



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Programa de Pós-graduação em Química



GABRIEL DE OLIVEIRA ISAC MORAES

***SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR
RESTRITO À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR
MEIO DE REVESTIMENTO COM ALBUMINA (RAM-MIP-BSA),
PARA ANÁLISE DIRETA DE CLORPROMAZINA EM PLASMA
POR SISTEMA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
BIDIMENSIONAL***

Alfenas MG
2012

GABRIEL DE OLIVEIRA ISAC MORAES

***SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR
RESTRITO À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR
MEIO DE REVESTIMENTO COM ALBUMINA (RAM-MIP-BSA),
PARA ANÁLISE DIRETA DE CLORPROMAZINA EM PLASMA
POR SISTEMA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
BIDIMENSIONAL***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, Área de Concentração: Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Alfenas MG
2012

Moraes, Gabriel de Oliveira Isac.

Síntese de um polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAM-MIP-BSA), para análise direta de clorpromazina em plasma por sistema de cromatografia líquida bidimensional / Gabriel de Oliveira Isac Moraes. - 2012.

64 f. -

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Clorpromazina. 2. Polímeros. 3. Impressão Molecular. 4. Plasma. 5. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. I. Figueiredo, Eduardo Costa. II. Título.

CDD: 543

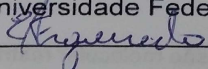
Gabriel de Oliveira Isac Moraes

**SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO
MOLECULAR RESTRITO À LIGAÇÃO COM
MACROMOLÉCULAS POR MEIO DE REVESTIMENTO
COM ALBUMINA (RAM-MIP-BSA), PARA ANÁLISE
DIRETA DE CLORPROMAZINA EM PLASMA POR
SISTEMA DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
BIDIMENSIONAL**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Química Analítica.

Aprovada em:

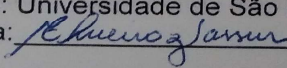
Prof. :Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. :Fábio Luiz Pissetti
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. : Maria Eugênia Queiroz Nassur
Instituição: Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

Assinatura: 

Às duas pessoas que me
suportam diariamente e sempre
acreditam na minha mudança
e que me fazem um homem
feliz. Regiane e Maria Clara,
amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me carregou nos momentos de cansaço, me acordou e protegeu durante as madrugadas de análise e que é meu refúgio e fortaleza.

Ao professor doutor Eduardo Costa de Figueiredo que aceitou o desafio de orientar uma pessoa sem tempo e base teórica, porém com muita vontade. Aos professores Álvaro e Fábio que sempre acreditam no meu trabalho e me incentivam no crescimento profissional, e a discente Larissa pelas discussões durante as longas noites de trabalho.

Aos professores e funcionários da Bioquímica, que me acolheram tão bem nesta instituição. Pela paciência que tiveram durante a realização deste projeto, em especial a professora Maísa pela confiança e pelo constante incentivo de crescimento.

Aos professores, técnicos e colegas do LFQM, LANTIM, LabIQ, LATF, IQ, ICEX, funcionários dos serviços gerais, seguranças, enfim a todos aqueles que estiveram ao meu lado nesta luta, meu muito obrigado.

Aos amigos conquistados em Alfenas, principalmente na Sociedade São Vicente de Paulo que é onde posso olhar nos olhos daquele que sofre, encontrar DEUS e agir para que sua vida mude e o evangelho se torne realidade.

Finalmente aos meus pais, os quais pude ver nos últimos anos como meus amigos e como as únicas pessoas que posso realmente contar e que nunca vão me abandonar. Obrigado meu DEUS por ter tido a oportunidade de descobrir em tempo o valor da minha família. Pai e Mãe amo muito vocês.

RESUMO

Um polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por meio de revestimento com albumina (do inglês “*restrict access molecularly imprinted polymer coated with albumine*” – RAM-MIP-BSA) foi sintetizado para a análise de clorpromazina em plasma humano por injeção direta em cromatografia líquida bidimensional. Primeiramente foram colocados no meio reacional o ácido metacrílico como monômero funcional, o etileno glicol dimetacrilato como agente de ligação cruzada, a 2,2 – azo isobutironitrila como iniciador radicalar, a clorpromazina como molécula modelo e o clorofórmio como solvente. O sistema foi mantido sob agitação por 60 minutos a 60°C. Depois, adicionou-se ao meio reacional hidróxi etil metacrilato e glicidil metacrilato como monômeros hidrofílicos. Após 24 h o polímero foi recolhido, lavado, tamisado e recoberto com albumina utilizando-se glutaraldeído como agente reticulante bifuncional. O RAM-MIP-BSA foi empacotado em uma pré-coluna de HPLC (high performance liquid chromatography) de 1 cm e sua capacidade de eliminação de macromolécula foi testada obtendo-se eliminação superior a 99%. Para os demais testes a pré-coluna foi utilizada em sistema de cromatografia líquida bidimensional. A amostra é injetada e as macromoléculas são eliminadas enquanto o analito é retido. Num segundo estágio o analito é eluído e conduzido para coluna analítica. Água ultra-pura e uma solução de acetonitrila:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 45:55 (v/v) foram empregadas como fase de extração e fase móvel respectivamente. As análises foram executadas utilizando-se um detector UV/Vis a 313 nm. Para validação analítica da clorpromazina foi utilizando um pool de amostra de plasma humano de diferentes indivíduos voluntários, fortificadas em oito níveis de concentração, contemplando assim o intervalo terapêutico de 50-300 µg L⁻¹ segundo a FDA. O método foi linear na faixa de 30-350 µg L⁻¹, com $r > 0,99$ e limite de quantificação de 30,0 µg L⁻¹. A precisão e exatidão intra-dias e inter-dias foram avaliadas com base no desvio padrão relativo (DPR) e no erro relativo (E) respectivamente e todos os resultados foram inferiores a 15% de acordo com a FDA. A recuperação foi de 80%.

Palavras chave: Clorpromazina. Polímero. Impressão Molecular. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Plasma.

ABSTRACT

A restrict access molecularly imprinted polymer coated with albumin (RAM-MIP-BSA) has been synthesized and used for direct analysis of chlorpromazine from human plasma by using bidimensional liquid chromatography. The synthesis was carried out in three steps. First, methacrylic acid (functional monomer), ethylene glycol dimethacrylate (cross-linker), 2,2 azoisobutironitrile (initiator) and chlorpromazine were dissolved in chloroform and the mixture was maintained at 60°C during 60 min. In the second step, 2-hydroxy ethyl acrylate and glycidil (both hydrophilic co-monomers) were added into the flask and the synthesis was processed during 24h at 60°C. The obtained polymer was washed several times and coated with bovine serum albumin by using glutaraldehyde as cross-linker. The material presented a macromolecules elimination ability larger than 99%. It was packed in a column (4.4 x 10 mm) and used in a column switching system. Deionized water and 45:55 (v/v) acetonitrile:sodium acetate buffer (pH=4.1) were employed as extraction solvent and mobile phase, respectively. The analytical curve was built using a human plasma pool of different volunteers, added with the drug in 8 different concentrations. The method has shown to be linear in the range from 30 to 350 $\mu\text{g L}^{-1}$, with $r > 0.99$ and quantification limit of 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Precision and accuracy were evaluated by using relative standard deviation and relative error, respectively, and all the results are in accordance with FDA recommendations. Additionally, good recoveries and selectivity were also obtained.

Keywords: Chlorpromazine. Polymer. Molecularly Imprinted. High Performance Liquid Chromatography. Plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de reagentes de ligação cruzada utilizados na síntese do MIP.	18
Figura 2 - Exemplos de iniciadores radicalares empregados na impressão molecular.	19
Figura 3 - Esquema genérico da síntese de MIP	20
Figura 4 - Número de publicações sobre MIP desde 1989. Pesquisa realizada na Web of Sciences no dia 19-06-2012 com as palavras: molecular* imprint* polimer*.	21
Figura 5 - Esquema de um RAM com mecanismo de exclusão por barreiras físicas (A) e químicas (B).	22
Figura 6 - Número de publicações sobre RAM desde de 1989. Pesquisa realizada na web of Sciences no dia 19-06-2012 com as palavras chave restric* access material*.	23
Figura 7 - Sistema bidimensional com dois pré-tratamentos RAM e MIP.	24
Figura 8 - Sistema de síntese de RAM-MIP da maioria dos artigos da literatura.	26
Figura 9 - Estrutura química do glicidil metacrilato	26
Figura 10 - Sistema de síntese de RAM-MIP utilizado para liberação controlada de fármacos.	27
Figura 11 - Primeira etapa da síntese de RAM-MIP para análise em leite. Síntese da “ <i>iniferter-silica</i> ”.	28
Figura 12 - Segunda etapa da síntese de RAM-MIP para análise em leite. Síntese do MIP.	29
Figura 13 - Síntese final do RAM-MIP. Adição do revestimento hidrofílico.	29
Figura 14 - Estrutura química do glico-monômero octa-acetato de lactose.(MAEL)	30
Figura 15 - Síntese do glyco-MIP	30
Figura 16 - Estrutura química da clorpromazina	31
Figura 17 - Esquema genérico de um sistema bidimensional	32

Figura 18 - Montagem utilizada para realização de síntese pelo método de precipitação.	36
Figura 19 - Estruturas químicas do GDMA e mistura de isômeros(A) e HEMA(B)	37
Figura 20 - Esquema de empacotamento pelo método <i>slurry</i>	39
Figura 21 - Pré-coluna recheada com RAM-MIP-BSA	39
Figura 22 - Sistema bidimensional que será utilizado durante as análises nas posições A e B.	40
Figura 23 - Esquema utilizado para teste de eliminação de BSA nos polímeros sintetizados. Detector foi ajustado para 313 nm.	42
Figura 24 - Cromatogramas com respectivas áreas obtidas para padrão de BSA 44mg mL ⁻¹ em sistema sem coluna, com coluna RAM-NIP-BSA e com coluna RAM-MIP-BSA.	45
Figura 25 - Gráfico correspondente as várias injeções de clorpromazina 200µg L ⁻¹ em solução com BSA 10 mg mL ⁻¹ BSA.	45
Figura 26 - Estrutura química da flufenazina (A), dopamina (B) e catecol (C).	46
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura do MIP 25,00Kx, com tamanho estimado de partícula de 66 nm.	48
Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura do RAM-MIP-BSA 25,00Kx, com tamanho estimado de partícula de 333 nm.	48
Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura do RAM-MIP-BSA 50,00Kx, com tamanho estimado de partícula de 333 nm.	49
Figura 30 - Influência do tempo na adsorção de clorpromazina no RAM-MIP-BSA (n=3).	50
Figura 31 - Isoterma de adsorção da clorpromazina no RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA (n=3).	50
Figura 32 - Isoterma linearizada de Freundlich na adsorção de clorpromazina no RAM-MIP-BSA (n=3)	51
Figura 33 - Isoterma linearizada de Langmuir para a adsorção de clorpromazina no RAM-MIP-BSA (n=3)	52
Figura 34 - Isoterma linearizada de Langmuir na adsorção de clorpromazina no RAM-NIP-BSA (n=3)	52

- Figura 35** - Cromatogramas obtidos pela injeção direta de um padrão de clorpromazina em plasma total no sistema bidimensional, empregando 45:55 (v/v) metanol:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 como fase móvel. 53
- Figura 36** - Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão de clorpromazina em plasma total no sistema bidimensional, empregando 45:55 (v/v) acetonitrila:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 como fase móvel. 54
- Figura 37** - Cromatogramas obtidos pela injeção direta de um padrão de clorpromazina em plasma total no sistema bidimensional, empregando 30(preto) e 60(vermelho) segundos de eluição. Tempo de retenção da clorpromazina igual a 12,4 min. 55
- Figura 38** - Cromatograma do Branco empregando 45:55(v/v) acetonitrila:tampão acetato de sódio 0,2mol L⁻¹ pH 4,1 como fase móvel 55
- Figura 39** - Curva de calibração para análise de linearidade com os pontos 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg L⁻¹ 57
- Figura 40** - Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão de clorpromazina na concentração de 30 µg L⁻¹ (LiQ) em plasma total no sistema bidimensional, empregando 45:55 (v/v) acetonitrila:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 como fase móvel. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais Monômeros Funcionais	17
Tabela 2 - Diferentes metodologias de síntese do RAM-MIP em termos de proporção de reagentes e eliminação de BSA(n=3) com adição de reagentes com caráter hidrofílico no início.	43
Tabela 3 - Diferentes metodologias de síntese do RAM-MIP em termos de proporção de reagentes e eliminação de BSA(n=3) com adição de reagentes com caráter hidrofílico após início da polimerização.	44
Tabela 4 - Resultados obtidos nos testes de seletividade utilizando clorpromazina, flufenazina, dopamina e catecol	47
Tabela 5 - Controle do software LC-Solution para o sistema bidimensional otimizado.	56
Tabela 6 - Parâmetros de Validação intra e inter-dias e seus respectivos resultados	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-VP	-	4-Vinil piridina
ABDV		Azo-bis-dimetilvaleronitrila
ADS		Alquil diol sílica
AIBN		2,2-azoisobutironitrila
ALC		Agente de ligação cruzada
ANVISA		Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA		Albumina bovina sérica
CAQI/IQSC/USP		Central de Análise Química Instrumental/ Instituto de Química de São Carlos/ Universidade de São Paulo
HPLC		Cromatografia líquida de alta eficiência
DIP		1,3-diisopropenilbenzeno
DMF		Dimetil formamida
DVB		p-divinilbenzeno
EGDMA		Etileno glicol dimetacrilato
FDA		Food and Drug Administration
FT-IR		Espectrômetro de infra-vermelho
GMA		Glicidil metacrilato
GDMA		Glicidil dimetacrilato
GMMA		Glicidil monometacrilato
HEMA		Hidróxi-etilmetacrilato
IR		Iniciador radicalar
LLE		Extração líquido-líquido
MEV		Microscopia eletrônica de varredura
MF		Monômero funcional
MIP		Polímero de impressão molecular
MM		Molécula modelo
N		Número de amostras
NIP		Polímero não impresso
RAM		Material de acesso restrito
RAM-MIP		Polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas
RAM-MIP-BSA		Polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina bovina sérica

RAM-NIP	Polímero não impresso restrito à ligação com macromoléculas
RAM-NIP-BSA	Polímero não impresso restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina bovina sérica
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultra-violeta
UV/Vis	Ultra-violeta/visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Polímeros de Impressão Molecular	16
2.2	Material de Acesso Restrito	21
2.3	Polímeros de Impressão Molecular Restrito a Macromoléculas	23
2.4	Fenotiazínicos	31
2.5	Cromatografia Bidimensional	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivos Específicos	33
4	PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1	Materiais e equipamentos	34
4.2	Reagentes e soluções	34
4.3	Síntese do RAM-MIP-BSA	35
4.4	Caracterização	37
4.5	Empacotamento de coluna	39
4.6	Montagem e otimização do sistema bidimensional	39
4.7	Validação do método	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Estudo das diferentes metodologias de síntese do RAM-MIP-BSA	42
5.2	Caracterização do RAM-MIP-BSA	47
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	47
5.2.2	Estudo de Adsorção	49
5.3	Otimização do sistema bidimensional	53
5.4	Validação	56
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Acompanhando o grande desenvolvimento tecnológico dos últimos anos, a Química Analítica tem apresentado soluções viáveis a problemas outrora desafiadores. Técnicas de preparo de amostra cada vez mais seletivas têm permitido a extração de diferentes compostos em amostras cada vez mais complexas. Nesse contexto, a eliminação de substâncias indesejadas, bem como a pré-concentração do analito são etapas de grande importância para o aumento da sensibilidade analítica.

Especificamente na análise de fluidos biológicos por cromatografia líquida, a presença de macromoléculas apresenta-se como um complicado problema analítico. As proteínas podem se ligar irreversivelmente à fase estacionária, resultando em substancial diminuição na eficiência da coluna analítica, além de causarem um aumento significativo na pressão interna do sistema (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004). Dessa forma, diferentes estratégias têm sido empregadas para a eliminação dessas macromoléculas, tais como a precipitação por ácidos ou solventes orgânicos (PEREZ, 2004), a extração líquido-líquido (LLE) (HUANG et al. 2006), a extração por membrana (ROSE; WOOLF; MATUSZEWSKI, 2000), a extração em fase sólida (SPE) (RIZZO et al. 2005), dentre outras. Tradicionalmente, a precipitação de proteínas é considerada a técnica mais rápida e simples para resolver esse problema. Contudo a diluição da amostra e a precipitação dos fármacos ligados diretamente as proteínas, pode restringir seu uso (POLSON et al. 2003). Por outro lado, ressalta-se que grande parte dos trabalhos sobre o preparo de amostra para separação/detecção de analitos por cromatografia líquida emprega a SPE. Algumas importantes vantagens dessa técnica destacam-se em comparação às demais, como o baixo consumo de solventes, a possibilidade de automação, o alto rendimento de retenção do analito, a possibilidade de pré-concentração, dentre outras.

Atualmente, é dada grande atenção à elaboração de adsorventes de extração (para SPE) eficientemente capazes de purificar amostras complexas. Nesse sentido, dois materiais utilizados no processo de extração têm se destacado: i) os polímeros de impressão molecular (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers* - MIP) (ANDERSSON, 2000) que são materiais capazes de sequestrar seletivamente uma molécula, e ii) os materiais de acesso restrito (do inglês *Restrict Access Materials* - RAM) (YIM; JEONG; PARK, 2001), que são materiais capazes de reter diversos analitos de baixo peso molecular e eliminar macromoléculas como proteínas e polipeptídios.

Como principal vantagem dos MIP pode-se destacar sua alta seletividade a uma molécula ou classe de moléculas. Contudo, esses materiais são susceptíveis à ligação com macromoléculas, inviabilizando a extração direta em fluidos biológicos. Já os RAM, embora eficientes na eliminação de macromoléculas, não apresentam reconhecimento molecular e por isso são pobres em seletividade. Dessa forma, (HAGINAKA et al. 1999) propuseram um material que associa as características vantajosas dos RAM e dos MIP em um único polímero capaz de reter seletivamente uma dada molécula e eliminar quantitativamente as macromoléculas. Esse polímero, denominado de RAM-MIP, apresentou sítios específicos de reconhecimento molecular, bem como grupos hidrofílicos externos que bloqueavam a ligação com proteínas. A aplicação analítica deste polímero aconteceu por meio de um sistema bidimensional acoplado a um cromatógrafo líquido. O analito era pré-concentrando e as macromoléculas eram eliminadas.

Embora esse novo procedimento desenvolvido por (HAGINAKA et al. 1999) (emprego de polímeros hidrofílicos) tenha apresentado relevantes resultados quanto a eliminação de macromoléculas, não é possível estabelecer qualquer análise comparativa desse material porque não há, na literatura, até o presente momento, qualquer outro procedimento referente ao revestimento de MIP para a obtenção de RAM-MIP, a não ser por meio do uso de monômeros hidrofílicos.

Sendo assim, os estudos sobre RAM-MIP são certamente desafiadores e promissores pelas suas diversificadas aplicações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O reconhecimento molecular desempenha papel crucial em vários processos vitais, tais como síntese protéica, catálise enzimática, replicação do DNA, respostas imunitárias, replicação viral e atividade de fármacos (ANDERSSON, 2003).

