

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAROLINA NASSER BOSCARI

**EMPREGO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR NA EXTRAÇÃO DE
ÁCIDO HIPÚRICO E ÁCIDO METIL-HIPÚRICO EM AMOSTRAS DE URINA
SEGUIDO DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR**

Alfenas/MG

2016

CAROLINA NASSER BOSCARI

**EMPREGO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR NA EXTRAÇÃO DE
ÁCIDO HIPÚRICO E ÁCIDO METIL-HIPÚRICO EM AMOSTRAS DE URINA
SEGUIDO DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR**

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

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Boscari, Carolina Nasser.

Emprego de polímeros de impressão molecular na extração de ácido hipúrico e ácido metil-hipúrico em amostras de urina seguido de análise por eletroforese capilar / Carolina Nasser Boscari. -- 2016. 91 f. : il.

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo .
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Polímeros impressos. 2. Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar. 3. Tolueno. 4. Xilenos. 5. Urina. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD 543

Carolina Nasser Boscari

“Emprego de polímeros de impressão molecular na extração de ácido hipúrico e ácido metil-hipúrico em amostras de urina seguido de análise por eletroforese capilar”

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.

Aprovado em: 23/09/16

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Keyller Bastos Borges
Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei
- UFSJ

Assinatura: 

Dedico este trabalho aos meus pais, Regina e Roberto, Marcos e aos amigos que me acompanharam durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todos os dias me dar força e coragem para nunca desistir de meus objetivos.

Aos meus amados pais, Regina e Roberto, agradeço pelo amor incondicional, pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos. A presença de vocês ao meu lado, a cada momento, a cada decisão, é e foi extremamente importante em cada etapa dessa caminhada. Obrigada por desejarem o melhor para mim, por toda dedicação e esforço para que eu tivesse uma boa educação e por toda força que me deram para que eu pudesse superar cada obstáculo encontrado pelo caminho. Serei eternamente grata por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Obrigada por serem os melhores pais que eu poderia ter. Amo vocês!

Ao Marcos, amor meu, agradeço por todo amor e carinho e principalmente pela paciência e compreensão durante todos os momentos. Obrigada por me apoiar, incentivar, dividir comigo seus conhecimentos e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também à sua família por ter me recebido com tanto afeto e carinho e compreender minhas ausências.

Agradeço, de forma especial, ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo deste trabalho. Obrigada por toda orientação, por compartilhar comigo seus conhecimentos, por todos os ensinamentos e por me permitir conviver com o excelente profissional e pessoa exemplar que você é! Gratidão!

À Giovanna, aluna de IC, agradeço por ter me auxiliado desde o início deste trabalho, por sua dedicação, paciência, companhia, pelas conversas sobre livros, filmes, vida, enfim sobre tudo, durante as inúmeras análises e corridas e por tornar a caminhada mais leve e tranquila! E como eu sempre disse: o que seria de mim sem você, Giovanna?! Sentirei saudades de nossos momentos juntas e desejo a você tudo de melhor!

Aos queridos amigos da “Turma de Quinta” (que temporariamente foi na sexta devido aos meus horários): Andressa, Poliana, Raphael, Rodrigo, Fernanda, Cinthia, Gabriela, Jonathan, Mayra e Monalisa agradeço imensamente pelos momentos de descontração, conversas e desabafos, pelas risadas e lanches maravilhosos e por

tornarem tudo mais fácil e divertido. Obrigada pela amizade e pela companhia maravilhosa de sempre! Amo vocês...

Às meninas da “Casa Amarela”, Andressa e Thaís, gostaria de agradecer pela compreensão, pela companhia no dia-a-dia, pela boa convivência, por aturarem meus períodos de estresse, pela paciência, não só comigo, mas também com meus meninos. Sou muito grata a vocês!

Às amigas Flávia, Vanessa, Hέλvia, Kris e Jaque, agradeço pela amizade ao longo de todos estes anos, pelo exemplo de dedicação e perseverança, pelo incentivo e por todos os bons momentos que dividimos! Que possamos ter novos bons momentos para lembrar. Parabéns pelas mulheres incríveis que são...

Às amigas Luciana, Nathalia, Fabíola e Alexandre, Jacqueline e Hernane, Ana Luiza e Eduardo, que mesmo à distância, demonstraram todo seu apoio e atenção, agradeço pelo incentivo e por compreenderem minhas ausências. A amizade de vocês é muito especial para mim!

