor positivo (0,0656) o que indica que os níveis maiores deste fator devem ser investigados. Entretanto, investigações prévias mostram que um aumento na concentração do tampão ocasionaria uma mudança no sentido de redução para o sentido de oxidação e, como conseqüência, uma diminuição da resposta analítica, já que a mesma é registrada como altura de pico. Estes resultados indicam que para o estudo desta variável, níveis menores devem ser empregados para finalizar a otimização. Este fato pode ser justificado pela interação entre as variáveis CP-CT que possui valor de (-0,0244), indicando que ocorre um aumento significativo do sinal analítico quando as duas variáveis são usadas em níveis menores.

Os resultados indicam que a vazão do tampão deve ser estudada em menores níveis, já que o valor da estimativa de contraste é igual (-0,0369), porém, a lenta percolação em níveis menores provocaria alargamento do pico e, como conseqüência, uma diminuição da resposta analítica, já que a mesma é registrada como altura de pico. Assim sendo, foi fixada a vazão do tampão em 2 mL min⁻¹. A estimativa de contraste do comprimento da alça indica não ser significativa dentro do domínio experimental. Desta forma, fixou-se o comprimento da alça em 100 μ L por esta quantidade ser suficiente para a determinação do 4-APh.

Por último, a influência da natureza do tampão foi otimizada univariadamente com os tampões Sorensen, Hepes, TRIS, fosfato e borato (Figura IV.8). Os resultados indicaram que a solução tampão TRIS apresentou a melhor corrente de pico, enquanto que os demais tampões apresentaram as menores respostas, este tampão então foi escolhido para os estudos posteriores.



Figura IV.8: Influência de diferentes eletrólitos na redução do 4-APh. Condições: $[4-APh] = 500 \ \mu\text{mol } \text{L}^{-1}$. Volume da amostra = 100 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ na mini-coluna = 378 μ mol L^{-1} , $[Tampões] = 0,1 \text{ mmol } \text{L}^{-1}$, pH 8,0.

IV.5.1.2. Planejamento Doehlert para o MIP-4-APh

Diante dos resultados obtidos acerca do efeito das variáveis significativas pH, CP e CT no sistema de mimetização da peroxidase para determinação do 4-APh, deu-se inicio à execução do planejamento Doehlert visando encontrar os níveis ótimos para estas variáveis testadas.

A estrutura da matriz de Doehlert empregada na otimização das variáveis, bem como as respostas obtidas estão reunidas na Tabela IV.5.

	Variáveis Experimentais						
	CP pH		СТ	Resposta			
	$(\mu mol L^{-1})$		$(\text{mol } L^{-1})$	Δi (μA)			
				0,432			
1	0 (300)	0 (8,0)	$0(10x10^{-5})$	0,425			
				0,454			
2	1 (500)	0 (8,0)	$0(10x10^{-5})$	0,424			
3	0,5 (400)	0,866 (9,0)	0 (10x10 ⁻⁵)	0,396			
4	0,5 (400)	0,289 (8,33)	0,817 (15x10 ⁻⁵)	0,367			
5	-1 (100)	0 (8,0)	$0(10x10^{-5})$	0,244			
6	-0,5 (200)	-0,866 (7,0)	$0(10x10^{-5})$	0,325			
7	-0,5 (200)	-0,289 (7,66)	-0,817 (5x10 ⁻⁵)	0,310			
8	0,5 (400)	-0,866 (7,0)	$0(10x10^{-5})$	0,310			
9	0,5 (400)	-0,286 (7,66)	-0,817 (5x10 ⁻⁵)	0,276			
10	-0,5 (200)	0,866 (9,0)	$0(10x10^{-5})$	0,330			
11	0 (300)	0,577 (8,66)	-0,817 (5x10 ⁻⁵)	0,289			
12	-0,5 (200)	-0,286 (7,66)	0,817 (15x10 ⁻⁵)	0,294			
13	0 (300)	-0,577 (7,33)	0,817 (15x10 ⁻⁵)	0,434			

Tabela IV.5: Combinações empregadas na matriz de Doehlert e resultados para o 4-APh.

Os valores entre parênteses são os valores reais das variáveis enquanto que os números precedidos são os valores codificados da matriz de Doehlert.

Os dados obtidos na execução dos treze experimentos que compõem a matriz de Doehlert geraram a Eq.IV.5, Eq.IV.6 e Eq.IV.7 que representa a relação entre as variáveis estudadas (CP, pH e CT) e a resposta analítica (corrente de pico):

Corrente de pico (
$$\mu$$
A) = - 4,9225 - 0,000179.CP - 0,000003.CP² + 1,1590875.pH - 0,06939.pH² + 0,0001781.CP.pH (Eq.IV.5)

- Corrente de pico (μ A) = 4,9225 0,000179.CP 0,000003.CP² + 13276,6278.CT 33082775,5397.CT² + 6,310511.CP.CT (Eq.IV.6)
- Corrente de pico (μ A) = 4,9225 + 1,159087.CT 0,0693926.CT² + 13276,6278.pH 33082775,5397.pH² 996,0711.CT.pH (Eq.IV.7)

A significância dos termos lineares e quadráticos da Eq.IV.5, Eq.IV.6 e Eq.IV.7 e, conseqüentemente, dos modelos quadráticos foram avaliadas por meio da ANOVA (Análise de Variância) (Tabela IV.6).

Termos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F	Nível de probabilidade (p)
СР	0,014538	1	0,014538	63,48452	0,015389
CP^2	0,015389	1	0,013185	57,57440	0,016929
pH	0,000034	1	0,000034	0,14969	0,736120
pH^2	0,010324	1	0,010324	45,08161	0,021470
СТ	0,004535	1	0,004535	19,80408	0,046966
CT^2	0,019357	1	0,019357	84,52668	0,011625
CP.pH	0,001319	1	0,001319	5,75816	0,138486
CP.CT	0,003380	1	0,003380	14,76153	0,061555
pH.CT	0,002331	1	0,002331	10,17812	0,085795
Falta de ajuste	0,011197	3	0,003732	16,29791	0,058363
Erro puro	0,000458	2	0,000229		
Soma quadrática	0,065656	14			
total					

Tabela IV.6: Análise de variância dos dados apresentados na Tabela IV.5.

Segundo a ANOVA nota-se que os termos lineares e quadráticos do modelo são significativos, uma vez que os níveis de probabilidade (p) obtidos são menores que 0,05 (nível de confiança de 95%). O ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais foi averiguado por meio do teste F. O referido teste estabelece a significância do ajuste do modelo quando a razão

entre a média quadrática da falta de ajuste (fa) e a média quadrática do erro puro (ep) for menor que o valor da distribuição *F* (valor tabelado). Neste caso, como a razão obtida (16,29791) é menor que o valor tabelado $F_{3,2,95\%}$ (19,16) com 95% de confiança constata-se que o modelo quadrático obtido não apresenta falta de ajuste.

As superfícies de respostas obtidas a partir dos modelos quadráticos são mostradas na Figura IV.9. A presença de uma região ótima para ambas as variáveis testadas foi confirmada aplicando o critério de Lagrange. O critério de Lagrange indica a presença de um ponto máximo quando H (a_0 , b_0) > 0 e $\delta^2 Y/\delta A^2$ (a_0 , b_0) < 0 ou $\delta^2 Y/\delta B^2$ (a_0 , b_0) < 0. Os valores obtidos neste trabalho para a determinante de Henssian, bem como para a equação modelo submetida a derivada segunda foram:

Para Eq.IV.5: H (a_0 , b_0) = 0,0000008, δ^2 corrente/ δ CP² = - 0,000006 e δ^2 corrente/ δ pH² = - 0,13878.

Para Eq.IV.6: H (a_0 , b_0) = 357,1707, δ^2 corrente/ δ CP² = - 0,000006 e δ^2 corrente/ δ CT² = - 66165551,06.

Para Eq.IV.7: H (a₀, b₀) = 8190641,601, δ^2 corrente/ δ CT² = -0,1387852 e δ^2 corrente/ δ pH² = -66165551,06. De acordo com estes valores, constata-se que a superfície de resposta apresenta um valor ótimo. Os valores ótimos para pH, CP e CT foram obtidos resolvendo os sistemas abaixo:

Para Eq.IV.5: δcorrente/δCP = 0 = - 0,000179 - 0,000006CP + 0,0001781pH δcorrente/δpH = 0 = 1,1590875 - 0,13878pH + 0,0001787CP

Para Eq.IV.6: δ corrente/ δ CP = 0 = - 0,000179 - 0,000006CP + 6,310511CT δ corrente/ δ CT = 0 = 13276,6278 - 66165551,06CT + 6,310511CP

Para Eq.IV.7: δcorrente/δCT = 0 = 1,159087 – 0,1387852CT + 996,0711pH δcorrente/δpH = 0 = 13276,6278 – 66165551,06pH + 996,0711CT

Os pontos de máximos sobre a superfície, confirmados por meio do critério de Lagrange, foram, respectivamente, 8,0 para pH, 378 μ mol L⁻¹ para CP e 0,1 mmol L⁻¹ para CT.