Nesses sistemas, as biomoléculas possuem sítios receptores capazes de se ligar seletivamente a uma molécula, na presença de outras com estruturas moleculares análogas. Na prática, os anticorpos são covalentemente ligados a um sorvente apropriado, originando os imunossorventes. Apesar das características marcantes dos imunossorventes como material seletivo, existem algumas desvantagens relacionadas aos anticorpos: custo elevado, necessidade de purificação, dificuldade de obtenção e instabilidade (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

A mimetização das condições necessárias ao reconhecimento molecular, não por entidades biológicas, mas por materiais sintéticos, leva ao designado reconhecimento molecular artificial (ANDERSSON, 2003).

2.1 Polímeros de Impressão Molecular

Os polímeros de impressão molecular (MIP) são materiais rígidos e tridimensionais sintetizados ao redor de uma molécula modelo, por meio de ligação covalente ou não covalente, resultando em sítios seletivos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). Após a síntese, esses materiais sintéticos permitem a ligação da uma molécula-alvo ou de moléculas estruturalmente semelhantes, com um grau de seletividade nunca antes visto quando do emprego de qualquer outro material utilizado no processo de extração (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

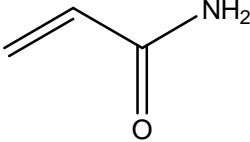
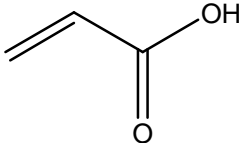
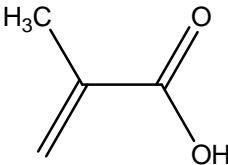
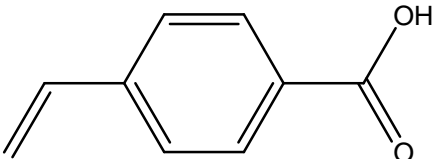
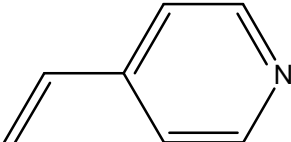
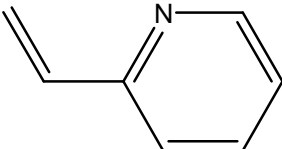
Os componentes empregados numa síntese devem apresentar características particulares que são de grande importância para o futuro reconhecimento molecular (BERGMANN; PEPPAS, 2008). Por exemplo, o solvente desempenha um papel importante na estabilidade entre as interações da molécula modelo e do monômero funcional, influenciando diretamente nas características morfológicas do material. Além disso, o solvente ideal deve ser capaz de solubilizar todos demais reagentes da síntese (KITAHARA et al. 2010).

A molécula modelo é o analito usado para moldar estereoquímicamente os sítios de ligação. Ela não deve conter grupos envolvidos na polimerização, além de manter a estabilidade química do polímero e apresentar grupos funcionais bem adaptados para a ligação com o monômero funcional (GUO et al. 2006).

Os monômeros funcionais são responsáveis pela ligação entre a molécula modelo e a rede polimérica, com isso sua escolha está diretamente ligada às

características do analito em questão. A força das interações determina a seletividade do material, e a proporção molar determina a quantidade de cavidades disponíveis para as futuras ligações (RACHKOV; MINOURA, 2001). Na Tabela 1 encontram-se listados os principais monômeros funcionais empregados em sínteses de MIP.

Tabela 1 – Principais Monômeros Funcionais.

Monômero funcional	Nome do monômero
	Acrilamida
	Ácido acrílico
	Ácido metacrílico
	Ácido p-vinilbenzóico
	4-Vinilpiridina
	2-Vinilpiridina

O agente de ligação cruzada é responsável pela rigidez do polímero, uma vez que promove a interligação das cadeias poliméricas formadas pelos monômeros funcionais. Sua relação com o monômero funcional deve ser bem estudada, no sentido de favorecer o número de cavidades efetivas e minimizar o número de cavidades com configuração não complementar à molécula modelo. Na FIG. 1 são apresentados os principais agentes de ligação cruzada utilizados na síntese do MIP (HOGENDOORN; ZONEN, 2000).

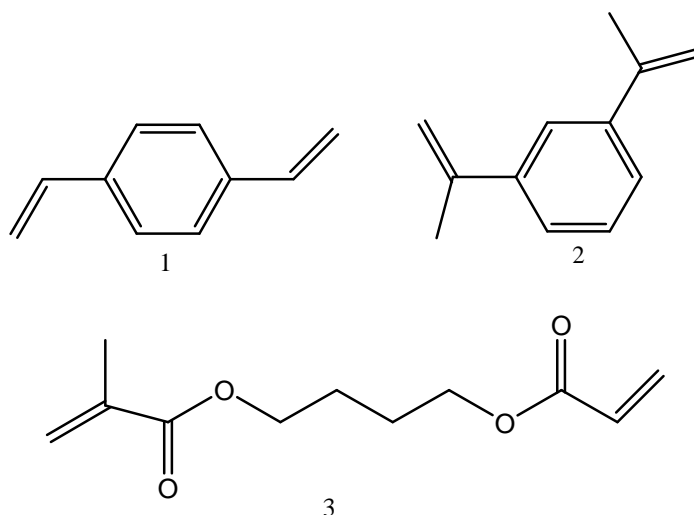


Figura 1 - Exemplos de reagentes de ligação cruzada utilizados na síntese do MIP. 1) *p*-divinilbenzeno (DVB), 2) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP), 3) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA).

Fonte: do autor.

Em uma reação de polimerização, o iniciador radicalar deve ser adicionado ao meio reacional porque ele sofre quebra em sua estrutura (clivagem homolítica), por radiação UV ou aquecimento, gerando os radicais responsáveis pelo início da reação (CORMACK; ELORZA, 2004). A FIG. 2 traz a estrutura dos iniciadores mais utilizados.

A síntese do MIP pode ser feita de quatro maneiras diferentes. Contudo, convencionalmente ela é realizada pelo método conhecido como polimerização em “bulk”, que ocorre num sistema homogêneo. O monômero funcional, o analito (molécula modelo), o solvente, o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar são adicionados a uma ampola de síntese. Em seguida, o oxigênio presente no sistema deve ser retirado borbulhando-se argônio ou nitrogênio ou mesmo empregando ultrassom. A ampola é lacrada e submetida a aquecimento ou radiação UV para iniciar o processo. Para o melhor rendimento na produção do MIP, a seleção dos reagentes bem como suas concentrações e volumes devem ser selecionados de forma criteriosa. Ao final da síntese uma massa rígida é formada, sendo em seguida triturada, tamisada e lavada com solvente para a retirada da molécula modelo e de outros reagentes remanescentes da síntese (CORMACK; ELORZA, 2004).

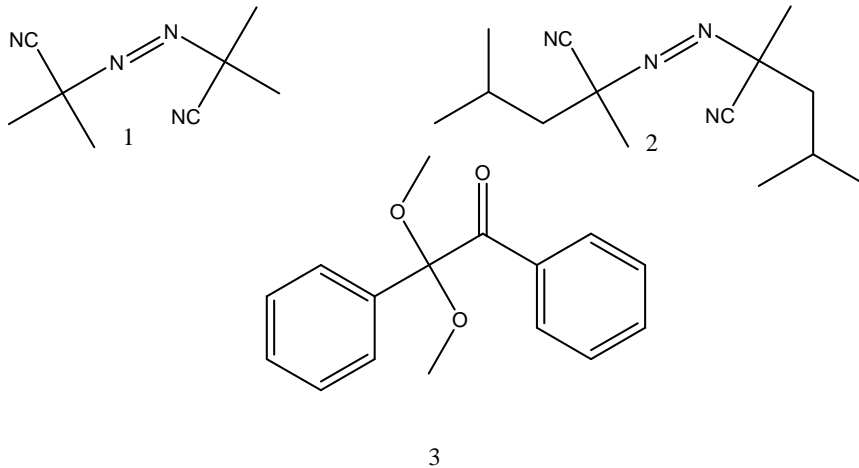


Figura 2 - Exemplos de iniciadores radiculares empregados na impressão molecular: 1) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); 2) azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV); 3) dimetilacetal de benzíla.
Fonte: do autor.

A síntese pelo método de precipitação ocorre de forma semelhante à síntese em bulk, a não ser pelo aumento considerável no volume de solvente. Emprega-se também um recipiente dotado de sistema de alívio de pressão, evitando assim possíveis explosões. Outra característica desse processo é a agitação constante, que, aliada ao grande volume de solvente, resulta na formação de minúsculas partículas de polímero que vão aumentando de tamanho com o decorrer da síntese. Ao final do processo, obtém-se partículas esféricas e com uma maior regularidade de tamanho (CHEN; XU; LI, 2011).

A síntese por emulsão ocorre em pequenas gotículas de solvente orgânico apolar dispersas em um meio aquoso na presença de um surfactante. Os reagentes são dissolvidos no solvente orgânico sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, esse solvente é colocado em contato com água sob agitação e uma emulsão é formada e estabilizada por um surfactante. Finalmente a temperatura do sistema é elevada para que ocorra o processo de polimerização, gerando um material uniforme e esférico, que será tamisado de acordo com a finalidade de uso, e lavado (ORTELLI et al. 2002).

Na FIG. 3 podemos observar o esquema genérico da síntese do MIP.

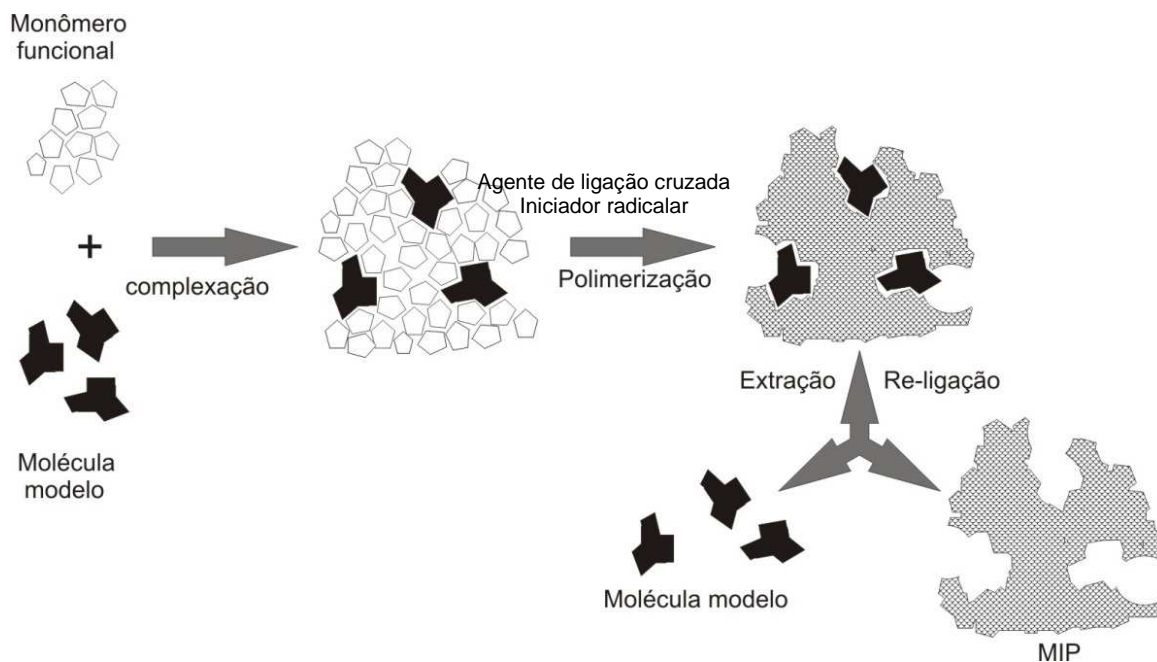


Figura 3 - Esquema genérico da síntese de MIP
Fonte: do autor

Três abordagens diferentes para a preparação dos MIP são relatadas, em termos da natureza das interações entre a molécula modelo e os monômeros funcionais: i) covalentes, ii) não-covalente e iii) semi-covalente. A primeira abordagem envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre a molécula modelo e o monômero funcional. Após a polimerização, a molécula modelo é retirada do polímero por quebra das ligações correspondentes. A principal vantagem é a forte ligação entre a molécula modelo e o monômero funcional, garantindo assim uma maior seletividade do polímero impregnado. Em contrapartida, essa forte ligação dificulta o processo de eluição, sendo necessário, em muitos casos, até procedimentos drásticos de hidrólise (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2010).

A síntese não covalente se baseia na formação de interações relativamente fracas (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, etc.) entre a molécula modelo e monômeros selecionados antes da polimerização. Esta abordagem é a mais usada para a preparação de MIP, devido à possibilidade de se ligar analitos da mesma classe, ao polímero impregnado, além da facilidade de retirada da molécula modelo do polímero durante o processo de eluição (HU; CHOU, 2009). Contudo, esses polímeros são menos seletivos porque as interações entre MM e MF são mais fracas em comparação com as interações decorrentes da síntese covalente (HU; CHOU, 2009).

Finalmente uma opção intermediária é denominada de síntese semi-covalente, na qual se tem que o processo de polimerização mediado por ligações covalentes,

garantindo assim a maior seletividade do MIP; enquanto que as demais interações durante a utilização do material ocorrem por ligações não-covalentes, facilitando assim o processo de eluição (NAVARROA et al. 2011).

Os MIP têm como principal característica sua alta seletividade a uma molécula ou classe de moléculas, sendo amplamente empregados na extração de diferentes analitos nas mais variadas amostras. Cronologicamente, tem havido um aumento no número de trabalhos sobre MIP como pode ser visto na Figura 4, o que comprova a potencialidade desses materiais bem como suas vantagens em relação a outros adsorventes (DUAN et al. 2011).

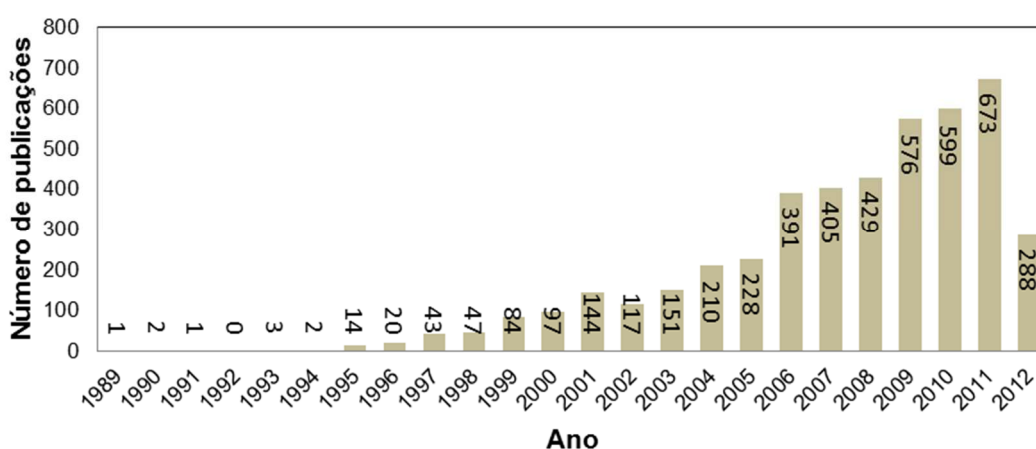


Figura 4 - Número de publicações sobre MIP desde de 1989. Pesquisa realizada na Web of Sciences no dia 19-06-2012 com as palavras chave molecular* imprint* polymer*.

Fonte: do autor

2.2 Materiais de Acesso Restrito

Materiais de acesso restrito (RAM) foram desenvolvidos nas últimas duas décadas, sendo usados principalmente para a extração de substâncias com baixa massa molecular em matrizes complexas contendo macromoléculas (mais frequentemente proteínas) (SADÍLEK; SATÍNSKÝ; SOLICH, 2007). O emprego desses adsorventes em sistemas *on-line* tem permitido a injeção direta de amostras biológicas (sem tratamento prévio) no sistema cromatográfico, tendo como principal mecanismo a exclusão de macromoléculas por meios físicos ou químicos (RIEUX ET AL. 2007). Esta injeção ocorre frequentemente por meio de um sistema bidimensional que utiliza válvulas de seis vias no acoplamento das colunas RAM juntamente com os demais componentes do sistema cromatográfico (coluna analítica, injetor, detector, etc.). Inicialmente a amostra injetada passa pela coluna RAM que retém analitos de baixo peso molecular e descarta as macromoléculas (KILLGORE; VILLASEÑOR, 1996). Depois, o posicionamento da válvula é trocado e a fase móvel elui o analito da

coluna RAM, direcionando-os para a coluna analítica e conseqüentemente para o detector.

O mecanismo de eliminação de macromoléculas se deve à presença de poros dotados de grupos hidrofóbicos (no interior do RAM) capazes de capturar moléculas de baixo peso molecular (barreira física) (MACHTEJEVAS et al. 2006). Por outro lado, a superfície externa dos RAM pode ser revestida com grupos hidrofílicos (barreira química), evitando assim a adsorção da matriz protéica. Desse modo, no momento da extração, os analitos de interesse (de baixo peso molecular) penetram nos poros e são retidos pelos grupos ligantes, enquanto que as macromoléculas são percoladas para o descarte sem que haja retenção das mesmas na coluna RAM (WANG et al. 2011). Um bom exemplo é o RAM revestido com albumina de soro bovino (RAM-BSA), onde a BSA é imobilizada sobre um suporte por meio de reações de entrecruzamento. Isso impede o acesso das macromoléculas hidrofílicas com o suporte. A sílica octadecil, conhecida como C18, é muito utilizada como suporte, apresentando resultados significativos com relação a eliminação de macromoléculas (CASSIANO et al.2006).

A FIG. 5 mostra um RAM (com exclusão por barreira física) denominado de suporte de alquil diol sílica - ADS (A) e um RAM (com exclusão por barreira química) denominado de superfície coberta por proteína - PCS (B).

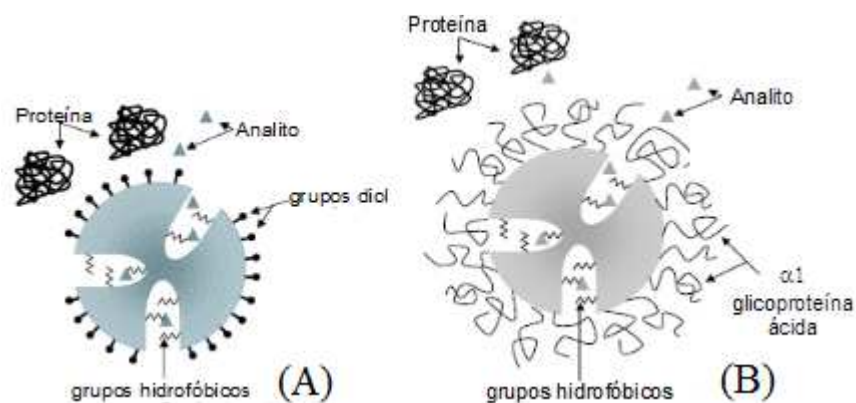


Figura 5 - Esquema de um RAM com mecanismo de exclusão por barreiras físicas (A) e químicas (B).