À querida amiga Dona Carla agradeço pelos conselhos, conversas, atenção e cuidados comigo desde que nos conhecemos. Obrigada por me incluir em suas orações e por estar sempre presente!

Aos colegas e professores do Laboratório LATF: Lailah, Taila, Tassia, Rodrigo, Matheus, Henrique, Jonathan, Giovanna, Adriana, Mariana, Tássia, Lucas, Bruna, Luis, Mayara, Rafaela, Lellis, Grazi, Bia, Giovana Celucci, Simone, Marcia, Luzia e às professoras Isarita e Vanessa agradeço pela companhia, pela ajuda, pelas conversas e brincadeiras, pelos conhecimentos trocados e, em especial a Mariane e Pati, pela disposição e por terem me auxiliado e orientado em diversos momentos durante estes dois anos de mestrado. Meu muito obrigada a todos vocês!

Também gostaria de agradecer a todos que contribuíram cientificamente para o desenvolvimento deste projeto:

- Ao professor Dr. Keyller Bastos agradeço por sua disponibilidade em realizar as análises de microscopia eletrônica de varredura, por suas sugestões e colaborações;
- À Olímpia agradeço pelas análises de UV-vis e por suas contribuições desde o início;
- Ao professor Dr. Ihosvany Camps agradeço pelas tentativas em realizar as análises de microscopia de força atômica;
- Ao professor Dr. Marcos José Marques, da área de parasitologia, agradeço pela disponibilidade em fotografar nossas fibras extratoras;

- Ao professor José Antônio Leite que intermediou conversas que permitiram a coleta de amostras necessárias ao desenvolvimento do trabalho;
- Aos colegas Luana Giusto e Alberth Gomes, agradeço pela disponibilidade e pela realização das análises termogravimétricas;
- Ao técnico em bioquímica clínica Bruno Damião, agradeço pelos ensinamentos e pela realização das análises de determinação da creatinina;
- Aos trabalhadores que permitiram a aplicação do método desenvolvido através da doação de amostras.

À Unifal-MG e ao Programa de Pós-Graduação em Química agradeço pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Química, agradeço pelo deferimento para a realização do curso de Pós-Graduação em Química. Um agradecimento especial aos colegas e amigos Bernadete, Taciane, Lucas, Maria Helena e Silvana por todo apoio, auxílio, atenção e compreensão durante este período. Muito obrigada!

À todos aqueles que participaram direta ou indiretamente com este projeto e que colaboraram com meu crescimento profissional e pessoal, meu sincero muito obrigada!

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.

(Martin Luther King)

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

(José de Alencar)

RESUMO

Anualmente, milhões de trabalhadores são afetados por doenças ligadas à exposição a agentes químicos no ambiente de trabalho. No Brasil, a Norma Regulamentadora 7 estabelece parâmetros para controle da exposição ocupacional, estabelecendo valores de referência, o índice biológico máximo permitido, o material biológico e o método analítico utilizado na determinação de indicadores biológicos. Para solventes como o tolueno e xileno, os indicadores biológicos são, respectivamente, os metabólitos ácido hipúrico (AH) e ácido 4-metil-hipúrico (AMH), excretados na urina. No trabalho proposto, sintetizou-se um polímero de impressão molecular (MIP) seletivo a AH e AMH, utilizando como reagentes metanol, ácido metilhipúrico (molécula molde), 4-vinilpiridina, etileno glicol dimetacrilato e ácido 4,4'-azobis 4-cianovalérico. O polímero sintetizado foi empregado na confecção de uma fibra extratora usada no preparo de amostras. A etapa de extração ocorreu em 7 min e a dessorção, realizada em tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 10 com adição de 0,5 mM de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), também em 7 min. O padrão interno utilizado foi ácido 3 hidroxibenzoico (AHB) a 1 g L⁻¹. A solução de eluição foi analisada por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) com detecção por UV-vis. A amostragem foi eletrocínética com potencial elétrico de -4 KV e a corrida eletroforética com potencial elétrico de -15 kV. O eletrólito de corrida empregado foi o tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 10 com adição de 0,5 mmol L⁻¹ de CTAB. A faixa analítica foi de 0,5 a 5 g L⁻¹, com amostras de urina fortificadas com 1 g L⁻¹ do padrão interno. Os analitos de interesse foram separados com resolução maior que 1,5, e com precisões intra e interdias menores de 20% para o limite de quantificação (LQ) (0,5 g L⁻¹) e menores que 15% para os demais pontos (2,0 e 5,0 g L⁻¹). As exatidões intra e interdias ficaram compreendidas entre -20 e 20% para o LQ (0,5 g L⁻¹) e entre -15 e 15% para os demais pontos (2,0 e 5,0 g L⁻¹) O método mostrou-se adequado para monitorização da exposição ao tolueno e xileno, pela quantificação dos metabólitos.