Figura IV.9: Superfície de resposta obtida à partir das matrizes de Doehlert para o sistema do MIP-4-APh.

IV.5.1.3. Planejamento fatorial fracionário para o MIP-5-HT

Após a otimização do potencial para 5-HT iniciou-se à otimização dos sistemas de mimetização da peroxidase para determinação do 5-HT. Os fatores considerados importantes neste sistema foram analisados por meio de

planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , o que significa 16 experimentos em duplicata. Os níveis (+) e (-) para cada variável estão reunidos na Tabela IV.7. Estes fatores foram: vazão do tampão, volume da amostra, concentração do peróxido, pH e concentração tampão.

Tabela IV.7: Variáveis com seus respectivos níveis empregados no planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹ para o MIP-5-HT.

Variáveis	Níveis			
-	Mínimo (-)	Máximo (+)		
Vazão do tampão ^a (VT) (mL min ⁻¹)	1,0	2,0		
Volume da amostra ^b (VA) (μ L)	100	200		
Concentração do peróxido (CP) (µmol L ⁻¹)	50	150		
pН	7,0	9,0		
Concentração do tampão (CT) (mmol L ⁻¹)	0,1	1,0		

^a Tampão TRIS - HCl ^b 5-HT (500 µmol L⁻¹)

Na Tabela IV.8 estão reunidas às combinações entre as variáveis e os respectivos sinais. Por se tratar de um planejamento fatorial fracionário adotou-se para o estudo com MIP-5-HT a geratriz *I*=abcde.

Tabela IV.8: Combinações empregadas no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e seus resultados para o 5-HT.

Ensaios	VT	VA	СР	рН	СТ	Resposta Δi (μΑ)	Valor médio da Resposta	Variância
1	_	_	_	_	+	0,030 / 0,030	0,03	0
2	+	_	_	_	-	0,02 / 0,02	0,02	0
3	-	+	-	-	-	0,07 / 0,07	0,07	0
4	+	+	-	-	+	0,07 / 0,06	0,07	0,00005
5	-	-	+	-	-	0,06 / 0,06	0,06	0
6	+	-	+	-	+	0,03 / 0,03	0,03	0
7	-	+	+	-	+	0,07 / 0,06	0,07	0,00005
8	+	+	+	-	-	0,21 / 0,20	0,21	0,00005
9	-	-	-	+	-	0,04 / 0,03	0,04	0,00005
10	+	-	-	+	+	0,02 / 0,02	0,02	0
11	-	+	-	+	+	0,01 / 0,01	0,01	0
12	+	+	-	+	-	0,06 / 0,06	0,06	0
13	-	-	+	+	+	0,02 / 0,02	0,02	0
14	+	-	+	+	-	0,03 / 0,03	0,03	0
15	-	+	+	+	-	0,05 / 0,04	0,05	0,00005
16	+	+	+	+	+	0,03 / 0,02	0,03	0,00005

VT = vazão do tampão; VA = volume da amostra; CP = concentração do peróxido; CT = concentração do tampão.

As estimativas dos contrastes foram inicialmente avaliadas utilizando-se como resposta analítica a corrente de pico, ou seja, foram calculadas pela

Wilney de Jesus Rodrigues Santos – Tese de Doutorado – IQ/VNICAMP

média dos valores positivos menos a média dos valores negativos, cujos resultados estão reunidos na Tabela IV.9.

Padrão de	Contraste	Estimativa dos
confundimento		contraste
a=bcde	$l_a \rightarrow a + bcde$	$l_a = 0,0150$
b=acde	$l_b \rightarrow b + acde$	$l_b = 0,0375$
c=abde	$l_{\rm c} \rightarrow {\rm c} + {\rm abde}$	$l_c = 0,0212$
d=abce	$l_{\rm d} \rightarrow \rm d + abce$	$l_d = -0,0375$
e=abcd	$l_{\rm e} \rightarrow {\rm e} + {\rm abcd}$	$l_e = -0,0325$
ab=cde	$l_{ab} \rightarrow ab + cde$	$l_{ab} = 0,0262$
ac=bde	$l_{\rm ac} \rightarrow {\rm ac} + {\rm bde}$	$l_{ac} = 0,0100$
ad=bce	$l_{\rm ad} \rightarrow {\rm ad} + {\rm bce}$	$l_{ad} = -0,0087$
ae=bcd	$l_{ae} \rightarrow ae + bcd$	$l_{ae} = -0,0112$
bc=ade	$l_{\rm bc} \rightarrow \rm bc + ade$	$l_{bc} = 0,0125$
bd=ace	$l_{\rm bd} \rightarrow \rm bd + ace$	$l_{bd} = -0,0287$
be=acd	$l_{\rm be} \rightarrow {\rm be} + {\rm acd}$	$l_{be} = -0,0212$
cd=abe	$l_{cd} \rightarrow cd + abe$	$l_{cd} = -0,0225$
ce=abd	$l_{ce} \rightarrow ce + abd$	$l_{ce} = -0,0175$
de=abc	$l_{\rm de} \rightarrow {\rm de} + {\rm abc}$	$l_{de} = -0,0087$
I=abcde	$l_{\rm I} \rightarrow$ medium +	$l_I = 0,049375$
	¹ / ₂ (abcde)	

Tabela IV.9: Estimativas dos contrastes obtidas para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} tendo como resposta analítica a corrente de pico do 5-HT.

a = fluxo do tampão (VT); b = voluma da amostra (VA); c = concentração do peróxido (CP); d = pH e e = concentração do tampão (CT)

Para avaliar a significância das variáveis, calculamos primeiramente a estimativa conjunta da variância padrão (experimental) pela Eq.IV.2.

O valor obtido para a estimativa conjunta da variância padrão foi de 0,0000188. Em seguida o cálculo da variância do efeito V(efeito), foi realizado a partir da Eq.IV.3 da qual obtivemos: V(efeito) = 0,0000188/16 + 0,0000188/16 = 2,34 x 10⁻⁶. Extraindo a raiz desta variância para obtermos o erro do efeito temos, S(efeito) = $(2,34 \times 10^{-6})^{1/2} = 1,53 \times 10^{-3}$

O erro do efeito para o planejamento foi de 1,53 x 10^{-3} . Quando este valor for maior que o efeito a variável não é significativa, ou seja, o erro é maior que o efeito. Como já mencionado, esta avaliação não nos dá uma indicação populacional e sim amostral. Para inferirmos o erro do efeito populacional temos que usar o intervalo de confiança de 95% (MONTGOMERY, 2000). Assim, teremos:

IC (intervalo de confiança) = Efeito (neste caso estimativa de contraste) \pm s(efeito). t_{n-1}

Desta forma multiplicando o referido erro pelo valor de t_{n-1} (2,120) com intervalo de confiança de 95% obteve-se o valor de 0,0032. Ao se comparar este valor com as estimativas dos contrastes das variáveis (Tabela IV.9), constata-se que todas as variáveis, vazão do tampão (VT), volume da amostra (VA), concentração do peróxido (CP), pH e concentração do tampão (CT) são significativas, bem como todas as interações.

O fator VA apresentou estimativa de contraste positiva (0,0375), sugerindo que aumentando o volume da amostra, maior sinal será obtido. A dependência do pH na resposta analítica foi estimada com contraste negativo (-0,0375). Conseqüentemente, a resposta analítica foi diminuída aumentando do pH.

O fator CT exibiu uma estimativa de contraste negativo (-0,0325). As elevadas concentrações da solução tampão inibem a detecção do 5-HT oxidado.

As concentrações de peróxido no intervalo de 50 a 150 µmol L⁻¹ foram investigadas. A CP apresentou um contraste de estimado positivo (0,0212). Altas concentrações de peróxido foram usadas para obter uma melhor resposta. Este resultado foi esperado visto que o peróxido decompõe rapidamente em baixas concentrações de solução aquosa (LINDGREN *et al.*, 1997). Conseqüentemente, a regeneração dos sítios ativos do MIP será afetada.