Fonte: SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, P. 144, 2004 (tradução da legenda).

Diferentemente do MIP, o RAM ainda não apresenta uma expressiva utilização em preparo de amostras, em comparação aos MIP, como pode ser visto na Figura 6. Contudo, é nítido que há uma tendência de crescimento em número de trabalhos publicados, o que denota o aspecto promissor dessa tecnologia.

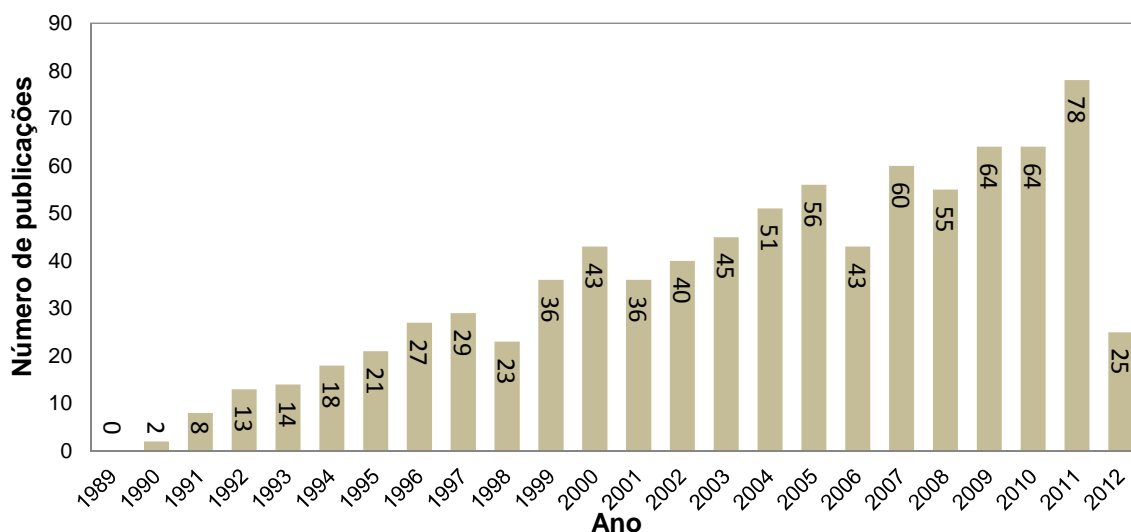


Figura 6 - Número de publicações sobre RAM desde de 1989. Pesquisa realizada na web of Sciences no dia 19-06-2012 com as palavras chave restric* access material*.

Fonte: do autor

2.3 Polímeros de impressão molecular restritos à ligação com macromoléculas

Como vimos anteriormente o MIP é um material seletivo à molécula modelo, porém, ele apresenta uma capacidade muito grande de reter macromoléculas, inviabilizando a injeção direta de fluídos biológicos. Já o RAM não retém as macromoléculas, porém é pobre em seletividade adsorvendo basicamente qualquer molécula de baixo peso molecular. Com intuito de aliar as características vantajosas de ambos os materiais, alguns trabalhos têm investigado a possibilidade de um sistema sequencial empregando RAM e MIP. Nessa abordagem, os dois materiais ficam separados, cada um em uma coluna, e duas etapas de pré-tratamento são feitas antes que os analitos atinjam a coluna analítica de separação (MULLETT et al. 2004). Na FIG. 7 pode-se observar o sistema proposto com as duas colunas de pré-tratamento RAM e MIP.

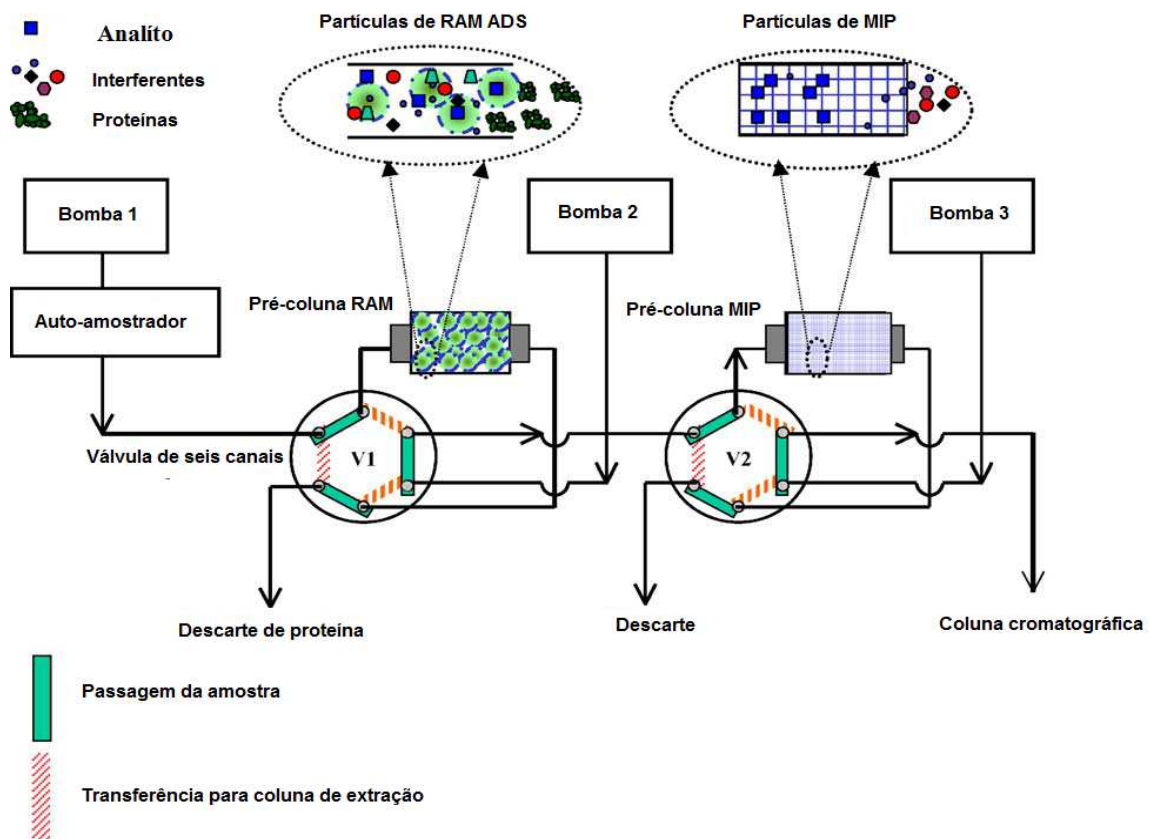


Figura 7 - Sistema bidimensional com dois pré-tratamentos RAM e MIP.
 Fonte: MULLETT, p. 268, 2007(tradução da legenda).

A amostra injetada passa inicialmente por uma coluna RAM, onde as macromoléculas são excluídas e os analitos de baixo peso molecular são retidos. Em seguida, os analitos retidos no RAM são eluídos e percolados sequencialmente no MIP, havendo então a adsorção seletiva. Finalmente, os analitos são eluídos da coluna MIP e separados/analísados na coluna analítica/detector (KOEBER et al. 2001).

Contudo, esse sistema sequencial, empregando duas colunas (RAM e MIP) mostra-se complexo devido à utilização de várias bombas e válvulas, o que dificulta a otimização do processo de análise. Dessa forma, uma elegante alternativa é empregar um único material que agregue as características vantajosas dos RAM e dos MIP, obtendo-se um polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromolécula (RAM-MIP). Com esse único polímero é possível reter seletivamente o analito e eliminar quantitativamente as macromoléculas, minimizando procedimentos morosos de preparo de amostra (HAGINAKA et al. 1999).

O RAM-MIP apresenta sítios específicos de reconhecimento molecular, bem como grupos hidrofílicos externos que bloqueiam a ligação com proteínas. Outro ponto

positivo deste material é que a camada hidrofílica proporciona um aumento do reconhecimento molecular na utilização de água tanto como, como também fase móvel para injeção de fluídos protéicos, que acabam precipitando se houver presença de solvente na mesma (ANTONIO; ILHA; SUARE-ILHA, 2004). Embora sejam evidentes as vantagens dos RAM-MIP no preparo de amostras, esta tecnologia ainda é pouco empregada. Os materiais encontrados podem ser divididos dois tipos: aqueles que utilizam monômeros hidrofílicos e aqueles os que utilizam monômeros que após um tratamento se tornam hidrofílicos amostra (HAGINAKA et al. 1999; HAGINAKA; SAMBE, 2000; SAMBE; HAGINAKA, 2003; SAMBE et al. 2007; SAMBE; HOSHINA; HAGINAKA, 2007; HOSHINA et al. 2009; HOSHINA et al. 2011).

Na metodologia que utiliza monômeros hidrofílicos, o RAM-MIP é utilizado como coluna de HPLC em sistema bidimensional. A síntese do material acontece pelo método de emulsão e é composta de cinco etapas, sendo que as três primeiras etapas se resumem na inserção dos reagentes necessários em tempo suficiente para que ocorra a migração para dentro da fase apolar da emulsão. Devido ao aumento da gotícula da emulsão essas três etapas são chamadas de inchaço *multi-step*. No primeiro inchaço, partículas de poliestireno de tamanho padronizado, são dispersas em uma micro emulsão composta de surfactante e água. O sistema é mantido a temperatura ambiente sob agitação por 15 horas. Em seguida, para o segundo inchaço, é acrescentado o iniciador radicalar, o solvente, um estabilizador de dispersão e água. O sistema é novamente mantido por mais 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. No terceiro inchaço são adicionados o monômero funcional, a molécula modelo, o agente de ligação cruzada, o estabilizador e a água; e novamente a mistura é mantida por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Concluídas as etapas de inchaço, dá-se início à primeira polimerização sob atmosfera isenta de oxigênio, com temperatura de 50°C por 24 horas e sob forte agitação. Em seguida o material obtido passa por uma segunda polimerização onde são acrescentados um monômero funcional e um agente de ligação cruzada, ambos com característica hidrofílica. A mistura é mantida sob forte agitação por 20 h a 70°C. O resultado final são polímeros esféricos bem definidos e que apresentam seletividade, potencial pré-concentrador e capacidade de excluir macromoléculas devido ao revestimento hidrofílico (HAGINAKA et al. 1999; HAGINAKA; SAMBE, 2000; SAMBE; HAGINAKA, 2003; SAMBE et al. 2007; SAMBE; HOSHINA; HAGINAKA, 2007; HOSHINA et al.

2009; HOSHINA et al. 2011). Na FIG. 8 observa-se o esquema de síntese do primeiro RAM-MIP (HAGINAKA et al. 1999).

Os RAM-MIP obtidos por essa técnica têm sido empregados em análises de amostras de água de rio para controle de herbicidas e de descarte de fármacos e na análise por injeção direta de plasma (HAGINAKA et al. 1999; HAGINAKA; SAMBE, 2000; SAMBE; HAGINAKA, 2003; SAMBE et al. 2007; SAMBE; HOSHINA; HAGINAKA, 2007; HOSHINA et al. 2009; HOSHINA et al. 2011).

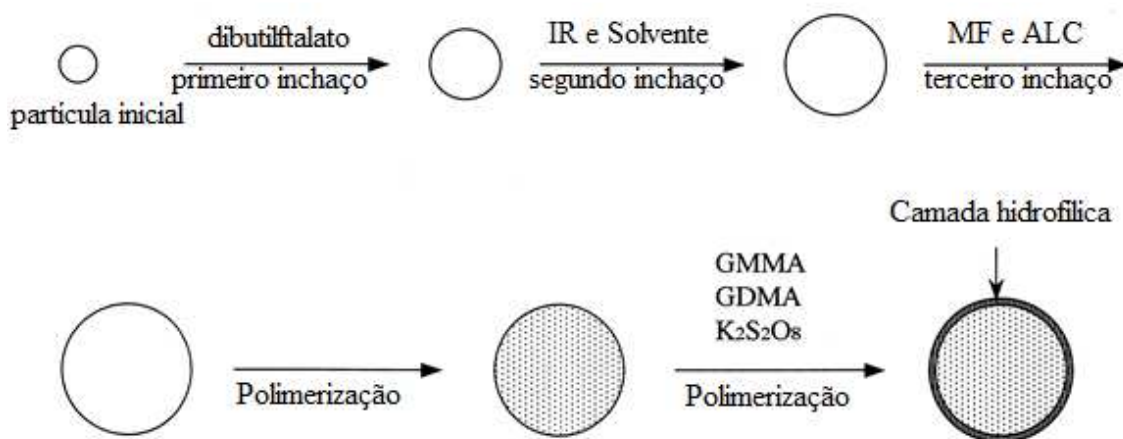


Figura 8 - Sistema de síntese de RAM-MIP da maioria dos artigos da literatura.
Fonte: HAGINAKA ET AL. 1999 (tradução da legenda).

Outra forma de se obter a camada hidrofílica externa no MIP é a utilização de monômeros que se tornam hidrofílicos após um tratamento, como, por exemplo, monômeros com anel epóxi tais como o glicidil metacrilato (PARISI et al. 2009; PARISI et al. 2009; XU et al. 2010) (FIG. 9).

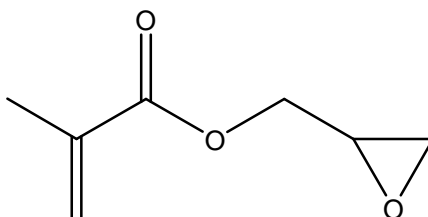


Figura 9 - Estrutura química do glicidil metacrilato
Fonte: do autor.

Em dois trabalhos que abordam essa metodologia, a proposta foi a de utilização dos RAM-MIP como material de liberação controlada de fármacos, por isso a necessidade de uma camada hidrofílica que primeiramente excluiria as macromoléculas evitando a obstrução das cavidades, além de aumentar o reconhecimento molecular devido ao afastamento do meio aquoso das cavidades favorecendo a ligação da molécula modelo (ANTONIO; ILHA; SUARE-ILHA, 2004;

PARISI et al. 2009; PARISI et al. 2009; XU et al. 2010). No primeiro trabalho foram avaliados três parâmetros fundamentais para que um material seja usado com esta finalidade: retenção do fármaco, absorção de água e não aderência de macromoléculas. A síntese do RAM-MIP (FIG. 10) foi realizada pelo método *in bulk* empregando-se molécula modelo, o iniciador radicalar, o agente de ligação cruzada, o monômero funcional, solvente e um co-monômero. A polimerização ocorreu por 24 horas a 60°C numa ampola lacrada e isenta de oxigênio. O monólito formado foi triturado e peneirado obtendo-se assim um material de tamanho <63 nm. Este foi então lavado para retirada da molécula modelo e finalmente tratado com uma solução de ácido perclórico 10%(v/v) para a abertura do anel epóxi do co-monômero, formando assim a camada hidrofílica (PARISI et al. 2009). No segundo trabalho, os autores avaliaram a retenção do fármaco, a absorção de água, a não aderência de macromoléculas além de realizarem testes de liberação *in vitro*. O diferencial da síntese foi que ela aconteceu pelo método de precipitação. O volume de solvente foi aumentado e a polimerização foi processada com agitação constante, gerando um material mais uniforme e esférico.

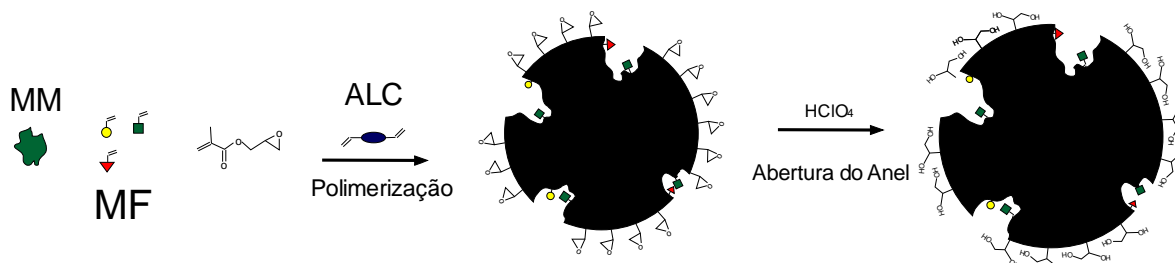


Figura 10: Sistema de síntese de RAM-MIP utilizado para liberação controlada de fármacos. Fonte: PARISI ET AL., p. 360, 2010 (tradução da legenda).

Outro RAM-MIP que também utiliza monômeros que se tornam hidrofílicos após um tratamento é utilizado para determinação de sulfonamida em leite com injeção direta, através de HPLC com sistema bidimensional. A síntese do polímero começa com a preparação da sílica (três estágios) que será utilizada como base para o material. Inicialmente, a sílica hidroxilada reage por 15 horas com um agente de acoplamento funcional dotado de uma amina primária que amplia a capacidade de ligação do material (XU et al. 2010). Na segunda etapa, o material seco, é suspenso em dimetil formamida (DMF) e reage com um copolímero de fragmentação reversível a 25°C por 18 horas. Na terceira etapa, o material, em meio etanólico, reage com um ligante a 50°C por 8 horas, formando o que o autor chama de

iniferter-sílica. Na FIG. 11 é apresentada a síntese da iniferter sílica que servirá como base do RAM-MIP.

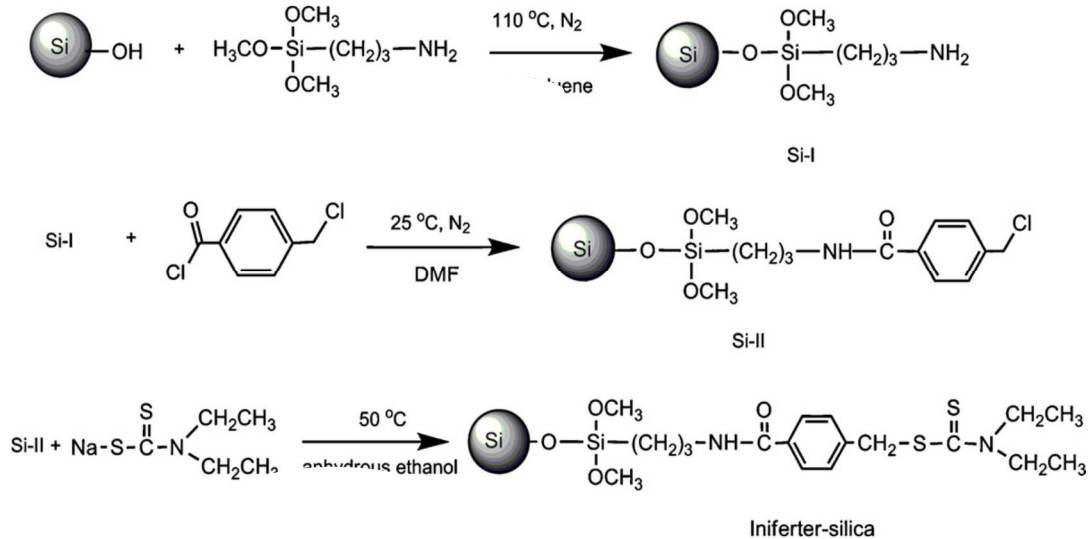


Figura 11 - Primeira etapa da síntese de RAM-MIP para análise em leite. Síntese da “iniferter-sílica”.
Fonte: XU et al., p. 7200, 2010.

A síntese do MIP então acontece através de precipitação, onde a iniferter-sílica é colocada num frasco junto com solvente, molécula modelo, agente de ligação cruzada e monômero funcional numa atmosfera isenta de oxigênio, sob agitação, através de irradiação de luz UV por 4 horas (FIG. 12). O material passa por mais uma fase de polimerização para a adição do monômero com característica hidrofílica por 8 horas, sob agitação num ambiente isento de oxigênio.

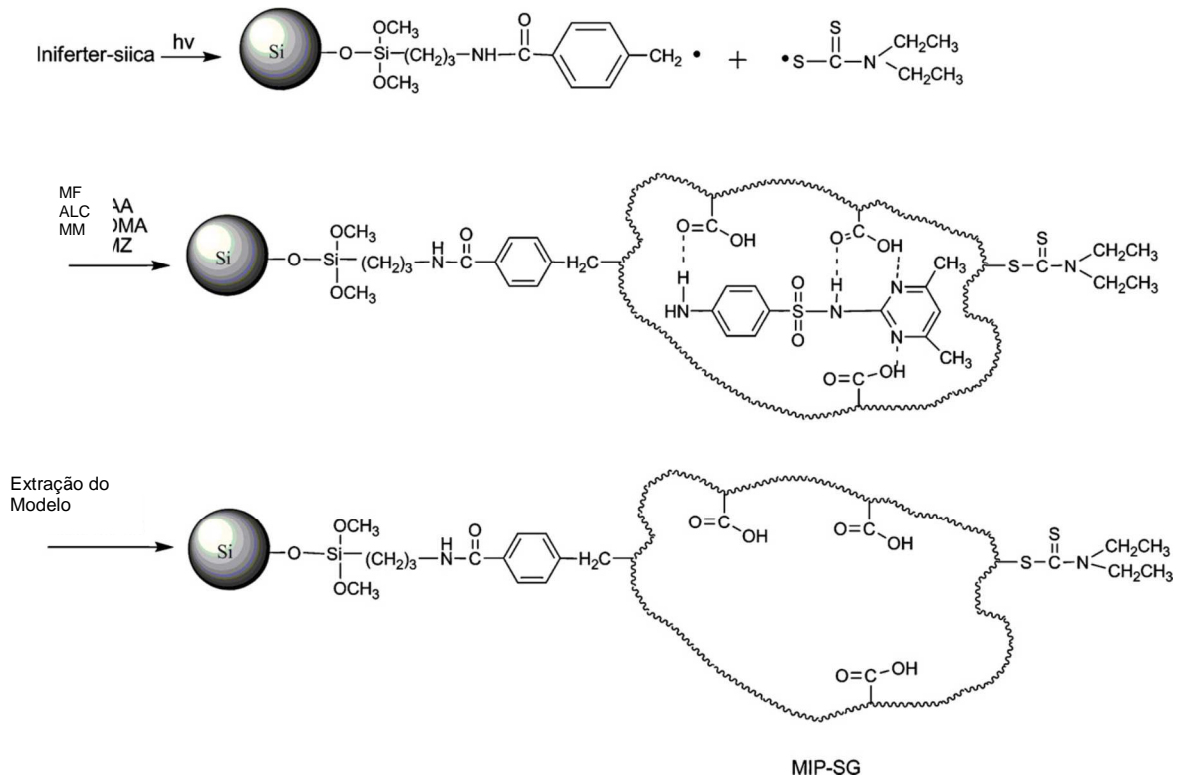


Figura 12 - Segunda etapa da síntese de RAM-MIP para análise em leite. Síntese do MIP.
Fonte: XU et al., p. 7201, 2010.

Finalmente, o material passa pela última polimerização onde é acrescentado o monômero que, após tratamento com ácido sulfúrico, passa a ter caráter hidrofílico. Na Figura 13 pode-se observar a polimerização final do RAM-MIP.

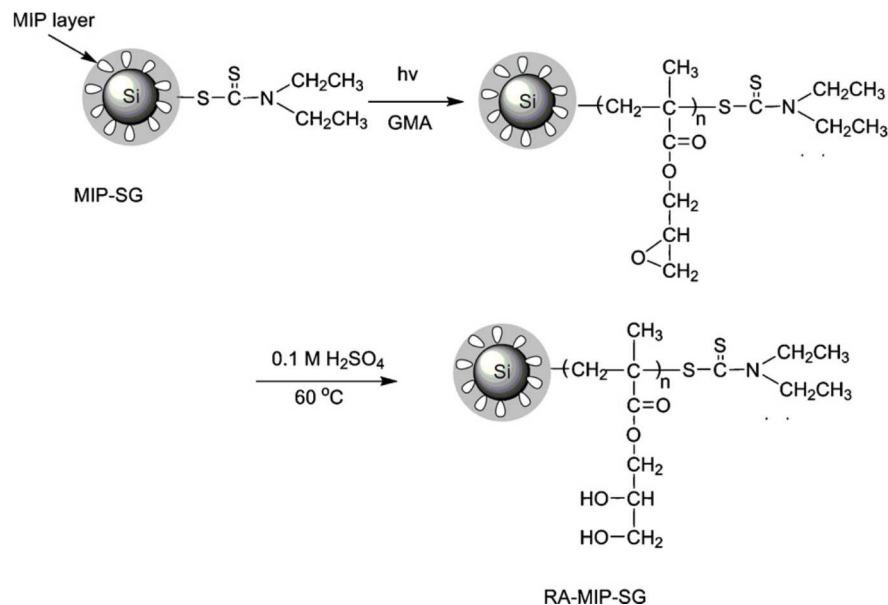


Figura 13 – Síntese final do RAM-MIP. Adição do revestimento hidrofílico.
Fonte: XU et al., p. 7202, 2010.

Seguindo esta mesma linha, um material utilizando um glico-monômero para dar caráter hidrofílico ao polímero foi utilizado (HUA et al. 2011). O primeiro passo é a

síntese do glico-monômero empregando-se octa-acetato de lactose, um monômero funcional com caráter hidrofílico o hidróxi metilmetacrilato (HEMA), solvente e trifluoreto de boro. Essa síntese acontece a 0°C, formando o flicomonômero apresentado na FIG. 14.

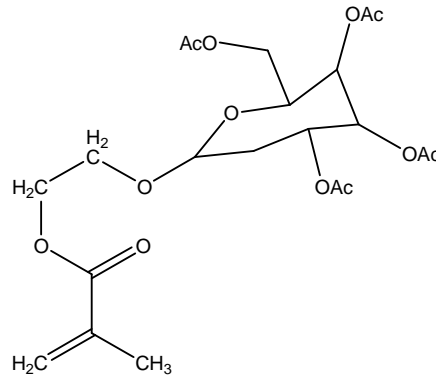


Figura 14 - Estrutura química do glico-monômero octa-acetato de lactose (MAEL).
Fonte: do auto.

O decorrer da síntese segue o modelo do trabalho descrito anteriormente (ver FIG. 15). Ao final, o material passa por um processo de alcoólise, quando o metóxido de sódio reage com o MAEL retirando os grupos acetila (Ac) e deixando OH livre no polímero, dando característica hidrofílica ao polímero formado.

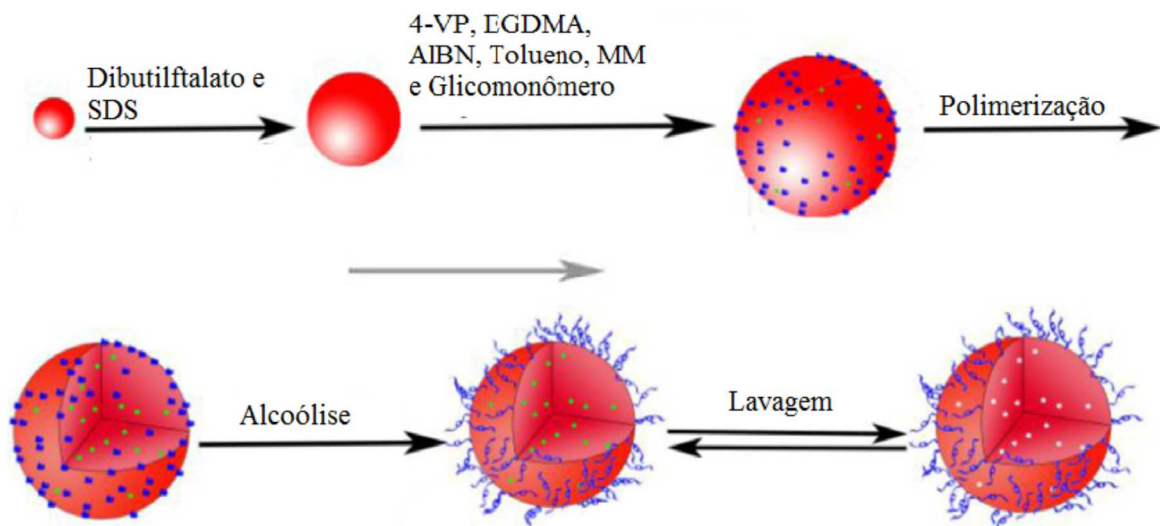


Figura 15 - Síntese do glyco-MIP.
Fonte: HUA et al. p. 3089, 2011 (tradução da legenda).

Todos os trabalhos apresentam resultados satisfatórios com relação à eliminação de macromoléculas e seletividade à molécula modelo para o qual foram sintetizados.

Finalmente, o pequeno número de trabalhos na literatura sobre RAM-MIP denota o vasto campo de estudo inerente a metodologias de síntese e aplicação desses materiais.

2.4 Fenotiazínicos

A esquizofrenia é uma doença do sistema nervoso central (SNC) que atinge de 1-2% da população mundial, representando ainda um grande desafio aos neurocientistas (MENEGATTI et al. 2004). Seu tratamento tem sido feito com base em fármacos fenotiazínicos, minimizando a necessidade de internação em hospitais de doentes mentais, bem como diminuindo os tratamentos de choque. Esses fármacos têm seu efeito influenciado pela estrutura do respectivo composto fenotiazínico, sendo os mesmos classificados como fármacos de baixa (clorpromazina, tioridazina, mesoridizina), média (perfenazina) e alta potência (flufenazina, trifluofenazina) (LOVE; SMITH; SIMMONS, 2006).

O principal representante desta classe de substâncias é a clorpromazina, fármaco pioneiro no tratamento efetivo dos sintomas positivos da esquizofrenia, sendo ainda capaz de reduzir o tempo médio de hospitalização de pacientes esquizofrênicos e as recidivas de internações.

Devido à importância terapêutica, bem como pelo aspecto toxicológico próprio das fenotiazinas, diversos trabalhos têm sido propostos para a monitorização terapêutica, visando aumentar a eficácia terapêutica e minimizar os possíveis efeitos adversos. Na quantificação desses fármacos em amostras biológicas, o preparo da amostra é a etapa mais demorada do processo analítico, sendo esta ainda mais complexa quando uma técnica cromatográfica é envolvida (TANAKA et al. 2007). A FIG. 16 mostra a estrutura da clorpromazina que apresenta faixa terapêutica entre 50 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$.

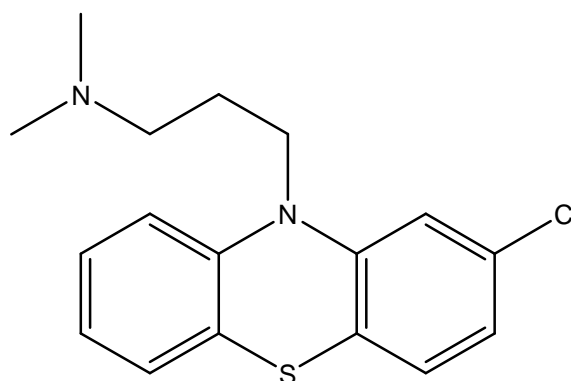


Figura 16 - Estrutura química da clorpromazina.
Fonte: do autor

2.5 Cromatografia Líquida Bidimensional

A demanda por análises cada vez mais rápidas tem impulsionado o desenvolvimento de técnicas onde as etapas de preparo de amostra e separação analítica são integradas. Dentre as estratégias empregadas, a utilização de cromatografia líquida bidimensional no modo denominado *column switching* permite a injeção direta de matrizes complexas no sistema analítico (KILLGORE; VILLASEÑOR, 1996).

Nesse sistema geralmente utilizam-se válvulas de seis vias na montagem de pré-colunas e colunas analíticas. Inicialmente a amostra é inserida na coluna extratora para a retenção do analito de interesse, excluindo os demais concomitantes. A válvula é acionada e a fase móvel elui o analito da pré-coluna e o envia para a coluna analítica para separação (KILLGORE; VILLASEÑOR, 1996).

As vantagens sobre a cromatografia tradicional é o menor consumo de solventes e de amostra, alta frequência analítica, pré-concentração em linha com o sistema cromatográfico e boa resolução cromatográfica. Na FIG 17 pode-se observar um sistema genérico bidimensional.

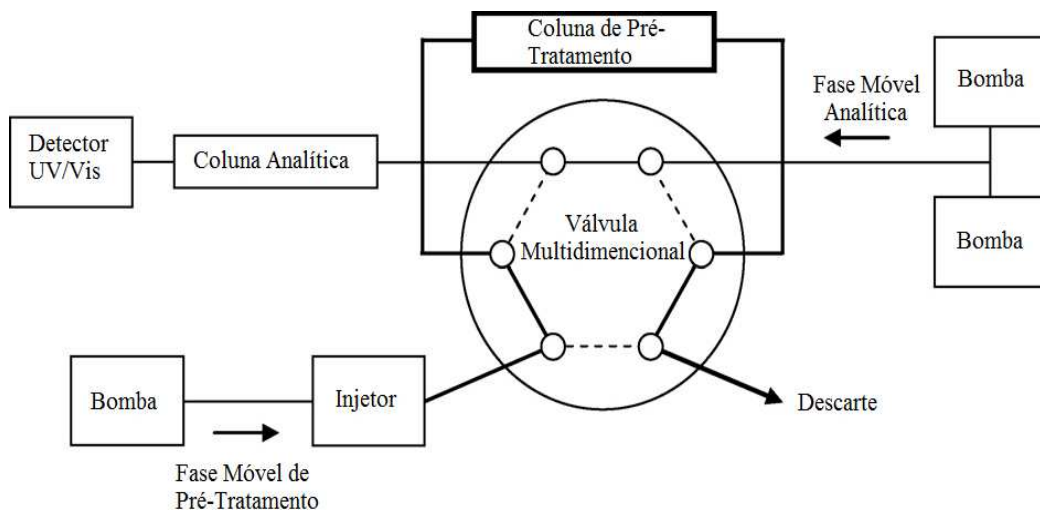


Figura 17 - Esquema genérico de um sistema bidimensional
Fonte: do autor.

3. OBJETIVOS

Sintetizar e avaliar o desempenho de um polímero de impressão molecular restrito á ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina ((do inglês *“restrict access molecular imprinted polymer”* – RAM-MIP-BSA) para pré-concentração de clorpromazina em amostra de plasma humano para análise em sistema HPLC-bidimensional (do inglês *“High Performance/Pressure Liquide Chromatography”*).

3.1. Específicos

- Sintetizar RAM-MIP-BSA para clorpromazina;
- Avaliar o material obtido em termos de seletividade e capacidade de eliminação de macromoléculas;
- Caracterizar os materiais por microscopia eletrônica de varredura e construir as isotermas de adsorção de clorpromazina no RAM-MIP-BSA e no RAM-NIP-BSA (polímero não impresso);
- Otimizar as condições experimentais para a extração de clorpromazina em amostra de plasma humano por cromatografia líquida(bidimensional.
- Avaliar o potencial pré-concentrador do RAM-MIP-BSA para a melhoria da sensibilidade em análises por cromatografia líquida bidimensional.
- Validar a metodologia de acordo com as recomendações do FDA (Method Validation of U.S Food and Drug Administration).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e equipamentos

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu Prominence, Japão) com detector do tipo DAD-UV/Vis (SPD-20A) e coluna analítica Phenomenex modelo Gemini 250x4,60mm e C18 de 5 μ m. O sistema bidimensional utilizado é formado por duas bombas (Shimadzu 20AD, Japão) e uma Válvula de 6 canais VICI-cheminert 11R-0016H (Valco, Houston, TX, EUA). Para as sínteses dos polímeros empregou-se um phmetro (Quimis Q400A, Brasil), balança analítica (Shimadzu, Japão), sistema de vácuo tipo Manifold, chapa aquecedora com sistema de agitação (Quimis Q313I, Brasil). Para construção das isotermas foi utilizado banho termostaticado com agitação (Quimis Q303SR, Brasil) e agitador vórtex (Fanem 251, Brasil). A morfologia de todos os polímeros foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 15kV. As colunas RAM-MIP foram preparadas empregando-se uma pré-coluna (1 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno) desprovida de adsorvente e preenchida com o referido material.

4.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas empregando-se água ultra-pura, proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Millipore[®], Bedford, MA, USA), resistividade de 18,2 M Ω cm. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e da marca Sigma-Aldrich.

O MIP foi sintetizado a partir de cloridrato de clorpromazina 98%, ácido metacrílico (MAA) 99%, etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) 98%, clorofórmio, hidróxi etil metacrilato (HEMA) 97%, glicidil dimetacrilato – mistura de isômeros (GDMA), azoisobutironitrila (AIBN). Para retirada da molécula modelo utilizou-se uma solução de metanol:ácido acético 80:20 v/v. Para a cobertura do RAM empregou-se albumina de soro bovina (BSA), glutaraldeído 25% e borohidreto de sódio 98%.

As soluções padrão de clorpromazina e BSA foram preparadas diariamente em tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 7,0.

A primeira fase móvel utilizada foi composta de metanol grau HPLC, acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 4,1 80:20(v/v). Após otimização final do sistema a fase móvel foi acetonitrila grau HPLC, acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 4,1 45:55(v/v).

Catecol 98%, dopamina 98,5% e flufenazina 98% foram empregadas nos testes de seletividade.

As amostras de plasma utilizadas para validação do método foram fornecidas por voluntários saudáveis que relataram a não utilização de medicamentos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição e todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, depois de devidamente informados sobre os procedimentos e objetivos da pesquisa. Todas as amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacutainer® heparinizados (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA).

Uma solução estoque de clorpromazina preparada em metanol na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi empregada para o preparo das amostras de plasma enriquecidas com o analito nas concentrações de 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ que contemplam a faixa terapêutica de 50 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ segundo a FDA. As referidas soluções foram preparadas pipetando-se alíquotas adequadas da solução estoque ou de uma solução intermediária em um béquer de fundo afunilado. Essas alíquotas foram secas sob fluxo de nitrogênio e ressuspensas em 1 mL de amostra de plasma humano.

4.3 Sínteses do RAM-MIP-BSA

A síntese foi feita pelo método de precipitação, dentro de um balão de fundo redondo com três bocas sobre um banho de óleo a 60°C . Nos demais orifícios, acoplou-se um condensador de bolas para evitar perda de solvente e um septo por onde foi feita a purga com nitrogênio ou argônio bem como a adição de reagentes durante a síntese. Na extremidade superior do condensador acoplou-se um balão para evitar a entrada de oxigênio bem como para evitar o aumento exagerado da pressão interna do sistema. A FIG. 18 mostra o esquema montado para a síntese.