O fator VT demonstrou estimativa de contraste positiva (0,0150). Os melhores resultados foram conseguidos usando os valores mais elevados. Entretanto, um aumento muito elevado na vazão do tampão pode ocasiona vazamento na mini-coluna devido ao entumescimento do MIP durante a etapa de injeção. Desta forma, a vazão do tampão foi fixada em 2 mL min⁻¹.

A influência da natureza do tampão também é um fator importante para determinação amperométrica do 5-HT. Estudos de otimização univariados foram feitos com os tampões Sorensen, Hepes, TRIS, fosfato e borato (Figura IV.10). Os resultados indicaram que a solução tampão TRIS apresentou a melhor corrente de pico, enquanto que os demais tampões apresentaram as menores respostas. Desta forma, este tampão foi escolhido para os estudos posteriores.



Figura IV.10: Influência de diferentes Tampões na redução do 5-HT. Condições: $[5-HT] = 500 \ \mu\text{mol } \text{L}^{-1}$, volume da amostra = 200 $\ \mu\text{L}$, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ na mini-coluna = 310 $\ \mu\text{mol } \text{L}^{-1}$, $[\text{TRIS-HCl}] = 0,1 \ \text{mmol } \text{L}^{-1}$, pH 8,0.

IV.5.1.4. Planejamento Doehlert para o MIP-5-HT

Os resultados do planejamento fatorial fracionário em conjunto com os efeitos das variáveis significativas, mostraram que as variáveis nos níveis estudados precisam de uma otimização final. Assim, dois planejamentos de Doehlert para duas variáveis foram realizados para este propósito. Primeiramente foi desenvolvido um planejamento Doehlert para otimização da concentração do peróxido (CP) e o pH, porque este par apresentou a interação de maior efeito. Utilizando-se os valores otimizados de CP e pH deste planejamento, um segundo planejamento Doehlert envolveu o par de variáveis, volume da amostra (VA) e concentração do tampão (CT).

- Planejamento Doehlert 1

Neste primeiro planejamento as variáveis, volume da amostra e concentração do tampão foram fixadas e a concentração do peróxido e pH foram variados. Considerando os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário e da estimativa dos contrastes, o volume da amostra foi fixado a 200 μ L e a concentração do tampão em 0,1 mmol L⁻¹. Os sete experimentos necessários para a realização do planejamento Doehlert são descritos na Tabela IV.10. O pH e a concentração do peróxido, variou de 7 a 9 e 200 a 400 μ mol L⁻¹, respectivamente.

Ensaios	pН	CP	Resposta	Valores previsto pelo
		$(\mu mol L^{-1})$	$\Delta I (\mu A)$	modelo quadrático
			0,205	0,207
1	0 (8,0)	0 (300)	0,216	0,207
			0,215	0,207
2	1 (9,0)	0 (300)	0,111	0,102
3	0,5 (8,5)	0,866 (400)	0,119	0,117
4	-1 (7,0)	0 (300)	0,113	0,112
5	-0,5 (7,5)	-0,866 (200)	0,105	0,097
6	0,5 (8,5)	-0.866 (200)	0,081	0,079
7	-0.5 (7,5)	0,866 (400)	0,117	0,109

Tabela IV.10: Matriz de Doehlert para o planejamento 1.

Os valores entre parênteses são os valore reais das variáveis enquanto que os números precedidos são os valores codificados da matriz de Doehlert.

Os dados obtidos na realização dos sete experimentos que compões esta matriz de Doehlert geraram a superfície de resposta na Figura IV.11. Esta superfície de resposta pode ser descrita pela Eq.IV.8 a qual ilustra a relação entre pH, concentração do peróxido (CP) e resposta analítica (corrente de pico).

Corrente de pico (μ A) = - 6,612 + 1,556.pH - 0,099.pH² +0,00397.CP - 0,0000081499.CP² + 0,000130.pH.CP (Eq.IV.8)

A aplicação do critério de Lagrange nesta equação demonstra que a superfície de resposta possui um máximo.

 δ^2 corrente/ δ pH² = -0,198 δ^2 corrente/ δ CP² = -0,000016299

As coordenadas do ponto máximo podem ser calculadas pelas seguintes equações:

 δ corrente/ δ pH = 0 = 1,556 - 0,198.pH + 0,000130.CP δ corrente/ δ CP = 0 = 0,00397 - 0,000016299.CP + 0,000130.pH

Desta forma, os valores correspondentes à eficiência máxima são: pH = $8,0 \text{ e CP} = 310 \text{ }\mu\text{mol }\text{L}^{-1}$, onde a corrente prevista é 0,15.



Figura IV.11: Superfície de resposta obtida a partir dos resultados da Tabela IV.10 para a otimização de pH e CP, tendo-se como resposta analítica a corrente de pico para o sistema do MIP-5-HT.

- Planejamento Doehlert 2

Neste segundo planejamento, as variáveis pH e concentração do peróxido tiveram seus valores fixados e as variáveis volume da amostra e concentração do tampão tiveram seus valores variados. Considerando os resultados obtidos no primeiro planejamento Doehlert, o pH e a concentração do peróxido foram fixados a 8,0 e 310 μ mol L⁻¹, respectivamente. Os sete experimentos necessários para a realização do planejamento Doehlert são descritos na Tabela IV.11. O volume da amostra e concentração do tampão variaram de 100 a 300 μ L e 5 x 10⁻⁵ a 15 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, respectivamente.

Ensaios	VA	СТ	Resposta	Valores previsto
	(µL)	$(mol L^{-1})$	$\Delta I (\mu A)$	pelo modelo
				quadrático
			0,213	0,209
1	0 (200)	$0 (10 \times 10^{-5})$	0,205	0,209
			0,209	0,209
2	1 (300)	$0 (10 \times 10^{-5})$	0,083	0,081
3	0,5 (250)	0,866 (15 x 10 ⁻⁵)	0,064	0,066
4	-1 (100)	$0 (10 \times 10^{-5})$	0,064	0,066
5	-0,5 (150)	-0,866 (5 x 10 ⁻⁵)	0,053	0,051
6	0,5 (250)	-0,866 (5 x 10 ⁻⁵)	0,082	0,084
7	-0,5 (150)	0,866 (15 x 10 ⁻⁵)	0,086	0,084

Tabela IV.11: Matriz de Doehlert para o planejamento 2.

Os valores entre parênteses são os valore reais das variáveis enquanto que os números precedidos são os valores codificados da matriz de Doehlert.

Os dados obtidos na execução dos sete experimentos que compõem esta matriz de Doehlert geraram a superfície de resposta na Figura IV.12. Esta superfície de resposta pode ser descrita pela Eq.IV.9 a qual ilustra a relação entre volume da amostra (VA), concentração do tampão (CT) e resposta analítica (corrente de pico).



Figura IV.12: Superfície de resposta obtida a partir dos resultados da Tabela IV.11 para a otimização de VA e CT, tendo-se como resposta analítica a corrente de pico.

Corrente de pico (μ A) = - 0,8729 + 0,00600.VA - 0,0000135.VA² + 9404,99.CT - 41550000.CT² - 5,0999.VA.CT (Eq.IV.9)

A aplicação do critério de Lagrange nesta equação demonstra que a superfície de resposta possui um máximo.

 δ^2 corrente/ $\delta VA^2 = -0,000027$ δ^2 corrente/ $\delta CT^2 = -83100000$

As coordenadas do ponto máximo podem ser calculadas pelas seguintes equações:

 δ corrente/ δ VA = 0 = 0,00600 - 0,000027.VA + 5,0999.CT

 δ corrente/ δ CT = 0 = 9404,99 - 83100000.CT + 5,0999.pH

Desta forma, os valores correspondentes à eficiência máxima são: VA= $200 \ \mu L \ e \ CT = 0.1 \ mmol \ L^{-1}$, onde a corrente prevista é 0,15.

A significância dos termos lineares e quadráticos da Eq.IV.8 e Eq.IV.9 e, conseqüentemente, dos modelos quadráticos foram avaliada por meio da ANOVA (Análise de Variância) (Tabela IV.12) e (Tabela IV.13).

Tabela IV.12: Análise de variância dos dados apresentados na Tabela IV.10.