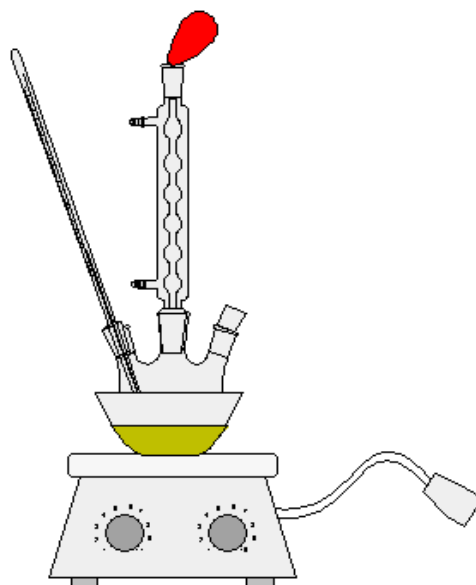


Figura 18 - Montagem utilizada para realização de síntese pelo método de precipitação.
Fonte: do autor.

Após a síntese, o material foi lavado para retirada da molécula modelo bem como de reagentes remanescentes da reação. A lavagem foi executada percolando-se pelo sequencialmente pelo polímero as seguintes soluções: i) 60 mL metanol:ácido acético 4:1- v/v; ii) 30 mL metanol e iii) 60 mL metanol:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 (8:2-v/v). A eficiência da lavagem foi comprovada quando a solução oriunda da última percolação não apresentou sinal algum de clorpromazina na análise em HPLC com coluna analítica Phenomenex modelo Gemini 250x4,60mm e C18 de 5µm e fase móvel composta de metanol grau HPLC:acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 4,1 80:20(v/v).

O próximo passo deste estudo foi direcionado ao revestimento do polímero de forma que o mesmo seja capaz de eliminar macromoléculas. Nesse sentido, com base nos trabalhos da literatura, optou-se por investigar o efeito da adição de GDMA e/ou HEMA como possíveis monômeros capazes de conferir caráter hidrofílico ao polímero. A FIG. 19 apresenta as estruturas químicas do GDMA e/ou HEMA e, como pode ser visto, ambos os reagentes são dotados de grupamento vinil capaz de se integrar à rede polimérica, bem como de terminações hidrofílicas representadas pelos grupamentos hidroxila do GDMA e do HEMA, respectivamente.

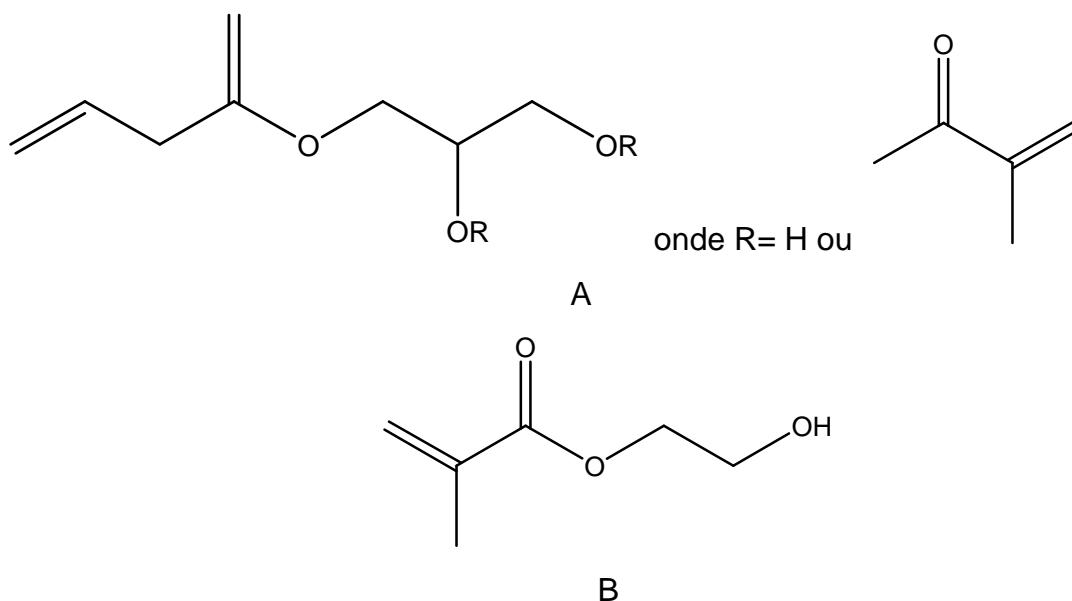


Figura 19 - Estrutura química GDMA mistura de isômeros (A) e HEMA(B)
Fonte: do autor.

Para a cobertura com BSA foram adicionados 300 mg de RAM-MIP em um cartucho vazio de SPE e acoplado ao Manifold. A reação ocorreu percolando-se inicialmente 20 mL de uma solução BSA 1% (m/v) preparada em tampão fosfato $0,05\text{mol L}^{-1}$ com pH 6,0. Em seguida, percolou-se 5 mL de glutaraldeído 25% (v/v) e o cartucho foi deixado em repouso por 5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, 10 mL de borohidreto de sódio 1% (m/v) foram passados pelo cartucho. O polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por superfície recoberta com proteína (RAM-MIP-BSA) foi então lavado com água em abundância para a retirada de resíduos da síntese. Um RAM-NIP-BSA também foi sintetizado da mesma forma, a não ser pela ausência da molécula modelo.

4.4 Caracterização

Para caracterização foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para as análises de MEV as amostras foram recobertas com 10 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise.

Também foi feito um estudo de adsorção do material, que é o processo onde um componente presente numa solução adere à superfície de um sólido. A intensidade do efeito de adsorção depende da temperatura, natureza, concentração do adsorvente e adsorvato, pH do meio, solubilidade do soluto, tempo de contato, agitação entre outros (DABROWSKI, 2001).

Os fenômenos de adsorção podem ser classificados em adsorção física ou química. Na adsorção física, também chamada de fisissorção, ocorre um processo reversível e rápido onde o adsorvato se liga à superfície do adsorvente. Já a adsorção química ou quimissorção é específica envolvendo interação entre o adsorvente e adsorvato com energia quase tão alta quanto à formação de ligações químicas. A quimissorção ocorre apenas com a formação de monocamadas e é irreversível (DABROWSKI, 2001).

A uma temperatura constante, a quantidade adsorvida aumenta com a concentração do adsorvato, e a relação entre a quantidade adsorvida e a concentração é denominada como *isoterma de adsorção* (KLUG et al. 1998).

Inicialmente foi feito um estudo cinético visando encontrar o tempo necessário para que a interação clorpromazina/RAM-MIP-BSA atingisse o equilíbrio. Para isso, oito tubos contendo 10 mg de RAM-MIP-BSA com 2 mL de uma solução tamponada (tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 7,0) de clorpromazina a 300 mg L⁻¹ em foram agitados à temperatura ambiente. Alíquotas do sobrenadante de cada tubo foram coletadas respectivamente nos tempos de 5, 10, 20, 25, 30, 40, 45 e 60 min, e a clorpromazina foi quantificada utilizando HPLC com coluna analítica Phenomenex modelo Gemini 250x4,60mm e C18 de 5µm e fase móvel composta de metanol grau HPLC:acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 4,1 80:20(v/v).

As isotermas de adsorção foram obtidas a partir do método de batelada, onde a uma série de tubos de ensaio contendo uma quantidade de 10 mg de RAM-MIP-BSA foi adicionado 1,0 mL de soluções de clorpromazina de concentrações de 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mg L⁻¹. O pH 7.0 foi mantido constante em tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹). As suspensões foram agitadas por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as suspensões foram separadas por centrifugação a 1560g por 10 min. A clorpromazina presente no sobrenadante após a agitação foi quantificada utilizando-se HPLC com coluna analítica Phenomenex modelo Gemini 250x4,60mm e C18 de 5µm e fase móvel composta de metanol grau HPLC, acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 4,1 80:20(v/v). A quantidade de clorpromazina adsorvida no RAM-MIP-BSA foi determinada por meio da diferença entre a concentração inicial e a concentração encontrada no sobrenadante.

4.5. Empacotamento das colunas

As colunas utilizadas durante as análises foram empacotadas com os polímeros pelo método *slurry* (TOTH; LASZLO; HORVAI, 2005). Inicialmente o material foi suspenso em solvente, e percolado através da coluna em sistema pressurizado, até o completo preenchimento. Para isso empregou-se uma suspensão com 100 mg de RAM-MIP-BSA em 5 mL de água. A FIG. 20 apresenta o esquema do empacotamento e a FIG. 21 apresenta a pré-coluna recheada.

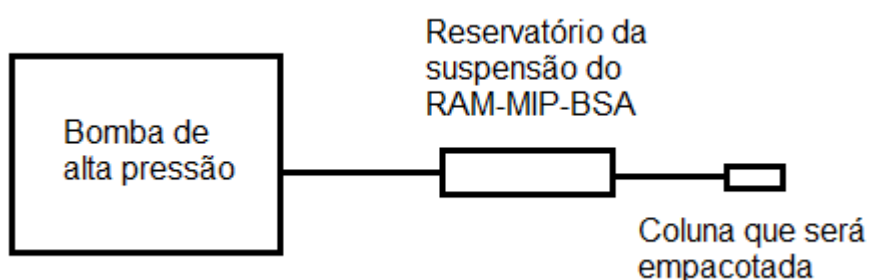


Figura 20 - Esquema de empacotamento pelo método slurry.
Fonte: do autor.



Figura 21 - Pré-coluna recheada com RAM-MIP-BSA
Fonte: do autor.

4.6 Montagem e otimização do sistema bidimensional

O sistema de cromatografia líquida bidimensional foi montado empregando-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo Prominence com detector UV/Vis, uma bomba de alta pressão e uma válvula seletora de 6 canais. O sistema foi controlado pelo software LCsolution do HPLC.

O arranjo do sistema foi feito em *backflush* (para diminuição do alargamento do pico), onde a bomba do sistema tradicional do HPLC impulsiona água através do amostrador e da coluna contendo o RAM-MIP-BSA quando a válvula é mantida na posição A (FIG. 22), ao mesmo tempo em que a fase móvel de eluição/separação é impulsionada pela bomba B condicionando a coluna analítica e o detector. Enquanto a válvula se mantém na posição A, a amostra é injetada, os analitos são retidos e as macromoléculas são excluídas da coluna RAM-MIP-BSA. Após um tempo adequado,

a válvula passa para a posição B (FIG. 22), onde a fase móvel de eluição e separação é impulsionada pela bomba B através da coluna RAM-MIP-BSA na direção inversa. A mesma é responsável por eluir os analitos retidos na coluna e levá-los para a coluna analítica onde serão separados e analisados no detector UV/Vis.

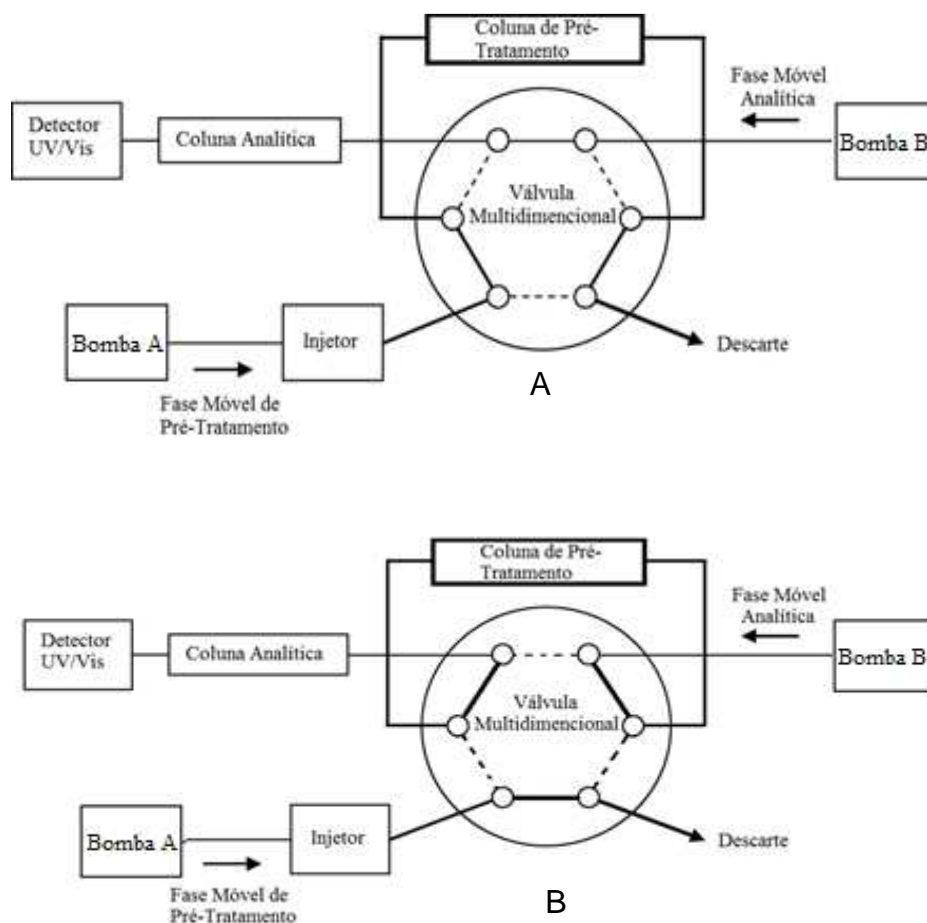


Figura 22 - Sistema bidimensional que será utilizado durante as análises nas posições A e B.
Fonte: do autor

4.7. Validação do método

O método foi validado de acordo com normas da FDA (US FDA 2001) para linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação. Uma curva analítica construída em amostra de plasma humano foi feita em quintuplicata, utilizando as concentrações de 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 $\mu\text{g L}^{-1}$. A curva foi traçada com a razão de área do pico do analito versus sua concentração. A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação (r) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

O limite de quantificação foi a menor concentração quantificada com precisão e exatidão.

A precisão e exatidão intra-ensaio foram avaliada nas concentrações 30, 200 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=5 por concentração) analisadas no mesmo dia. A precisão e exatidão inter-ensaio foi realizada com as mesmas concentrações anteriores em 3 dias consecutivos(n=5 por concentração). Esses resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) e erro relativo (E), para presisão e exatidão, respectivamente.

A avaliação da recuperação absoluta foi feita analisando-se padrões de 30, 200 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de plasma humano pelo sistema bidimensional. As áreas obtidas foram comparadas com as áreas de padrões aquosos nas mesmas concentrações analisados no sistema HPLC tradicional (sem coluna RAM-MIP-BSA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo das diferentes metodologias de síntese de RAM-MIP-BSA

Para a obtenção do RAM-MIP foram feitas sínteses de MIP para clorpromazina acrescentando monômero funcional com caráter hidrofílico. A TAB. 2 apresenta as metodologia e os reagentes utilizados em 3 diferentes sínteses que se diferenciaram, basicamente pela proporção e natureza dos reagentes empregados. Após as sínteses, os polímeros foram estudados quanto às suas capacidades de eliminar macromoléculas. Esse estudo foi conduzido injetando-se inicialmente 25 μL de um padrão aquoso de BSA de 44 mg mL^{-1} (mesma concentração de albumina encontrada no plasma humano) em um cromatógrafo sem a presença de nenhuma coluna, e operando com detector UV a 313 nm e com água deionizada como fase móvel (FIG. 23A). O pico obtido corresponde a 100% de BSA, ou seja, toda BSA injetada foi direcionada ao detector. Em seguida, a coluna RAM-MIP foi colocada no percurso analítico (FIG. 23B) e 25 μL do mesmo padrão aquoso de BSA de 44 mg mL^{-1} foram injetados. A BSA fluiu através do RAM-MIP e o pico obtido foi empregado para se avaliar o percentual de BSA eluído do RAM-MIP por meio de comparação com o pico correspondente a 100% de eluição (FIG. 23A).

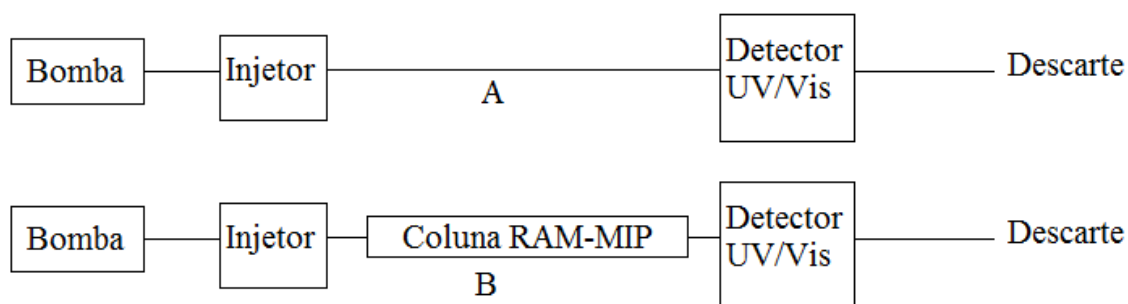


Figura 23 - Esquema utilizado para teste de eliminação de BSA nos polímeros sintetizados. O detector foi ajustado para 313 nm.

Fonte: do autor.

Os resultados de capacidade de eliminação de BSA são apresentados na TAB. 2, e como pode ser visto, a utilização de quantidades crescentes de HEMA adicionados no início da síntese (TAB. 2) não resultou em polímeros eficientemente capazes de eliminar macromoléculas. Isso pode ser constatado pelas baixas taxas de eliminação de BSA, da ordem de 15%, comprovando assim que esses polímeros adsorveram cerca de 85% da BSA injetada na coluna. Esta constatação pode ser justificada pelo fato de que o HEMA esteja sendo consumido rapidamente durante o início da polimerização. Isso faz com que os grupamentos hidrofílicos estejam

incrustados na rede polimérica, não havendo, dessa maneira, uma efetiva quantidade desses grupamentos recobrimo o polímero externamente.

Tabela 2 - Diferentes metodologias de síntese do RAM-MIP em termos de proporção de reagentes e eliminação de BSA(n=3) com adição de reagentes com caráter hidrofílico no início.