Efeitos	Soma dos	Graus de	Média	Teste F	Nível de
	quadrados	liberdade	quadrática		probabilidade (p)
pН	0,000056	1	0,000056	1,5225	0,342562
pH^2	0,012000	1	0,012000	324,3243	0,003069
СР	0,000625	1	0,000625	16,8919	0,054413
\mathbb{CP}^2	0,014170	1	0,014170	382,9766	0,002601
pH.CP	0,000169	1	0,000169	4,5676	0,166050
Falta de ajusto	0,000067	1	0,000067	1,8018	0,311572
Erro puro	0,000074	2	0,000037		
Soma quadrática total	0,022818	8			

Efeitos	Soma dos	Graus de	Média	Teste F	Nível de
	quadrados	liberdade	quadrática		probabilidade
					(<i>p</i>)
VA	0,000169	1	0,000169	10,547	0,083159
VA^2	0,022032	1	0,022032	1377,019	0,000725
СТ	0,000056	1	0,000056	3,516	0,201631
CT^2	0,023019	1	0,023019	1438,669	0,000694
VA.CT	0,000650	1	0,000650	40,641	0,023733
Falta de	0 000024	1	0 000024	1 500	0 345346
ajusto	0,000024	1	0,000024	1,500	0,545540
Erro puro	0,000032	2	0,000016		
Soma					
quadrática	0,038476	8			
total					

Tabela IV.13: Análise de variância dos dados apresentados na Tabela IV.11.

Com os resultados da ANOVA nota-se que os termos lineares e quadráticos dos modelos são significativos, uma vez que os níveis de probabilidade (p) obtidos são menores que 0,05 (nível de confiança de 95%). O ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais foi averiguado por meio do teste F. O referido teste estabelece a significância do ajuste do modelo quando a razão entre a média quadrática da falta de ajuste (fa) e a média quadrática do erro puro (ep) for menor que o valor da distribuição F (valor tabelado). Neste caso, como a razão obtida para o primeiro planejamento (1,80) e para o segundo planejamento (1,50) foram menores que

o valor tabelado $F_{1,2,95\%}$ (18,51) com 95% de confiança constata-se que os modelos quadráticos obtidos não apresentam falta de ajuste.

IV.6. Estudo de seletividade para o MIP-4-APh e MIP-5-HT

Os polímeros biomiméticos baseados na tecnologia de impressão molecular possuem uma característica inerente que é a seletividade. Entretanto, quando a molécula *template* (analito) é submetida a uma etapa de extração/eluição na presença de moléculas com estruturas moleculares análogas, possivelmente problemas relacionados à seletividade podem ser notados. Isto ocorre porque durante a síntese dos MIP, além dos sítios seletivos formados, há também a formação daqueles sítios ditos não específicos, onde outras espécies podem ser adsorvidas. Assim sendo, para avaliar o comportamento seletivo do MIP-4-APh e MIP-5-HT na determinação dos respectivos analitos, avaliou-se o percentual de resposta analítica para outros compostos fenólicos que apresentam estruturas moleculares similares e um potencial de redução bastante próximo, caracterizando desta forma, outra fonte de interferência.

Uma análise dos dados das Tabelas IV.14 e Tabela IV.15 revelam não haver interferência na determinação de 4-APh e 5-HT quando se emprega soluções com razões molares analito:interferente, 1:1, 1:5 e 1:10, indicando que os MIPs sintetizados possuem excelentes seletividades frente a estas espécies investigadas.

Compostos	Razão Molar*				
	1:1	1:5	1:10		
Catecol	97,6±3,2	98,6±4,9	100,7±2,4		
4-Cloro-3-metilfenol	98,5±1,2	99,4±0,8	98,9±0,4		
2-Aminofenol	99,5±1,9	99,1±0,3	99,5±1,8		
Guaiacol	98,9±0,6	99,5±0,9	100,3±3,6		
Cloroguaiacol	99,0±1,9	100,2±1,2	99,9±0,4		
2-Cresol	99,9±6,8	99,7±5,3	100,6±5,0		

Tabela IV.14: Efeito d	de interferentes na	determinação do 4-APh.
------------------------	---------------------	------------------------

*Resposta relativa (%) obtida com o MIP. Razão molar = [4-APh]:[composto interferente]. Valor±S.D. para três medidas.

Compostos	Razão Molar*				
	1:1	1:5	1:10		
Epinefrina	99,8±0,3	98,3±5,8	98,1±1,2		
Dopamina	98,8±1,4	99,5±0,9	98,6±0,8		
Neuroepinefrina	99,2±1,8	98,7±2,4	98,8±3,5		
4-Aminofenol	99,4±0,8	98,2±0,8	98,6±1,5		

Tabela IV.15: Efeito de interferentes na determinação do 5-HT.

*Resposta relativa (%) obtida com o MIP. Razão molar = [5-HT]:[composto interferente]. Valor±S.D. para três medidas.

IV.7. Características analíticas dos métodos

Sob condições experimentais e operacionais otimizadas dos sistemas, foi avaliado o desempenho analítico do método com MIP-4-APh e MIP-5-HT. Para tanto, foram determinados os seguintes parâmetros: faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

A curva analítica obtida para o 4-APh (Figura IV.13), com o método desenvolvido para MIP-4-APh aplicando um potencial de -100 mV vs Ag/AgCl com solução tampão TRIS 0,1 mmol L⁻¹ mostrou um intervalo de resposta linear entre 0,8 a 500 µmol L⁻¹ ajustado pela equação $\Delta I = 0,02$ (±0,004) + 0,0009 (±0,0001) [4-APh] com um coeficiente de correlação de 0,9996 pra n = 5, onde a delta de corrente é dado em µA e a concentração do 4-APh em µmol L⁻¹, com uma concentração fixa de 378 µmol L⁻¹ de H₂O₂.



Figura IV.13: (A) Fiagrama obtido para a construção da curva analítica. A = branco; B = 0,8; C = 9,5; D = 90; E = 250 e F = 500 μ mol L⁻¹. Condições: Volume da amostra = 100 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, [H₂O₂] na mini-coluna = 378 μ mol L⁻¹, [TRIS-HCl] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0. (B) Curva analítica.

O limite de detecção (LD) 0,21 μ mol L⁻¹ foi calculado usando uma razão 3 σ /b e limite de quantificação (LQ) de 0,71 μ mol L⁻¹ usando 10 σ /b, sendo σ o desvio padrão do valor médio para dez amperogramas do branco e b o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Commitee, 1987).

Nenhuma mudança significativa foi observada após 100 determinações. A estimativa do desvio padrão relativo (DPR) das medidas foram 4,1 e 3,2 % para 50 e 500 μ mol L⁻¹ de 4-APh, respectivamente. Em comparação a outras interfaces para 4-APh descritas na literatura (ZHANG *et al.*, 2005; SUNA *et al.*, 2001; NIKOLAOS e SUBRAYAL, 2002), o MIP-4-APh desenvolvido apresentou limite de detecção e sensibilidade equivalente. Além disto, o presente sistema apresenta resposta, mais estáveis em longo período de tempo.

A curva analítica para a 5-HT (Figura IV.14), usando o método desenvolvido com MIP-5-HT, foi obtida aplicando o potencial de -100 mV vs Ag/AgCl, com solução tampão TRIS 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0 e uma concentração fixa de peróxido de hidrogênio 310 µmol L⁻¹. A resposta foi linear entre 1,0 a 1000 µmol L⁻¹ de 5-HT expressa de acordo com a seguinte equação: $\Delta I / (\mu A) = 0,009 (\pm 0,001) + 0,00040 (\pm 0,0002) [5-HT] / (\mu mol L⁻¹) com um coeficiente de correlação linear 0,9998 para n = 6.$



Figura IV.14: (A) Fiagrama obtido para a construção da curva analítica. A = branco; B = 1,0; C = 50; D = 100; E = 500, F = 750 e G = 1000 μ mol L⁻¹. Condições: Volume da amostra = 200 μ L, fluxo do tampão = 2,0 mL min⁻¹, [H₂O₂] na mini-coluna = 310 μ mol L⁻¹, [TRIS-HCl] = 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0. (B) Curva analítica.

Os LD e LQ foram expressos de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Commitee, 1987) e foram 0,30 e 0,98 μ mol L⁻¹, respectivamente. O limite de detecção e sensibilidade foi equivalente aos trabalhos para peroxidase baseados em biossensores, reportados na literatura (LINDGREN *et al.*, 1997; LONG e WINEFORDER, 1983; WALSH, 1979; BERGMEYER et al., 1983), mas o presente sistema apresenta resposta, mais estáveis em longo período de tempo. Nenhuma mudança significativa foi observada após 100 determinações. Os valores da precisão expressos em termos do DPR foram 1,3 e 1,7% para n = 6 com padrões de 50 e 750 μ mol L⁻¹ de 5-HT, respectivamente. Isto mostra que o MIP tem uma boa estabilidade e repetibilidade.

IV.8. Aplicação dos Métodos

Afim avaliar o desempenho do método proposto para análises de amostras reais, água de torneira e a água de rio foram usadas com MIP-4-APh. Antes das análises, as amostras de água do rio foram filtradas sob vácuo através de 0,45 µm membrana de acetato de celulose. Desta forma, a fim de averiguar a exatidão das medidas empregou-se testes de adição e recuperação como pode ser visto na Tabela IV.16, com isso a eficiência do método foi assegurada por valores das recuperações entre 96,3 e 111 % para amostras de água.

Ameatras	4-APh adicionado	4-APh encontrado ^a	Recuperação ^b
Amostras	$(\mu mol L^{-1})$	$(\mu mol L^{-1})$	(%)
Água de torneira	_	<lq< td=""><td>_</td></lq<>	_
	5,0	4,85 (± 0,02)	97 (±6)
	8,0	8,87 (± 0,07)	111 (±8)
Água de rio	_	< LQ	_
	5,0	4,8 (± 0,2)	96 (±7)
	8,0	7,930 (± 0,01)	99 (±2)

Tabela IV.16: Percentuais de recuperação de 4-APh obtidos para as amostras analisadas.

^aResultados expressos como média ± desvio padrão para n=3.

^b Recuperação obtida a partir do enriquecimento das amostras. LQ = limite de quantificação.

Para o MIP-5-HT, inicialmente, foram examinadas varias substâncias interferentes, como a glicose, lactose, ácido ascórbico, frutose, ácido úrico e albumina, na determinação de 5-HT. Nenhuma interferência destes compostos foi verificada. Assim, o método foi aplicado para a determinação de 5-HT em amostras de sangue. Para o tratamento das amostras, ácido tricloroacetico (20% m/v) foi adicionado a 2,0 mL do soro e centrifugado por minuto 10 em 1000xg para precipitação das proteínas. As amostras do soro foram diluídas 1:100. Quantidades conhecidas de 5-HT foram adicionadas ao soro, e análises foram realizadas (Tabela IV.17). Este método forneceu precisão e exatidão muito boas às amostras de soro.

Amostra de sangue	Adicionado (µmol L ⁻¹)	Encontrado (µmol L ⁻¹)	Média (µmol L ⁻¹)	Recuperação da média (%)	RSD %
	_	<lq<sup>a</lq<sup>	_	_	_
1	6,0	6,2; 5,9; 6,3	6,1	102,2	3,4
	_	<lq< td=""><td>_</td><td>_</td><td>_</td></lq<>	_	_	_
2	8,0	8,1; 7,9; 8,2	8,1	100,8	1,8
	_	<lq< td=""><td>_</td><td>_</td><td>_</td></lq<>	_	_	_
3	10,0	10,4; 10,7;	10,5	104,7	1,9
		10,3			

Tabela IV.17: Resultados obtidos para determinação de 5-HT em amostras de soro sanguíneo.

^LQ = limite de quantificação.



V. Conclusões Gerais

Este trabalho apresentou pela primeira vez, uma proposta de forma inovadora no que diz respeito ao emprego de nanoreatores biomiméticos baseados em polímeros com impressão molecular (MIP) com ferriprotoporfirina (hemina), como uma estratégia viável de mimetizar a peroxidase para determinação do 4-aminofenol e da serotonina. Além disso, fica evidente a potencialidade da síntese dos polímeros com a hemina, provavelmente, por atuar como grupo prostético (centro catalítico) e também como sendo essencial no papel de reconhecimento molecular.

Os estudos de caracterização empregando os MIPs sintetizados, comprovaram a grande eficiência da estabilidade dos materiais.

A otimização das condições experimentais para detecção amperometrica dos nanoreatores biomiméticos à peroxidase, foi realizada por meio de planejamento fatorial fracionário e matriz de Doehlert, permitindo importantes informações das variáveis pertinentes aos sistemas deste trabalho, com um número menor de experimentos, economia de tempo e reagente. Além disso, esta otimização possibilitou uma boa avaliação dos parâmetros analíticos, com ampla faixa de resposta linear, ótimo limite de detecção, estabilidade e sensibilidade para os analitos estudados superior a vários dispositivos reportados recentemente na literatura científica.

Particularmente, os estudos de seletividade dos MIPs comprovaram a grande eficiência dos mesmos, frente ao NIP e aos MIPs sem hemina. Além disso, tal desempenho seletivo foi reforçado pelo estudo de compostos fenólicos com estruturas similares aos analitos estudados, onde foi possível comprovar que o tamanho dos moldes, a disposição dos grupos funcionais na cavidade tem papel fundamental na afinidade, bem como na atividade catalítica dos MIPs que mimetizam a peroxidase.

Estudos da constate de Michaelis-Menten, retrataram a importância da rota sintética para os MIPs com ação catalítica, tendo em vista as vantagens inerentes dos MIPs em detrimento às enzimas naturais, ratificando portanto, o papel da hemina como grupo prostético que mimetiza a peroxidase.

A partir dos nanoreatores biomiméticos desenvolvidos, foi possível operar a detecção eletroquímica dos analitos, aplicando potencial de 0,1 V *vs*. Ag/AgCl, o que amplia bastante a possibilidade de uso destes nanoreatores em amostras simples e complexas para determinação de compostos fenólicos, pois, neste potencial, tornam-se mais seletivo e muito menos sensível a possíveis interferentes. Desta forma, os nanoreatores mostram-se uma notável ferramenta para a determinação de 4-aminofenol e serotonina em amostras de água e sangue, respectivamente. Os resultados foram avaliados por meio de testes de adição e recuperação mostrando boa exatidão para as amostras analisadas.

CAPÍTULO VI REFERÊNIAS BIBLIOGÁFICAS

VI. Referências Bibliográficas

ALLCOCK, H. R. Contemporary Polymer Chemistry, 2nd Edition, 1990, USA.

AL-KINDY, S.; BADIA, R.; SUAREZ-RODRIGUEZ, J. L.; DIAZ-GARCIA, M. E. Molecularly imprinted polymers and optical sensing applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* v. 30, p. 291–309, 2000.

ALIZADEH, T.; GANJALI, M. R.; NOROZI, P.; ZARE, M.; ZERAATKAR, A. A novel high selective and sensitive para-nitrophenol voltammetric sensor, based on a molecularly imprinted polymer - carbon paste electrode. *Talanta*, v. x, p. x-x, 2009.

Ambient Water Quality Criteria for Phenol, U.S. EPA 440/5-80-066; U.S. EPA, Washington, DC, 1980.

Analytical Methods Committee. Recommendations for the Definition, Estimation and Use of the Detection Limit. *Analyst*, v. 112, p. 199-204, 1987.

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

ANDERSSON, L. I.; Efficient sample pre-concentration of bupivacaine from human plasma by solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers. *Analyst*, v. 125, p. 1515-1517, 2000.

ARKADI, E., ALEXANDER, M., WEN, J., PETRA, R., FRIEDER, S. Biosensor based on an enzyme modified electrode for highly sensitive measurement of polyphenols. *Biosens. Bioelectron.*, v. 10, p. 717–722, 1995.

ARSHADY, R.; MOSBACH, M. Synthesis of substrate selective polymers by host-guest polymerization, Macromol. *Chem. Phys.*, v. 182, p. 687-692, 1981.

BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples, *J. Chromatogr. A*, v. 938, p. 35-44, 2001.

BERGMEYER, H. U.; BERGMEYER, J.; GRABL, M. *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. III, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1983.

BERZELIUS, J. J. Jahresber. Chem., v. 15, p. 242-244, 1835.

BLOOMFIELD, M. S. A sensitive and rapid assay for 4- aminophenol in paracetamol drug and tablet formulation, by flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Talanta*, v. 58, p. 1301–1310, 2002.

British Pharmacopoeia 1993, Volume I, Her Majesty's Stationary Office, London, 1993, p. 415

CAMPANELLA, L.; BEONE, T.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETTI, M. Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. *Analyst*, v. 118, p. 979-986, 1993.

CARO, E.; MARCÉ, R. M.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C.; BORRULL, F. On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water. *J. Chromatogr. A*, v. 995, p. 233-238, 2003.