Síntese	Reagentes empregados	Metodologia	Eliminação BSA %
1	1 mmol de MM (clorpromazina), 4 mmol de MF (MAA), 25 mg de IR (AIBN), 10 mmol de ALC (EGDMA), 2 mmol de HEMA e 24 mL de clorofórmio.	Adicionar todos os reagentes em única etapa e promover a síntese por 24 h a 60°C	13±0,2
2	1 mmol de MM (clorpromazina), 4 mmol de MF (MAA), 25 mg de IR (AIBN), 8 mmol de ALC (EGDMA), 4 mmol de HEMA e 24 mL de clorofórmio.	Adicionar todos os reagentes em única etapa e promover a síntese por 24 h a 60°C	14±0,2
3	1 mmol de MM (clorpromazina), 3 mmol de MF (MAA), 25 mg de IR (AIBN), 4 mmol de ALC (EGDMA), 9 mmol de HEMA e 24 mL de clorofórmio.	Adicionar todos os reagentes em única etapa e promover a síntese por 24 h a 60°C	14±0,2

No sentido de aumentar a quantidade de hidroxilas terminais na superfície externa do polímero, outras 3 sínteses forma conduzidas sendo que a principal mudança foi a adição do HEMA e do GDMA em diferentes tempos após o início da reação de polimerização, como demonstrado na TAB. 3. O objetivo foi adicionar os monômeros hidrofílicos depois que grande parte da polimerização houvesse sido processada. Assim, esses monômeros hidrofílicos não causariam interferência na formação dos sítios seletivos, além de promoverem a formação de uma camada protetora externa incapaz de se ligar a macromoléculas. Os resultados permitiram concluir que a melhor capacidade de eliminação de macromoléculas foi da ordem de 85%, resultado esse obtido quando o HEMA e o GDMA foram adicionados após 60 e 90 min do início da polimerização.

Apesar de ter havido progresso na busca por RAM-MIP ideal, ainda pôde-se constatar que houve uma considerável retenção de BSA, da ordem de 15 %, para os polímeros 2 e 3 da TAB. 3. Vale ressaltar que esses percentuais ainda são altos e inviabilizam a utilização desses polímeros para análise direta de fármacos em fluidos biológicos, uma vez que esse excesso de proteínas pode causar problemas no sistema cromatográfico. Dessa forma, baseado no conceito de RAM recoberto por

proteínas (RAM-BSA) (CASSIANO ET AL.2006), nossos esforços foram direcionados à realização de uma reação de recobertura do RAM-MIP com proteína, de forma a melhorar sua performance de eliminação de macromoléculas. O RAM-MIP a ser recoberto foi aquele obtido pela síntese 2 da TAB. 3, e a reação de recobertura foi feita com BSA (CASSIANO ET AL.2006).

Tabela 3 - Diferentes metodologias de síntese do RAM-MIP em termos de proporção de reagentes e eliminação de BSA (n=3) com adição de reagentes com caráter hidrofílico após início da polimerização.

Síntese	Reagentes empregados	Metodologia	Eliminação BSA %
1	1 mmol de MM (clorpromazina), 3 mmol de MF (MAA), 25 mg de IR (AIBN), 5 mmol de ALC (EGDMA); 7,5 mmol HEMA, 0,5 mmol de GDMA e 48 mL de clorofórmio.	Adicionar MM, MF, ALC, IR e 24 mL de clorofórmio e promover a síntese por 45 min a 60°C. Depois adicionar HEMA, GDMA e mais 24 mL de clorofórmio e promover a síntese por 24 h a 60°C.	16±0,2
2	1 mmol de MM (clorpromazina), 3 mmol de MF (MAA), 25 mg de IR (AIBN), 7 mmol de ALC (EGDMA), 7,5 mmol HEMA, 0,5 mmol de GDMA e 48 mL de clorofórmio.	Adicionar MM, MF, ALC, IR e 24 mL de clorofórmio e promover a síntese por 60 min a 60°C. Depois adicionar HEMA, GDMA e mais 24 mL de clorofórmio e promover a síntese por 24 h a 60°C.	84±0,5
3	1 mmol de MM (clorpromazina), 3 mmol de MF (MAA), 25 mg de IR (AIBN), 7 mmol de ALC (EGDMA), 7,5 mmol HEMA, 0,5 mmol de GDMA e 48 mL de clorofórmio.	Adicionar MM, MF, ALC, IR e 24 mL de clorofórmio e promover a síntese por 90 min a 60°C. Depois adicionar HEMA, GDMA e mais 24 mL de clorofórmio e promover a síntese por 24 h a 60°C.	84±0,2

O RAM-MIP-BSA e o RAM-NIP-BSA foram acondicionados em colunas pelo método *slurry* (TOTH; LASZLO; HORVAI, 2005), (utilizando água como solvente) e então avaliados quanto à capacidade de retenção de macromoléculas. A FIG. 24 apresenta os cromatogramas obtidos para a injeção do padrão de BSA em um sistema sem coluna e no sistema com as colunas RAM-MIP-BSA ou RAM-NIP-BSA. Como pode ser visto, a eliminação de proteínas foi de 99,7 e 99,3% para o RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA, respectivamente. Esses valores são ideais e condicionam esses materiais para a serem utilizados na extração direta de fármacos em fluidos biológicos.

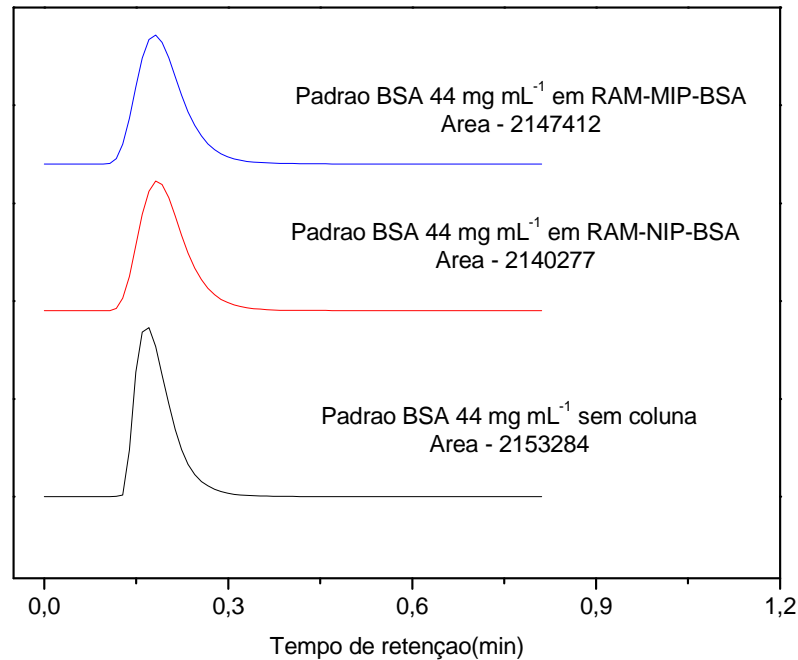


Figura 24 - Cromatogramas com respectivas áreas obtidas para padrão de BSA 44 mg mL⁻¹ em sistema sem coluna, com coluna RAM-NIP-BSA e com coluna RAM-MIP-BSA.

Fonte: do autor.

O tempo de vida útil da coluna RAM-MIP-BSA foi investigado injetando-se sequencialmente um padrão de clorpromazina de 200µg L⁻¹ preparado em solução de BSA 44 mg mL⁻¹. A FIG. 25 mostra as respectivas áreas obtidas para a injeção sequencial do padrão por 90 vezes. Como pode ser visto, não houve uma variação significativa e o desvio padrão relativo obtido, considerando todas as injeções, foi menor que 6,0 %. Além disso, vale destacar que, durante as injeções sequenciais, não houve variação importante na pressão interna do sistema (< 150 Kgf).

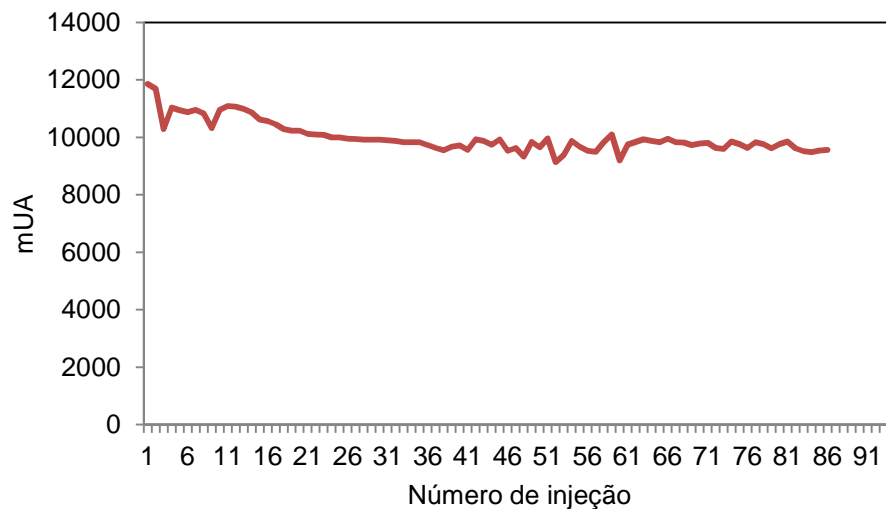


Figura 25 - Gráfico correspondente as várias injeções de clorpromazina 200µg L⁻¹ em solução com BSA 44 mg mL⁻¹.

Fonte: do autor.

A seletividade do RAM-MIP-BSA foi investigada empregando-se uma solução mista contendo clorpromazina $200 \mu\text{g L}^{-1}$, flufenazina $200 \mu\text{g L}^{-1}$, catecol $200 \mu\text{g L}^{-1}$ e dopamina $200 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada em meio aquoso contendo BSA 44 mg mL^{-1} . As estruturas químicas da flufenazina, catecol e dopamina são apresentadas na FIG. 26, e como pode ser visto, há uma grande similaridade entre a flufenazina e a clorpromazina (FIG. 16), o que dá indícios de que o RAM-MIP-BSA pode extrair também flufenazina. Já o catecol e a dopamina têm estruturas químicas diferentes e por isso teoricamente não haverá interação seletiva entre essas moléculas e o RAM-MIP-BSA.

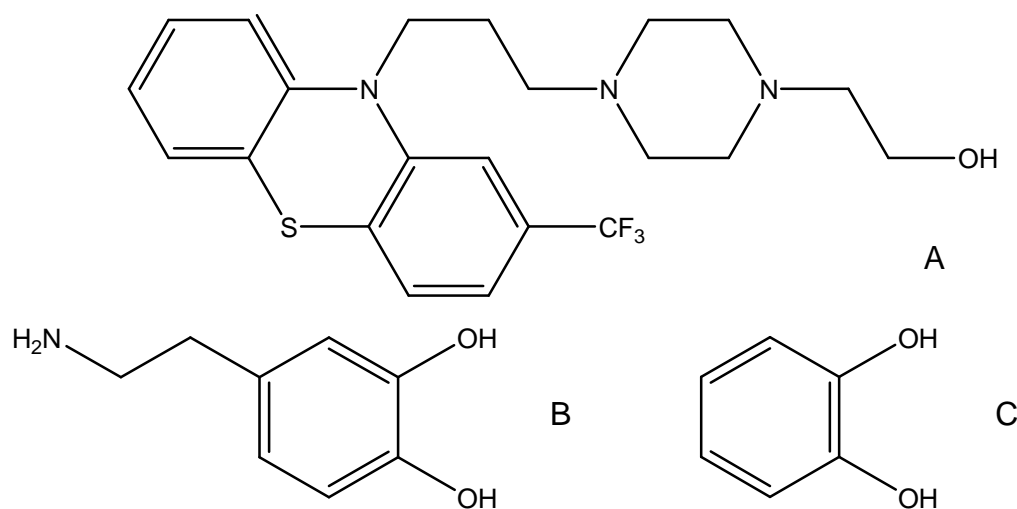


Figura 26: Estrutura química da flufenazina (A), dopamina (B) e catecol (C).
Fonte: do autor.

O experimento foi conduzido empregando-se 300 mg de material acondicionados em um cartucho vazio de SPE, que foi acoplado em um Manifold e utilizado de acordo com o seguinte procedimento:

- condicionamento com 3 mL acetonitrila + 3 mL H₂O;
- Adição de 1 mL da solução padrão de clorpromazina $200 \mu\text{g L}^{-1}$, flufenazina $200 \mu\text{g L}^{-1}$, catecol $200 \mu\text{g L}^{-1}$ e dopamina $200 \mu\text{g L}^{-1}$ preparadas em meio aquoso contendo BSA 44 mg mL^{-1} ;
- Lavagem com 2 mL H₂O;
- Eluição com 1 mL de fase móvel (metanol:tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4,1, na proporção de 80:20-%-v/v).

O eluato foi então coletado e injetado em HPLC com coluna analítica Phenomenex modelo Gemini 250x4,60mm e C18 de $5\mu\text{m}$, detector UV/Vis a 313 nm e empregando e fase móvel metanol:tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4,1, na

proporção de 80:20-v/v. As áreas obtidas com os eluatos são apresentadas na Tabela 4. Como pode ser visto, somente os picos da clorpromazina e da flufenazina foram detectados, comprovando a seletividade do MIP para a classe de fenotiazínicos. Ademais, um padrão de clorpromazina $200 \mu\text{g L}^{-1}$, flufenazina $200 \mu\text{g L}^{-1}$, catecol $200 \mu\text{g L}^{-1}$ e dopamina $200 \mu\text{g L}^{-1}$ preparado em meio aquoso foi também injetado no HPLC, nas mesmas condições anteriormente descritas, porém sem ser submetido a extração com RAM-MIP-BSA e as áreas de cada pico são também apresentadas na Tabela 4. Com esse resultado foi possível verificar as boas recuperações da extração de clorpromazina e flufenazina, como também descrito na TAB. 4.

Tabela 4 - Resultados obtidos nos testes de seletividade utilizando clorpromazina, flufenazina, dopamina e catecol

Analito	Área do padrão	Área do eluato	Recuperação
Clorpromazina	26753	23230	88%
Flufenazina	31179	27017	87%
Dopamina	32189	ND*	-
Catecol	33256	ND*	-

*Não detectado.

5.2. Caracterização do RAM-MIP-BSA

O RAM-MIP-BSA foi caracterizado através de Microscopia eletrônica de varredura e através do estudo de adsorção.

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas FIG. 27 e 28 são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) do MIP e RAM-MIP-BSA nos aumentos de 25.00Kx. Ao observá-las podemos concluir que a recobertura com BSA gera um aumento de tamanho no polímero. Já na FIG. 29 podemos observar a porosidade, característica essa de grande importância em processos de adsorção facilitando a transferência de massa. Outro ponto que deve ser destacado é o formato arredondado e homogêneo das partículas.

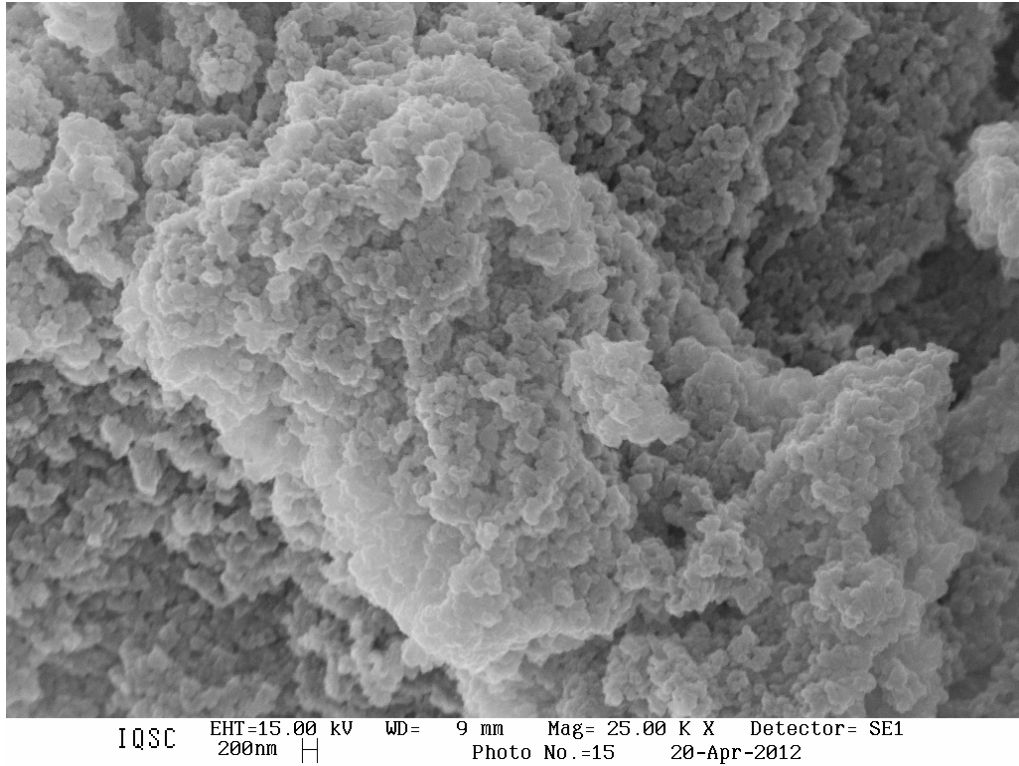


Figura 27 - Micrografia do RAM-MIP 25.00Kx, com tamanho estimado da partícula de 66 nm.
Fonte: do autor.

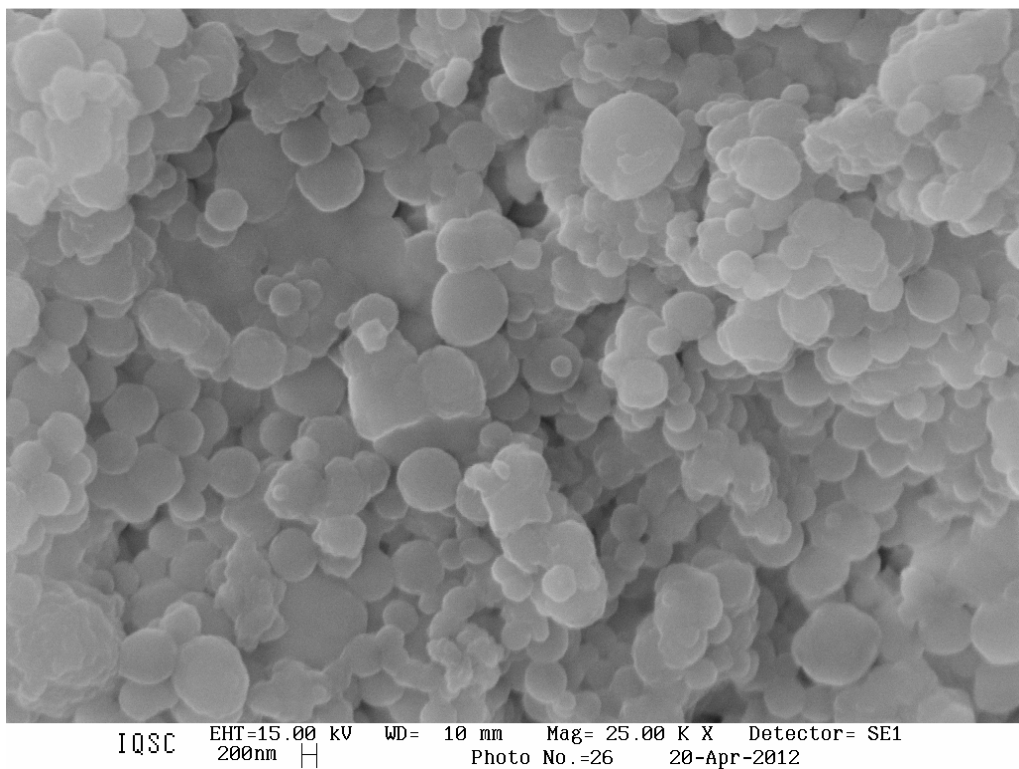


Figura 28 - Micrografia do RAM-MIP-BSA 25.00Kx, com tamanho estimado de partícula de 333 nm.
Fonte: do autor.