CARO, E.; MARCÉ, R. M.; CORMACK, P. A.; SHERRINGTON, D. C.; BORRULL, F. Molecularly imprinted solid-phase extraction of naphthalene sulfonates from water, *J. Chromatogr. A*, v. 1047, p. 175-180, 2004.

CHENG, Z.; ZHANG, L.; LI. Y. Synthesis of an enzyme-like imprinted polymer with the substrate as the template, and its catalytic properties under aqueous conditions. *Chem. Eur. J.*, v. 10, p. 3555-3561, 2004.

CHENG, Z.; LI, Y. The role of molecular recognition in regulating the catalytic activity of peroxidase-like polymers imprinted by a reductant substrate. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 256, p. 9-15, 2006.

CHEN, Z.; HUA, Z.; WANG, J.; GUAN, Y.; ZHAO, M.; LI, Y. Molecularly imprinted soluble nanogels as a peroxidase-like catalyst in the oxidation reaction of homovanillic acid under aqueous conditions. *Appl. Catal. A: Gen.*, v. 328, p. 252-258, 2007.

COHEN, G. D. *O cérebro no envelhecimento humano*. São Paulo: Organizações Audrei, 1995. Cap. 2.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *J. Chromatogr. B*, v. 804, p. 173-182, 2004.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G.; MURILLO C.A.; BOCHMANN, M. Advanced Inorganic Chemistry, 6^aed, Jonh Wiley & Sons:New York, 1999.

CHOW, C.; LAM, M. H. W.; LEUNG, M, K. P. Fluorescent sensing of homocysteine by molecular imprinting. *Anal. Chim. Acta*, v. 466, p. 17-30, 2002.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E. Phenoxyacetic acids: separation and quantificative determination. J. Chromatogr. B, v. 717, p. 157-178, 1998.

CUI, X.; HONG, L.; LIN, X. Electrochemical preparation, characterization and application of electrodes modified with hybrid hexacyanoferrates of copper and cobalt. *J. Electroanal. Chem.*, v. 526, p. 115-124, 2002.

DAMIER, P.; HIRSCH, E. C.; AGID, Y.; GRAYBIEL, A. M. The substantia nigra of the human brain: II Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*, v. 122, p. 1437-1448, 1999.

DEL OLMO, M.; DÍEZ, C.; MOLINA, A.; DE ORBE, I.; VILCHEZ, J. L.; *Anal. Chim. Acta*, v. 335, p. 23-33, 1996.

DICKEY, F.H. The preparation of specific adsorbents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 35, p. 227-229, 1949.

DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzymes, 3. ed. New York: Academic Press, 1979.

EDER, K.; BUCHMEISER, M. R.; BONN, G. K. New cation-exchange resins with high reversed-phase character for solid-phase extraction of phenols. *J. Chromatorgr. A.*, v. 810, p. 43-52, 1998.

ELVIRA-COZAR, C.; CANOFAURA, P.; PÉREZ-ARRIBAS, L. V. et al. Trace priority pollutant phenols enrichment from water by ion chromatography. Chromatographia., v. 40, p. 91-95, 1995.

EPA Method 604, Phenol. Environmental Protection Agency, Part III, 40 CFT Part 136, Fed Regist, 1984, p 58.

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

FERNANDEZ-LLANO, L.; BLANCO-LOPEZ, M. C.; LOBO-CASTANON, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUNON-BLANCO, P. Determination of diclofenac in urine samples by molecularly-imprinted solid-phase extraction and adsorptive differential pulse voltammetry. *Electroanalysis*, v. 19, p. 1555-1561, 2007.

FENG, L.; LIU, Y.; ZHOU, X.; HU, J. The fabrication and characterization of a formaldehyde odor sensor using molecularly imprinted polymers. *J. Colloid. Interf. Sci.*, v. 284, p. 378-382, 2005.

FIGUEIREDO, E. C; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T.; RATH, S.; ARRUDA, M. A. Z. On-line molecularly imprinted solid phase extraction for the selective spectrophotometric determination of catechol. *Microchemical Journal*, v. 85, p. 290–296, 2007.

FIAMEGOS, Y. C.; STALIKAS, C. D.; PILIDIS, G. A.; KARAYANNIS, M. I. Synthesis and analytical applications of 4-aminopyrazolone derivatives as chromogenic agents for the spectrophotometric determination of phenols. *Anal. Chim. Acta*, v. 403, p. 315-323, 2000.

FOGG, A. G.; SAUSINS, P. J.; SMITHSON, J. R. The determination of paracetamol and aspirin in mixtures by nonaqueous potentiometric titrimetry or by ultraviolet spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, v. 49, p. 342-345, 1970.

FULCRAND, H.; RENY, S.; SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Study of winw tannin oligomers by on-line chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 1023-1028, 1999.

GALCERAN, M.; JÁUREGUI, O. Determination of phenol in sea waters by liquid chromatography by using solid-phase extraction cartridges and disks. *Anal. Chim. Acta*, v. 301, p. 75-84, 1995.

GHINDILIS, A. L.; MAKOWER, A.; BAUER, C. G.; BIER, F. F.; SCHELLER, F. W. Determination of *p*-aminophenol and catecholamines at picomolar concentrations based on recycling enzyme amplification. *Analytica Chimica Acta*, v. 304, p. 25-31, 1995.

GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINST, M.; WILKINS, E. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 13, p. 113-131, 1998.

GOTO, T.; YOSHIDA, Y.; KISO, M.; NAGASHIMA, H. Simultaneoous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. J. Chromatogr. A, v. 749, p. 295-299, 1996.

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; OYAMA, M.; BACHHETI, N. Gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode for the simultaneous determination of dopamine and serotonin: Application in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Talanta*, v. 72, p. 976–983, 2007.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. *In Adsorption, surface area and porosity*; 2nd Ed.; London, Academic Press Inc., 1982.

GREGERSEN, K.; FRØYLAND, L.; BERSTAD, A.; ARAUJO, P. Direct determination of serotonin in gut lavage fluid by liquid chromatographic ion trap tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 75, p. 466–472, 2008.

GRENNAN, K.; STRACHAN, G.; PORTER, A. J.; KILLARD, A. J.; SMYTH, M. R. Atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single-chain antibody fragments and regeneration-free muti-calibrant measurement. *Anal. Chim. Acta*, v. 500, p. 287-298, 2003.

GUPTA, R.; KUMAR, A. Molecular imprinting in sol-gel matrix. Biotechnology Advances, v. 26, p. 533–547, 2008.

HWANG, C.; LEE, W. Chromatographic Characteristics of Cholesterol-Imprinted Polymers Prepared by Covalent and Non-Covalent Imprinting Methods. J. Chromatogr., A, v. 962, p. 69-78, 2002.

HEDBORG, E.; WINQUIST, F.; LUNDSTROM, I.; ANDERSSON, L. I.; MOSBACH, K. Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sens. Actuators A*, v. 37-38, p. 796-799, 1993.

HERNÁNDEZ, L.; HERNÁNDEZ, P.; VICENTE, J. Voltammetric determination of methyl parathion, ortho, meta and para nitrophenol with a carbon paste electrode modified with c-18. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 345, p. 712-715, 1993.

HEWALA, I. High-performance liquid chromatographic and derivative difference spectrophotometric methods for the determination of acetaminophen and its degradation product in aged pharmaceutical formulations. *Anal. Lett.*, v. 27, p. 561-582, 1994.

HOSOYA, K.; YOSHIZAKO, K.; TANAKA, N.; KIMATA, K.; ARAKI, T.; HAGINAKA, J. *Chem. Lett.*, v. 8, p. 1437-1438, 1994.

HSU, C.-W.; YANG, M.-C. Electrochemical epinephrine sensor using artificial receptor synthesized by sol-gel process. *Sensors and Actuators B*, v. 134, p. 680–686, 2008.

IIER, R. K. The chemistry of silica, John Willey, New York, 1979.

JIN, Q.; SHAN, L.; YUE, J.; WANG, X. Spectrophotometric determination of total serotonin derivatives in the safflower seeds with Ehrlich's reagent and the underlying color reaction mechanism. *Food Chemistry*, v. 108, p. 779–783, 2008.

KAROUSOS, N. G., REDDY, S. M. Determination of 4-aminophenol using the quartz crystal microbalance sensor. *Analyst*,v. 127, p. 368–372, 2002.

KARUBE, I.; NOMURA, Y.; ARIKAMA, Y. Biosensors for environmental control. *Trends Anal. Chem.*, v. 14, p. 295-299, 1995.

KIM, M. A.; LEE, W. Y. Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/Nafion composite film. *Anal. Chim. Acta.*, v. 479, p. 143-150, 2003.

KOSTER, E. H. M.; CRESCENZI, C.; HOEDT, W.; ENSING, K.; JONG, G. J. Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, v. 73, p. 3140-3145, 2001.

KRIZ, D.; MOSBACH, K. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta*, v. 300, p.71-75, 1995.

KROSCHWITZ, I. Concise encyclopedia of polymer science and engineering, 1990, USA.

KUMAR, N.; TRIPATHI, D. R. Plant Peroxidase Newsletter v. 15, p. 45-48, 1999.

LAMAS-ARDISANA, P. J.; QUEIPO, P.; FANJUL-BOLADO, P.; COSTA-GARCÍA, A. Multiwalled carbon nanotube modified screen-printed electrodes for the detection of p-aminophenol: Optimisation and application in alkaline phosphatase-based assays. *Analytica Chimica Acta*, v. 615, p. 30–38, 2008.

LAU, O. W.; LUK, S.; CHEUNG, Y. Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode. *Analyst*, v. 114, p. 1047-1051, 1989.

LEITE, O. D.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A., M. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta*, v. 59, p. 889-896, 2003.

LI, J.; LIN, X. Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B*, v. 124, p. 486–493, 2007.

LI, T.; WANG, E. K. Micell liquid chromatography/ampere electrochemistry determination of p-acetamol and paminophenol in urine. *J. Instrum. Anal.*, v. 15, p. 26–29, 1996.

LI, W.; MENG, W.H.; XU, G.Q.; LI, C.F. Determination of p-aminophenol in mesalazine by HPLC. *Chin. J. Pharm.*, v. 33, p. 96–97, 2002.

LIMBIRD, L. E. The receptor concept: a continuing evolution. *Mol. Interv.*, v. 4, p. 326-336, 2004.

LINDGREN, A.; EMNÉUS, J.; RUZGAS, T.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes. *Analytica Chimica Acta*, v. 347, p. 51-62, 1997.

LIU, R.; ZHOU, J. L.; WILDING, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1022, p. 179-189, 2004.

LONG, G. L.; WINEFORDER, J. D. Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, v. 55, p. 712-724, 1983.

MALITESTA, C.; LOSITO, I.; ZAMBONIN, P. G. Molecularly imprinted electrosynthesized polymers: new materials for biomimetic sensors, *Anal. Chem.*, v. 71, 1366-1370, 1999.

MARKO-VARGA, G.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; RUZGAS, T. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends Anal. Chem.*, v. 14, p. 319-328, 1995.

MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 370, p. 795-802, 2001.

MASQUÉ, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from environmental water. *Anal. Chem.*, v. 72, p. 4122-4126, 2000.

MASQUE, N.; MARCE, R. M.; BORRULL, F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. *Trends Anal. Chem.*, v. 17, p. 384-394, 1998.

MATSUI, J.; OKADA, M.; TSURUOKA, M.; TAKEUCHI, T. Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor. *Anal. Commun.*, v. 34, p. 85-87, 1997.

MAYES, A. G., MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? *Trends Anal. Chem.*, v. 16, p. 321-332, 1997.

MEUNIER, B.; Chem. Rev., v. 92, p. 1411-, 1992.

MONTGOMERY, D. C. Desing and analysis of experiments, 4th ed. New York: Willey, 1996.

MICHAEL, D. J.; WIGHTMAN, R. M. Electrochemical monitoring of biogenic amine neurotransmission in real time. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 19, p. 33-46, 1999.

MITCHELL, S., *Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology*, fourth ed, vol. II, Wiley, New York, USA, 1992, p. 580.

MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments, 5th ed., Wiley, New York, 2000.

NIKOLAOS G. K.; SUBRAYAL M. R. Determination of 4-aminophenol using the quartz crystal microbalance sensor. *Analyst*, v. 127, p. 368-372, 2002.

NISTOR, C.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; CIUCU, A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta*, v. 387, p. 309-326, 1999.

NIWA, O.; XU, Y.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R.; Small-volume voltammetric detection of 4-aminophenol with interdigitated array electrodes and its application to electrochemical enzyme immunoassay. *Anal. Chem.*, v. 65, p. 1559–1563, 1993.
ONI, J.; NYOKONG, T. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and serotonin on carbon paste electrodes modified with iron (II) phthalocyanine complexes. Analytica Chimica Acta, v. 434, p. 9–21, 2001.

ORTEGA, F.; DOMÍNGUEZ, E.; BURESTEDT, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. *J. Chromatogr. A*, v. 675, p. 65-78, 1994.

PAULING, L.J. A Theory of the structure and process of formation of antibodies. J. Am. Chem. Soc., v. 62, p. 2643-2657, 1940.

PETERSON, Z. D.; LEE, M. L.; GRAVES, S. W. Determination of serotonin and its precursors in human plasma by capillary electrophoresis–electrospray ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 810, p. 101–110, 2004.

PLUNKETT, S.; ARNOLD, F. Molecularly imprinted polymers on silica: selective supports for high-performance ligand-exchange chromatography. *J. Chromatogr.*, *A*, v. 708, p. 19-29, 1995.

POCURULL, E.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. Improvement of on-line solid-phase extraction for determining phenolic compounds in water. Chromatographia, v. 41, p. 521-526, 1995a.

POCURULL, E.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. Liguid chromatpgraphy of phenolic compounds in natural water using on-line trace enrichement. *Chromatographia*, v. 40, p. 85-90, 1995b.

PRASAD, B. B.; BANERJEE, S. Determination of diquat herbicide by selective enrichment by column chromatography on imprinted polymer immobilised on silica gel. *Chromatographia*, v. 55, p. 171-176, 2002.

PRASAD, B. B.; SHARMA, P. S.; LAKSHMI, D. Molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-based sensor for detection of uric acid. *J. Chromatogr. A*, v. 1173, p. 18-26, 2007.

PUIG, D.; BARCELÓ, D. Comparison of different sorbent materials for online liquid-solid extraction followed by liquid chromatographic determination of priority phenolic compounds in environmental waters. *J. Chromatogr. A*, v. 733, p. 371-381, 1996.

PUIG, D.; RUZGAS, T.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G.; BARCELÓ, D. Characterization of tyrosinase-teflon-graphite composite electrodes for the determination of catechol in environmental analysis. *Electroanalysis*, v. 8, p. 885-890, 1996.

PULGARIN, C.; KIWI, J. Iron oxide-mediated degradation, photodegradation, and biodegradation of aminophenols. *Langmuir*, v. 11, p. 519-526, 1995.

QUAGLIA, M.; DE LORENZI, E.; SULITZKY, C.; MASSOLINI, G.; SELLERGREN, B. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrochromatography. *Analyst*, v. 126, p. 1495-1498, 2001.

QU, Y; MOONS, L.; VANDESANDE, F. Determination of serotonin, catecholamines and their metabolites by direct injection of supernatants from chicken brain tissue homogenate using liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography B, v. 704, p. 351–358, 1997.

RAMSTROM, O.; YE, L.; MOSBACH, K. Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting. *Chem Biol*, v. 3, p. 471-477, 1996.

RAU, H. L.; AROOR, A. R.; RAO, P. G. Simultaneous determination of paracetamol and diclofenac sodium by HPLC in combined dosage forms. *Indian Drugs*, v. 28, p. 285-286, 1991.

RODRÍGUEZ, I.; LLOMPART, M. P.; CELA, R. Solid-phase extraction of phenols. *J. Chromatogr. A*, v. 885, p. 291-304, 2000.

RUANA, J.; URBE, I. Determination of phenols at the ng/l level in drinking and rivers waters by liquid chromatographic with UV and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, v. 655, p. 271-226, 1993.

RUSSELL, I. M.; BURTON, S. G. Development and demonstration of an immobilized polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water. *Anal. Chim. Acta*, v.389, p. 161-170, 1999.

SELLERGREN, B. Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry, 2001, Netherlands.

SELLERGREN, B. Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes. *Macromol. Chem. Phys.*, v. 190, p. 2703-2711, 1989.

SELLERGREN, B. Trends Anal. Chem., v. 16, p. 310-320, 1997.

SCHWEITZ, L.; ANDERSSON, L. I.; NILSSON, S. Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting. *Anal. Chem.*, v. 69, p. 1179-1183, 1997.

SCHWARZ, L.; HOLDSWORTH, C. I.; MCCLUSKEY, A.; BOWYER, M. C. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer selective to 2,4,6-trichlorophenol. *Aust J Chem*, v. 57, p. 759-764, 2004.