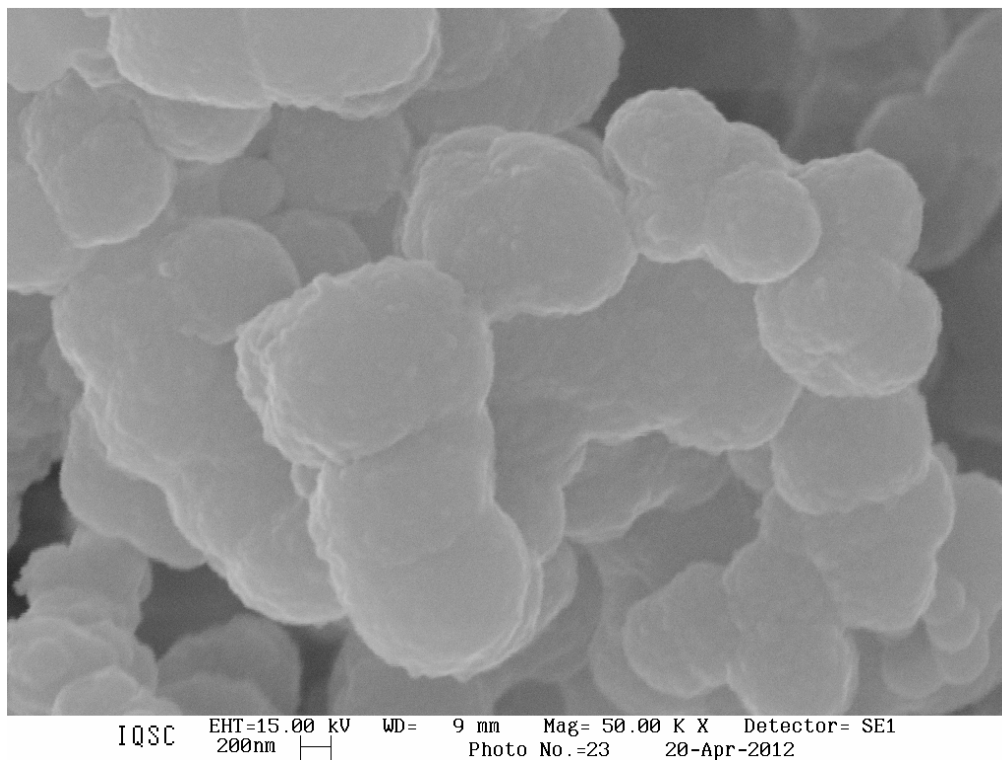


Figura 29 - Micrografia do RAM-MIP-BSA 50.00Kx, com tamanho estimado de partícula de 333 nm. Fonte: do autor.

5.2.2. Estudos de adsorção

Inicialmente dois importantes parâmetros foram levados em consideração: o pH de adsorção e o tempo de agitação. O pH 7,4 foi usado devido a testes já descritos na literatura para MIP de clorpromazina (FIGUEIREDO; ARRUDA, 2010). Com relação ao tempo, pode-se verificar, pela FIG. 30, que a partir de 45 minutos o equilíbrio entre as frações foi estabelecido. Assim sendo, o tempo de 60 minutos foi adotado como ideal.

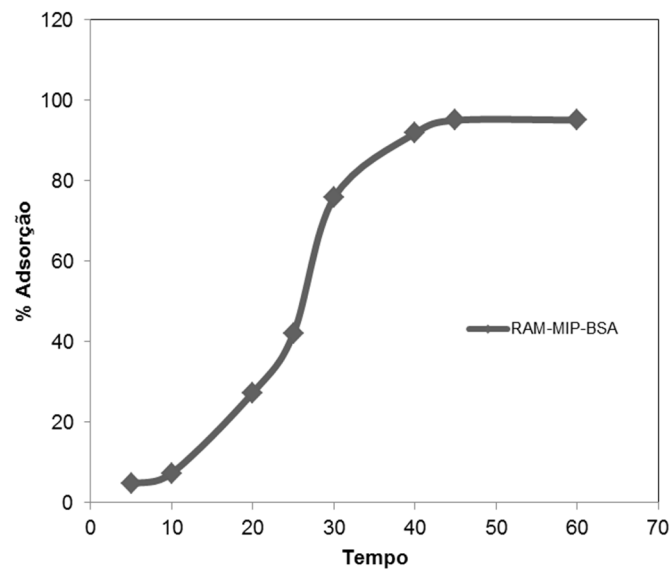


Figura 30 - Influência do tempo na adsorção de clorpromazina no RAM-MIP-BSA (n=3).
Fonte: do autor.

Na FIG. 31, é apresentado o perfil de adsorção da clorpromazina pelo RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA à medida que a concentração de clorpromazina foi aumentada.

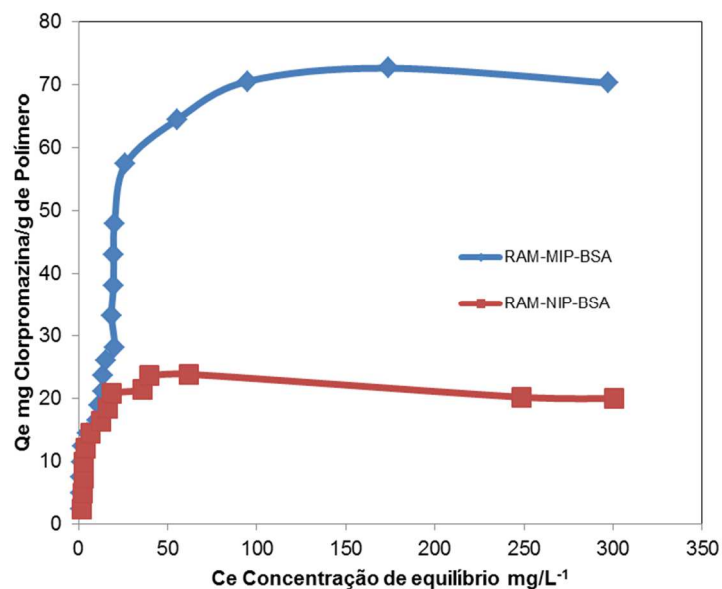


Figura 31 - Isoterma de adsorção da clorpromazina no RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA (n=3).
Fonte: do autor.

A capacidade máxima de adsorção foi determinada pelo emprego da forma linearizada de Freundlich e de Langmuir.

A linearização de Freundlich é dada por: $\log(Q_e)$ e $\log(C_e)$, onde $Q_e = K_F \cdot C_e^{1/n}$ e K_F é a constante de Freundlich, C_e é a concentração de equilíbrio (mg L^{-1}) de

clorpromazina. Os dados experimentais aplicados à isoterma de Freundlich são apresentados na FIG. 32.

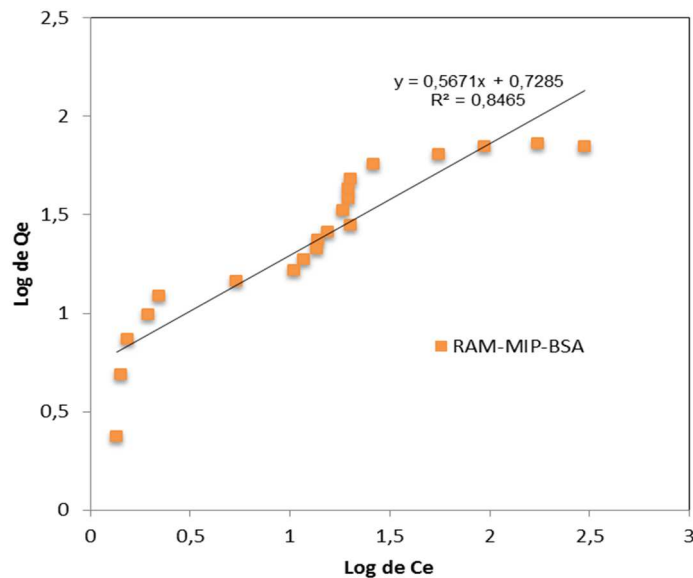


Figura 32 - Isoterma linearizada de Freundlich para adsorção de clorpromazina no RAM-MIP-BSA (n=3).

Fonte: do autor.

O modelo de Freundlich considera uma adsorção não ideal em superfícies heterogêneas, bem como a possibilidade de uma adsorção em multicamada. A equação de Freundlich sugere que a energia de adsorção decresce logarithmicamente, à medida que a superfície vai se tornando coberta pelo analito (ANTONIO; ILHA; SUARE-ILHA, 2004; AROGUZ, 2006; HASANY; SEED; AHMED, 2001).

A linearização de Langmuir é dada por: $C_e/Q_e = C_e/M + 1/(KM)$, onde Q_e é a quantidade adsorvida de clorpromazina (mg g^{-1}), C_e é a concentração de equilíbrio (mg L^{-1}) de clorpromazina e M e K são, respectivamente, a capacidade máxima de adsorção de clorpromazina e a constante de adsorção. Este modelo foi originalmente desenvolvido para representar a adsorção química sobre os sítios ativos presentes na superfície do adsorvente. De acordo com esse modelo, os sítios de adsorção possuem a mesma energia independente da superfície coberta, ou seja, são energeticamente homogêneos. A adsorção máxima ocorre quando a superfície de adsorção é coberta com uma monocamada de adsorbato (ANTONIO; ILHA; SUARE-ILHA, 2004; AROGUZ, 2006; HASANY; SEED; AHMED, 2001). A FIG. 33 apresenta a linearização da isoterma de Langmuir para o RAM-MIP-BSA.

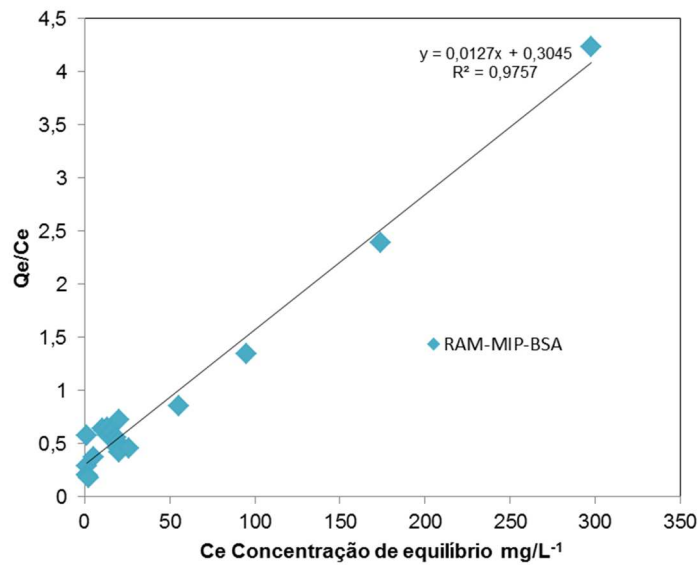


Figura 33 - Isoterma linearizada de Langmuir para a adsorção de clorpromazina no RAM-MIP-BSA (n=3)
Fonte: do autor.

Observando as FIG. 32 e 33, vemos que os dados se ajustam melhor ao modelo de Langmuir ($r^2=0,9757$). Dessa forma a capacidade máxima adsortiva do RAM-MIP-BSA frente á clorpromazina, calculada como o inverso do coeficiente angular da isoterma de Langmuir, foi de 75 mg g^{-1} . Vale ainda destacar a grande diferença entre as capacidades máximas adsortivas do RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA, 75 e 20 mg g^{-1} respectivamente, calculados com base nas FIG. 33 e 34. Essa diferença pode explicar a existência de sítios seletivos de reconhecimento no material molecularmente impresso.

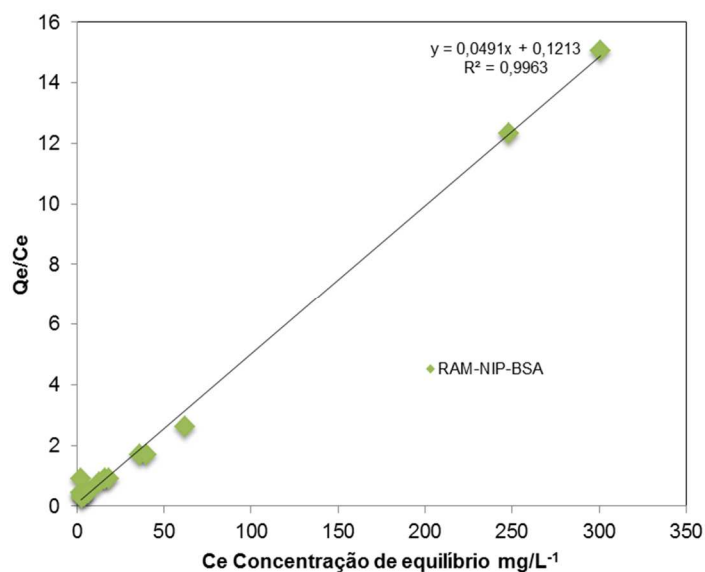


Figura 34 - Isoterma linearizada de Langmuir na adsorção de clorpromazina no RAM-NIP-BSA (n=3).
Fonte: do autor.

5.3. Otimização do sistema bidimensional

Após os testes de caracterização, o RAM-MIP-BSA foi empacotado em pré-coluna de HPLC de 1 cm e empregado em um sistema bidimensional (como descrito na seção 4.7) para a análise direta de clorpromazina em injeção direta de amostra de plasma humano. O estudo foi conduzido empregando-se um padrão de clorpromazina de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ preparado em uma solução aquosa de albumina 44 mg mL^{-1} (mesma concentração de albumina encontrada em plasma humano).

Inicialmente estudou-se a composição da fase móvel em termos da proporção e natureza do solvente. Partiu-se então de uma fase móvel composta por metanol:tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,1 na proporção de 80:20 (v/v). No entanto, pôde-se perceber que o pico de clorpromazina ficava muito próximo do sinal gerado pela troca de fase no sistema bidimensional (pico de injeção), dessa forma, houve a necessidade de aumentar a polaridade da fase móvel por meio do aumento da proporção de tampão acetato. As proporções estudadas foram 60:40 e 45:55 (v/v) metanol:tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,1. O melhor resultado foi obtido empregando-se a proporção 45:55 (v/v) como pode ser observado pelo cromatogramas da FIG. 35.

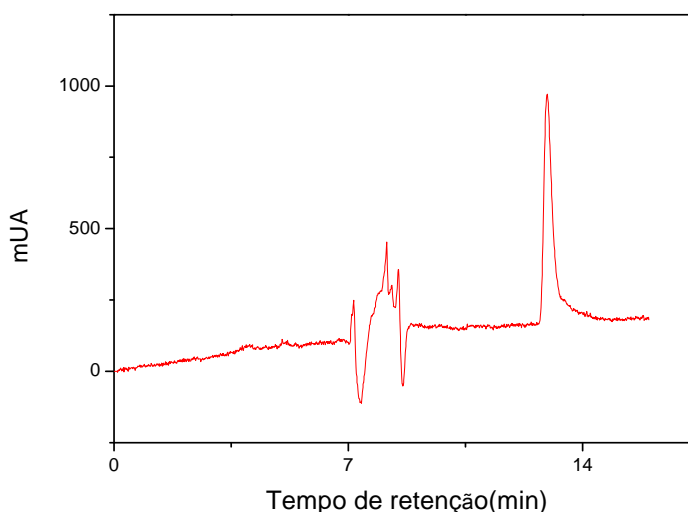


Figura 35: Cromatogramas obtidos pela injeção direta de um padrão de clorpromazina em plasma total no sistema bidimensional, empregando 45:55 (v/v) metanol:tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,1 como fase móvel.

Fonte: do autor.

No entanto, verificou-se um aumento significativo na pressão interna do sistema ($>250 \text{ kgf}$), certamente em decorrência do aumento da viscosidade da fase móvel. Sendo assim, optou-se por substituir o metanol por um solvente de polaridade semelhante, porém com menor viscosidade. A acetonitrila foi então empregada, e

resultou na diminuição significativa da pressão interna do sistema (de 250 para 100 kgf), sem alterações importantes no tempo de retenção do analito, como apresentado na FIG. 36.

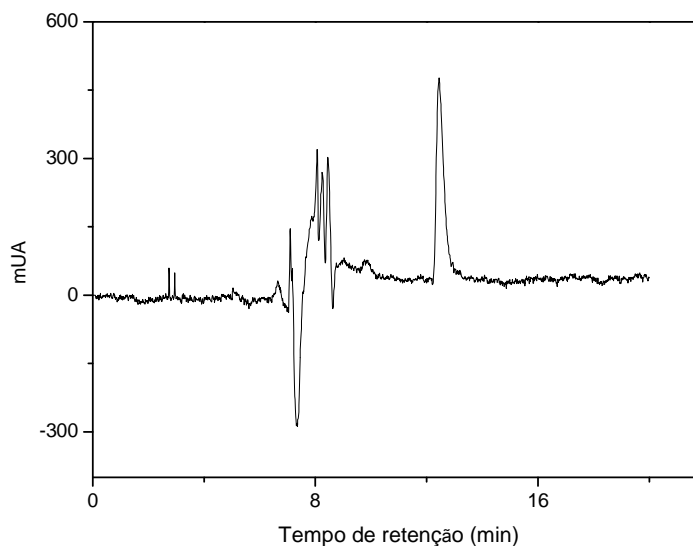


Figura 36: Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão de clorpromazina em plasma total no sistema bidimensional, empregando 45:55 (v/v) acetonitrila:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 como fase móvel.

Fonte: do autor.

Outro parâmetro investigado foi o tempo necessário para a eluição do analito da coluna RAM-MIP-BSA. Esse teste foi feito com base no tempo em que a coluna RAM-MIP-BSA era colocada no percurso analítico sequencialmente com a coluna analítica. Os tempos investigados foram 30 e 60 s e, como pode ser observado na FIG. 37, o pico de melhor perfil foi o obtido no tempo de 30 s. O aspecto disforme do pico obtido com 60 s certamente é resultado do perfil exponencial da eluição da clorpromazina da coluna RAM-MIP-BSA, resultando no aumento da largura do pico. Sendo assim, o tempo de 30 s foi selecionado como condição de trabalho, mesmo não tendo havido uma completa eluição do analito da coluna RAM-MIP-BSA. Ressalta-se, por sua vez, que essa perda em sensibilidade não influenciou na detectabilidade requerida para a análise de clorpromazina em amostra de plasma humano na faixa de concentração terapeuticamente preconizada. Além disso, é importante destacar que não foi constatado nenhum efeito de memória, uma vez que a coluna RAM-MIP-BSA continuou a ser eluída no percurso de extração, após os 30 s como visto no cromatograma do branco (FIG. 38) obtido imediatamente após a injeção do padrão.

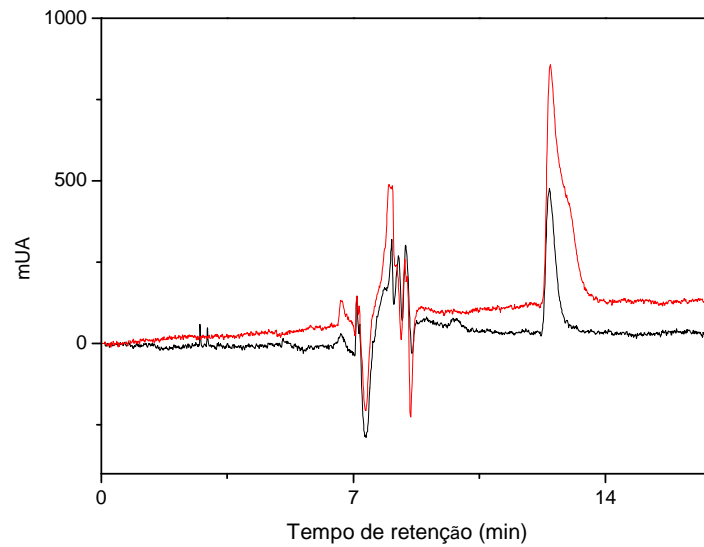


Figura 37 - Cromatogramas obtidos pela injeção direta de um padrão de clorpromazina em plasma total no sistema bidimensional, empregando 30(preto) e 60(vermelho) segundos de eluição. Tempo de retenção da clorpromazina igual a 12,4 min.

Fonte: do autor.

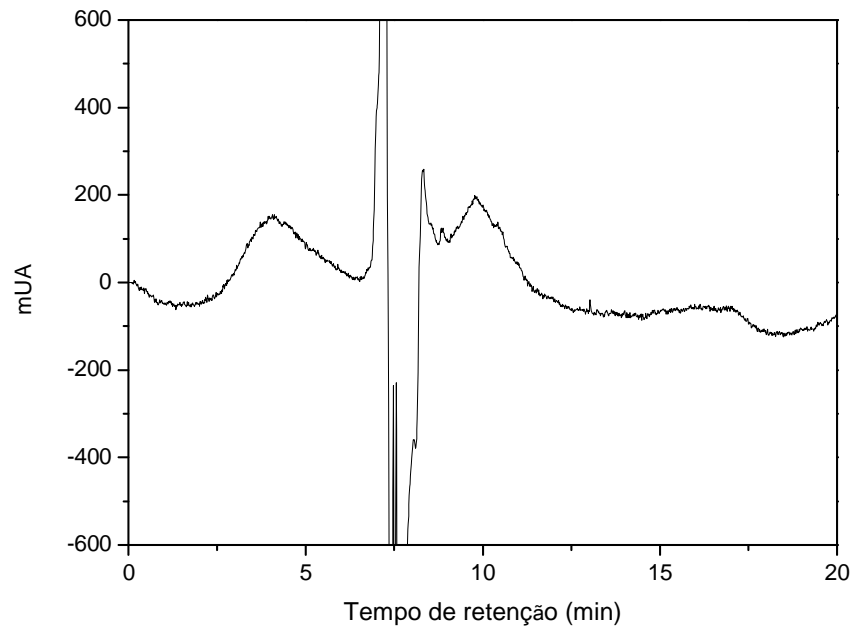


Figura 38 - Cromatograma do Branco empregando 45:55 (v/v) acetonitrila:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 como fase móvel.

Fonte: do autor.

A programação final otimizada de cada ciclo de análise (Figura 22), pode ser observada na TAB. 5.

Tabela 5 - Controle do software LC-Solution para o sistema bidimensional otimizado.

Tempo (min)	Módulo HPLC	Valor
0,01	Bomba A	1mL min
0,01	Bomba B	1mL/min
0,01	Controlador	Válvula na posição A (Figura 19)
5,00	Controlador	Válvula na posição B (Figura 19)
5,30	Controlador	Válvula na posição A (Figura 19)
20,00	Controlador	Desligar

5.4. Validação

A faixa terapêutica da clorpromazina (50 a $300 \mu\text{g L}^{-1}$) foi usada como referência para estipular os pontos a serem estudados na construção da curva analítica. O intervalo estudado entre 30 e $350 \mu\text{g L}^{-1}$ mostrou-se linear como pode se observar na FIG. 39. O coeficiente de correlação foi de $0,9907$ com intercepto de $-39,934$ e inclinação de $49,578$. Cinco diferentes amostras de plasma de indivíduos que não utilizam medicamentos foram avaliadas quanto à presença de interferentes e nenhum composto eluiu no tempo determinado de corrida e nem mesmo nas corridas subsequentes. A maior concentração que apresentou repetitibilidade foi $350 \mu\text{g L}^{-1}$, e o limite de quantificação foi de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (FIG. 40). As concentrações de 30 , 200 e $300 \mu\text{g L}^{-1}$ foram empregadas para a determinação da recuperação absoluta, precisão e exatidão intra e inter-ensaio.

Os resultados de recuperação foram de 81 , 80 e 80% para os padrões de 30 , 200 e $300 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A TAB. 6 apresenta os resultados de precisão e exatidão, calculados respectivamente como DPR e E. Como pode ser observado, o método mostrou-se preciso e exato de acordo com as recomendações do FDA (DPR $< 15\%$ e $-15\% < E < 15\%$, para todos os padrões analisados.

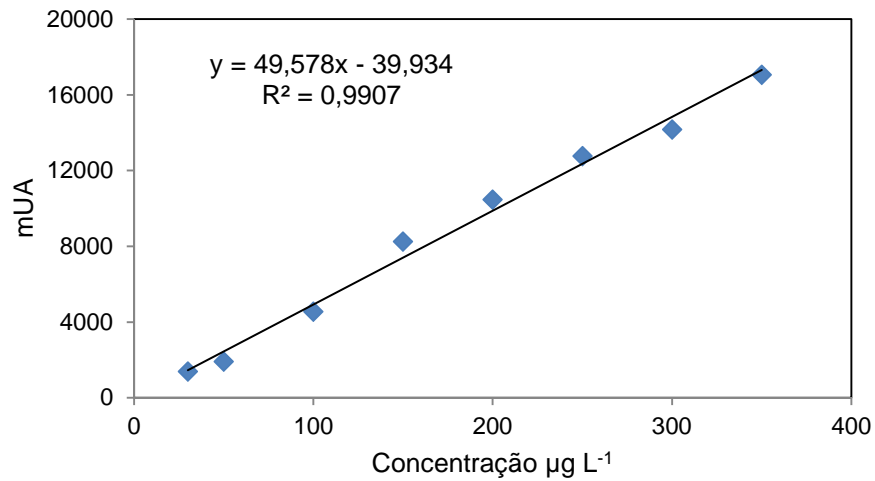


Figura 39 - Curva de calibração para análise de linearidade com os pontos 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg L⁻¹.

Fonte: do autor.

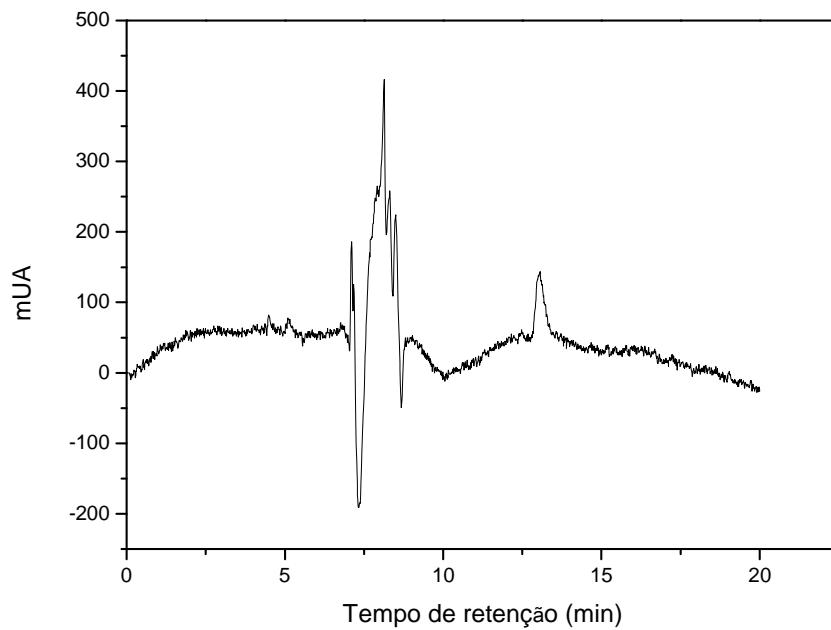


Figura 40 - Cromatograma obtido pela injeção direta de um padrão de clorpromazina na concentração de 30 µg L⁻¹ (LiQ) em plasma humano no sistema bidimensional, empregando 45:55 (v/v) acetonitrila:tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 4,1 como fase móvel.

Fonte: do autor.

Tabela 6 - Precisão e exatidão intra e inter-dias e seus respectivos resultados

		Clorpromazina		
		30	200	300
Intra-dias (n=5)	Concentração Nominal/ $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Concentração Analisada/ $\mu\text{g L}^{-1}$	28,92	212,01	286,58
	DPR*/%	1,38	0,11	0,16
	E**/%	-3,59	6,00	-4,47
	Concentração Nominal/ $\mu\text{g L}^{-1}$	30	200	300
Inter-dias (n=5)	Concentração Analisada/ $\mu\text{g L}^{-1}$	28,38	200,99	286,48
	DPR*/%	2,68	4,86	0,12
	E**/%	-5,37	0,49	-4,5

*Desvio padrão relativo dado em %, **Erro relativo dado em %.

A pré-coluna utilizada durante o processo de validação suportou mais de 90 injeções, mostrando a robustez do RAM-MIP-BSA.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram investigadas algumas metodologias de síntese de polímeros de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas, e um polímero inédito denominado RAM-MIP-BSA foi proposto. Os resultados obtidos durante as análises, mostraram que o RAM-MIP-BSA apresenta uma boa capacidade de pré-concentração seletiva da molécula modelo, bem como uma notável capacidade de eliminação de macromoléculas. Não há relatos na literatura sobre a utilização dos reagentes empregados numa mesma síntese como proposto neste trabalho. O RAM-MIP-BSA também apresentou adsorção compatível com o modelo de Langmuir, comprovando que a interação adsorvente-adsorbato normalmente ocorre em monocamadas por meio de interações químicas específicas ou seletivas.

Ao validar o método, pôde-se observar que o RAM-MIP-BSA utilizado em HPLC-bidimensional foi eficiente para a extração direta de clorpromazina em amostra de plasma humano. Outras vantagens também se destacam como o baixo custo, a alta vida útil e a alta capacidade adsortiva.

REFERENCIAS

ANDERSSON, H. S. AND NICHOLLS I. A., A historical perspective of the development of molecular imprinting. IN: SELLERGREN, B. **Molecularly Imprinted Polymers – Man-made mimics of antibodies their applications in analytical chemistry**. Germany: Johannes Gutenberg University Mainz, 2003, p. 1 – 19.

ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *J. Chromatogr. B*, v. 745, p. 3-13, 2000.

ANTONIO, P.; ILHA, K.; SUARE-ILHA, K. Adsorption of di-2-pyridyl ketone salicyloylhydrazone on silica gel: characteristics and isotherms. *Talanta*, v. 64, p. 484-490, 2004.

AROGUZ, A. Z. Kinetics and thermodynamics of adsorption of azinphosmethyl from aqueous solution onto pyrolyzed (at 600 degrees C) ocean peat moss (*Sphagnum* sp.). *J. Hazard. Mater. B*, v. 135, p. 100-105, 2006.

BERGMANN, N. M.; PEPPAS, N. A. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. *Prog. Polym. Sci.*, v. 33, p. 271-288, 2008.

CASSIANO, N. M. et al. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, V.384, p. 1462-1469, 2006.

CASSIANO, N.M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim. Nova*, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CHEN, L.; XU, S.; LI, J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chem Soc. Rev.*, v. 40, p. 2922-2942, 2011.

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

DABROWSKI, A. Adsorption - from theory to practice, *Adv. Colloid Interface*, v. 93, p. 135-224, 2001.

DUAN, Z. J. et al. Novel surface molecularly imprinted sol-gel polymer applied to the online solid phase extraction of methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid and quinoxaline-2-carboxylic acid from pork muscle. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 401, p. 2291-2299, 2011.

FIGUEIREDO E. C.; ARRUDA, M. A. Z. On-line molecularly imprinted solid phase extractcton for a fast low-pressure separation of chlorpromazine and perphenazine from urine. *Braz. J. Anal. Chem.*, v. 1, p. 36-41, 2010.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Bra. J. Pharmaceut. Sci.*, v. 44, p. 361-375, 2008.

GUO, M. et al. Protein-imprinted polymer with immobilized assistant recognition polymer chains. *Biomaterials*, v. 27, p. 4381-4387, 2006.

HAGINAKA, J.; SAMBE, H. Uniform-Sized Molecularly Imprinted Polymers for 2-Arylpropionic Acid Derivatives Selectively Modified with Hydrophilic External Layer and Their Applications to Direct Serum Injection Analysis. *Anal. Chem.*, V. 72, p. 5206-5210, 2000.

HAGINAKA, J. et al. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. *J. Chromatogr. A*, v. 849, p. 331-339, 1999.

HASANY, S.M.; SEED, M.M.; AHMED, M. Sorption of traces of silver ions onto polyurethane foam from acidic solution. *Talanta*, v. 54, p. 89-98, 2001.

HOGENDOORN, E.; ZONEN, P. V. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *J. Chromatogr. A*, v. 892, p. 435-453, 2000.

HOSHINA, K. et al. Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p. 4957-4962, 2009.

HOSHINA, K. et al. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column. *J. Pharmaceut. Biomed.*, v. 55, p. 916-922, 2011.

HU, C.; CHOU, T. Albumin molecularly imprinted polymer with high template affinity — Prepared by systematic optimization in mixed organic/aqueous media. *Microchem. J.*, v. 91, p. 53-58, 2009.

HUA, K. et al. Surface hydrophilic modification with a sugar moiety for a uniform-sized polymer molecularly imprinted for phenobarbital in serum. *Acta Biomat.*, v. 7, p. 3086-3093, 2011.

HUANG, C. et al. Sensitive and selective liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of astragaloside-IV in rat plasma. *J. Pharmaceut. Biomed.*, V. 40, p. 788-793, 2006.

KILLGORE, J. K.; VILLASEÑOR, S. R. Systematic approach to generic matrix elimination via "heart-cut" column-switching techniques. *J. Chromatogr. A*, v. 739, p. 43-48, 1996.

KIRKLAND, J.J.; DESTEFANO, J.J. The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A*, v. 1126, p. 50-57, 2006.

KITAHARA, K. et al. Synthesis of monodispersed molecularly imprinted polymer particles for high-performance liquid chromatographic separation of cholesterol using templating polymerization in porous silica gel bound with cholesterol molecules on its surface. *J. Chromatogr. A*, v. 1217, p. 7249-7254, 2010.

KLUG, M. et al. Análise das Isotermas de Adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) E Zn(II) pela N-(3,4-Dihidroxibenzil) Quitosana Empregando o Método da Regressão não Linear. *Quim. Nova*, v. 21, p. 410-413, 1998.

KOEBER, R. et al. Evaluation of a Bidimensional Solid-Phase Extraction Platform for Highly Selective On-Line Cleanup and High-Throughput LC-MS Analysis of Triazines in River Water Samples Using Molecularly Imprinted Polymers. *Anal. Chem.*, v. 73, p. 2437-2444, 2001.

LOVE, J. N.; SMITH, J. A.; SIMMONS, R. Are one or two dangerous? Phenothiazine exposure in toddlers. *J. Emerg. Med.*, v. 31, p. 53-59, 2006.

MACHTEJEVAS, E. et al. Sulphonic acid strong cation-exchange restricted access columns in sample cleanup for profiling of endogeneous peptides in bidimensional liquid chromatography Structure and function of strong cation-exchange restricted access materials. *J. Chromatogr. A*, v. 1123, p. 38-46, 2006.

MENEGATTI, R. et al. Schizophrenia: Forty years of the dopaminergic hypothesis from the medicinal chemistry point of view. *Quim. Nova*, v. 27, p. 447-455, 2004.

MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis, *J. Biochem. Bioph. Meth.*, v. 70, p. 263-273, 2007.

MULLETT, W. M. et al. Bidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, v. 801, p. 297-306, 2004.

NAVARROA, Á. V. et al. Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties. *J. Chromatogr. A*, v. 1218, p. 7289-7296, 2011.

ORTELLI, D. et al. Restricted access materials for fast analysis of methadone in serum with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, v. 25, p. 222 – 228, 2002.

PARISI, O. I. et al. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. *Eur. Polym. J.*, v. 45, p. 1634-1640, 2009.

PARISI, O. I. et al. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media, *J. Polym. Res.*, v. 17, p. 355-362, 2010.

PEREZ, B. et al. Determination of cloxacillin in milk and blood of dairy cows by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 698, p. 155-160, 1997.

POLSON, C. et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, v. 785, p. 263-275, 2003.

RACHKOV, A.; MINOURA, N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1544, p. 255-266, 2001.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004

RIEUX, L. et al. Restricted-access material-based high-molecular-weight protein depletion coupled on-line with nano-liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics applications. *J. Chromatogr. A*, v. 1149, p. 169-177, 2007.

RIZZO, M. et al. SPE-HPLC determination of new tetrahydroisoquinoline derivatives in rat plasma. *J. Chromatogr. B*, v. 821, p. 15-21, 2005.

ROSE, M. J.; WOOLF, E.J.; MATUSZEWSKI, B. K. Determination of celecoxib in human plasma by normal-phase high-performance liquid chromatography with column switching and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B*, v. 738, p. 377-385, 2000.

SADÍLEK, P.; SATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. *Trac-trends Anal. Chem.*, Vol. 26, p. 375-384, 2007.

SAMBE, H.; HAGINAKA, J. Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of b-blockers in biological fluids. *Analyst*, v. 128, p. 593-597, 2003.

SAMBE, H.; HOSHINA, K.; HAGINAKA, J. Molecularly imprinted polymers for triazine herbicides prepared by multi-step swelling and polymerization Method Their application to the determination of methylthiotriazine herbicides in river water. *J. Chromatogr. A*, v. 1152, p. 130-137, 2007.

SAMBE, H. et al. Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1134, p. 16-23, 2006.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J. Chromatogr. B*, v. 801, p. 141-156, 2004.

TANAKA, E. et al. Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 854, p. 116-120, 2007.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. 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.

TOTH, B.; LASZLO, K.; HORVAI, G. Chromatographic behavior of silica-polymer composite molecularly imprinted materials. *J. Chromatogr. A*, v. 1100, p. 60-67, 2005.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Anal. Chim. Acta*, v. 668, p. 87-99, 2010.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US FDA), Guidance For Industry. Bioanalytical method validation. Rockville: FDA Center for Drug Evaluation and Research, 2001.

WANG, H. et al. Synthesis of a novel restricted access chiral stationary phase based on atom transfer radical polymerization and click chemistry for the analysis of chiral drugs in biological matrices. *J. Chromatogr. A*, v. 1218, p. 1310-1313, 2011.

XU, W. et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. *J. Chromatogr. A*, p. 1217, p. 7198-7207, 2010.

YIM, D. S.; JEONG, J. E.; PARK, J. Y. Assay of omeprazole and omeprazole sulfone by semi-microcolumn liquid chromatography with mixed-function precolumn. *J. Chromatogr. B*, v. 754, p. 487-493, 2001.