SCHULTZ, B. Determination of 4-aminophenol in water by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr*, v. 299, p. 484-486, 1984.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K.; SINGH, B. Thin-layer chromatographic of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, cathecol, resorcinol, hydriquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid ferrulic acid and tannic acid. *J. Chromatogr. A*, v. 822, p. 167-171, 1998.

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

STAIMER, N.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. D. Development of a classselective enzyme immunoassay for urinary phenolic glucuronides. *Analytica Chimica Acta*, v. 444, p. 27–36, 2001. SRIVASTAVA, M. K.; AHMAD, S.; SINGH, D.; SHUKLA, I. C. Titrimetric determination of dipyrone and paracetamol with potassium hexacyanoferrate(III) in an acidic medium. *Analyst*, v. 110, p. 735-737, 1985.

SUEDEE, R.; SRICHANA, T.; SAELIM, J.; THITIRAT, T. Chiral determination of various adrenergic drugs by thin-layer chromatography using molecularly imprinted chiral stationary phases prepared with –agonists. *Analyst*, v. 124, p. 1003-1009, 1999.

SVITEL, J.; MIERTUS, S. Development of tyrosinase-based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, v. 32, p. 828-832, 1998.

STEVENSON, D. Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.*, v. 18, p. 154-158, 1999.

SUNA, W.; JIAO, K.; ZHANG, S.; ZHANG, C.; ZHANG, Z. Electrochemical detection for horseradish peroxidase-based enzyme immunoassay using p-aminophenol as substrate and its application in detection of plant virus. *Anal. Chim. Acta*, v. 434, p. 43-50, 2001.

SUN, Y.; FEI, J.; HOU, J.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; HU, B. Simultaneous determination of dopamine and serotonin using a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified glassy carbon electrode. *Microchim Acta*, v. 165, p. 373–379, 2009.

TAI, D.; LIN, C.; WU, T.; CHEN, L. Recognition of Dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film. *Anal. Chem.*, v. 77, p. 5140-5143, 2005.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. polímeros biomiméticos em química analítica. parte 1: preparo e aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em técnicas de extração e separação, *Quim. Nova*, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Molecularly imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by

differential pulse voltammetry. Analytica Chimica Acta, v. 548, p. 11-19, 2005.

TARLEY, C. R. T.; SEGATELLI, M. G.; KUBOTA, L. T. Amperometric determination of chloroguaiacol at submicromolar levels after on-line preconcentration with molecularly imprinted polymers. Talanta, v. 69, p. 259–266, 2006.

TRAU, D.; THEUERL, T.; WILMER, M.; MEUSEL, M.; SPENER, F. Development of an amperometric flow injection immunoanalysis system for the determination of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacettc acid in water. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 12, p. 499-510, 1997.

TOMA, H. E. Química Bioinorgânica, Ed. OEA: Washington DC, 1984.

TONG, A.; DONG H.; LI, L. Molecular imprinting-based fluorescent chemosensor for histamine using zinc(II)–protoporphyrin as a functional monomer. *Anal. Chim. Acta*, v. 466, p. 31-37, 2002.

VIÑAS P.; LÓPEZ-ERROZ, C.; MARÍN-HERNÁNDEZ, J. J.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, v. 871, p. 85-93, 2000.

TONG, A., DONG H., LI L. Molecular imprinting-based fluorescent chemosensor for histamine using zinc(II)–protoporphyrin as a functional monomer. *Anal. Chim. Acta*, v. 466, p. 31-37, 2002.

VALLE, L. B. S.; OLIVEIRA FILHO, R. M.; DELUCIA, R.; OGA, S. *Farmacologia integrada: fundamentos farmacológicos da terapêutica*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. v. 2, p. 27.

VINCENT, G.; In: ANGELETTI, G.; BJORSETH, A. (Eds), Organic Micropollutants in the Aquatic Environmental, Klumer Dordrecht, 1991, p. 285.

WALSH, C. *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, W. H. San Francisco, 1979.

WANG, Z. H.; ZHANG, J. H.; ZHAO, G. X. Determination of p-nitrophenol in water and waste water by reduction fluorimetry. *Chin J. Anal. Chem.*, v. 21, p. 581–583, 1993.

WHITCOMBE, M.J.; RODRIGUEZ, M.E.; VILLAR, P.; VULFSON, E.N. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting – synthesies and characterization of polymeric recptors for cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 117, p. 7105-7111, 1995.

WULFF, G. Molekulares prägen (imprinting) in vernetzten materialien mit hilfe von matrizenmolekülen - auf dem weg zu künstlichen antikörpern *Angew Chem*, v. 107, p. 1958-1979, 1995.

WULFF, G.; SARHAN, A. Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung, *Angew. Chem.*, v. 84, p. 364, 1972.

WULFF, G.; SARHAN, A. Macromolecular Colloquium. Angew Chem., Int. Ed., v. 11, p. 334-342, 1972.

WU, K.; FEI, J.; HU, S. Simultaneous determination of dopamine and serotonin on a glassy carbon electrode coated with a film of carbon nanotubes. Analytical Biochemistry, v. 318, p. 100–106, 2003.

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

YANG, X.; KULKARNI, A. P. Lipoxygenase-mediated biotransformation of p-aminophenol in the presence of glutathione: possible conjugate formation. *Toxicology Letters*, v. 111, p. 253–261, 2000.

YAO, H.; LI, S.; TANG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; LIN, X. Selective oxidation of serotonin and norepinephrine over eriochrome cyanine R film modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, v. 54, p. 4607–4612, 2009.

YE, L.; CORMACK, P.A.G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. *Anal. Commun*, v. 36, n. 2, p. 35-38, 1999.

YESILADA, A.; ERDOGAN, H.; ERTAN, M. Derivative spectrophotometric determination of *p*-aminophenol in the presence of paracetamol. *Anal. Lett.*, v. 24, p. 129-138. 1991.

YILMAZ, E.; RAMSTRÖM, O.; MÖLLER, P.; SANCHEZ, D.; MOSBACH, K. A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates. *J. Mater. Chem.*, v. 12, p. 1577-1581, 2002.

YOSHITAKE, T.; IIZUKA, R.; KEHR, J.; NOHTA, H.; ISHIDA, J.; YAMAGUCHI, M. Determination of serotonin in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 109, p. 91–96, 2001.

YOSHITAKE, T.; FUJINO, K.; KEHR, J.; ISHIDA, J.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. Analytical Biochemistry, v. 312, p. 125–133, 2003.

ZHANG, S. S.; LIU, H. X.; YUAN, Z. B. Comparison of high-performance capillary electrophoresis and liquid chromatography on analysis of zinc 5-aminosalicylate dihydrate and related materials. *J. Chromatogr. B*, v. 705, p. 165–170, 1998.

ZANINI, A.; OGA, S. *Farmacologia aplicada*. Ed. São Paulo: Atheneu, 1994, Cap. 21 e 26.

ZENA, J.-M.; CHENA, I.-L.; SHIH, Y. Voltammetric determination of serotonin in human blood using a chemically modified electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 369, p. 103-108, 1998.

ZHANG X.; WANG S.; SHEN Q. The electrochemical behavior of p-aminophenol at a ω -mercaptopropionic acid self-Assembled gold electrode. *Microchim Acta*, v. 149, p. 37-42, 2005.

ZHU, S. W.; TAN, P. G. Determination of parathion in water and waste water by fluorimetry. *J. Qingdao Inst. Arch. Eng.*, v. 16, p. 33–35, 1995.

ZIMMERMANN, F.; TAYLOR-MAYER, R. *Mutagenicity testing in environmental pollution control*, John Wiley and Sons, New York, 1985, p. 1.

ZURUTUZA, A.; BAYOUDH, S.; CORMACK, P. A. G.; DAMBIES, L.; DEERE, J.; BISCHOFF, R.; SHERRINGTON, D. C. Molecularly imprinted solid-phase extraction of cocaine metabolites from aqueous samples, *Anal. Chim.*, v. 542, p. 14-19, 2005.



VII. Perspectivas

Como perspectivas futuras propõem-se a continuidade dos estudos, mais agora com o emprego de sensores químicos com MIP. Para tanto, será investigada inicialmente as várias formas de síntese da qual possa ser usada na imobilização sobre a superfícies dos eletrodos.

Tentar ver qual a melhor forma de imobilização e as diferentes matrizes para posterior aplicação de espécies de interesse seja na área ambiental, farmacêutica ou biológica.