Palavras-chave: Ácido Hipúrico. Ácido Metil-Hipúrico. MIP. Cromatografia Eletrocínética Micelar.

ABSTRACT

Millions of workers are affected by diseases linked to exposure to chemicals in the workplace. In Brazil, the Regulatory Standard 7 sets parameters to control occupational exposure, setting reference values, the maximum biological index, the biological material and the analytical method used in determination of biological indicators. Hippuric acid and methyl hippuric acid are metabolites and biological indicators of the toluene and xylenes, respectively, and their determinations in urine samples can monitor the occupational exposition to these solvents. This work describes the synthesis and characterization of a probe impregnated with molecularly imprinted polymer (MIP) to extract hippuric and methyl hippuric acids directly from untreated urine samples, followed by micellar electrokinetic chromatography. The synthesis of selective MIP used reagents as methanol, metilhipúrico acid (template molecule), 4-vinylpyridine, ethylene glycol dimethacrylate, and 4,4'-azobis-4-cyanovaleric acid. The selectivity of the MIP probe was attested in comparison with the non imprinted polymer (NIP) probe. The extraction step occurred at 7 min and the desorption, performed in 50 mM sodium tetraborate buffer pH 10 with 0.5 mM cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), also in 7 min. The internal standard used was 3-hydroxybenzoic acid (HBA) 1 g L⁻¹. The system variables were optimized to provide ideal conditions for the extraction and desorption of the analytes, as well as for MEKC analyses. The method was linear from 0.5 to 5.0 g L⁻¹ for both the analytes, with correlation coefficients > 0.994. The precisions and accuracies, expressed as relative standard deviation and relative error, were < 20.0 and within -15.4 to 16.6%, respectively, in accordance with the FDA recommendation. MIP probe has proven to be simple, cheap, resistant, and synthetically reproducible, being successfully used to analyze hippuric and methyl hippuric acids from real samples.

Keywords: Hippuric acid. Methyl hippuric acid. Molecularly imprinted polymer.

Micellar electrokinetic chromatography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química do tolueno.....	22
Figura 2 -	Biotransformação do tolueno.....	23
Figura 3 -	Estruturas químicas do xileno.....	24
Figura 4 -	Biotransformação do m-xileno.....	25
Figura 5 -	Esquema genérico da síntese do MIP.....	27
Figura 6 -	Representação da migração de ânions em CE.....	32
Figura 7 -	Representação do perfil de migração no interior de um capilar mediante a) fluxo pressurizado, b) fluxo eletrosmótico.....	32
Figura 8 -	Representação esquemática do sistema de CE.....	34
Figura 9 -	Capilar de vidro neutro utilizado na confecção da fibra extratora.....	42
Figura 10 -	Etapas da confecção da fibra extratora.....	43
Figura 11 -	Espectros FT-IR referentes aos reagentes utilizados nas sínteses dos polímeros.....	50
Figura 12 -	Espectros FT-IR dos polímeros sintetizados.....	51
Figura 13 -	Curvas TG/DTG obtidas a partir de análise do MIP. Condições de análise: ar sintético com vazão de 100 mL min ⁻¹ , taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , tmax de 1000 °C.....	53
Figura 14 -	Curvas TG/DTG obtidas a partir de análise do NIP. Condições de análise: ar sintético com vazão de 100 mL min ⁻¹ , taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , tmax de 1000 °C.....	54
Figura 15 -	Imagens obtidas por MEV: a) MIP 100x; b) MIP 200x; c) NIP 100; d) NIP 200x.....	55
Figura 16 -	Extremidade da fibra extratora revestida com MIP.....	56

Figura 17 - Superfície da fibra extratora observada ao microscópio óptico, aumento de 40x.....	56
Figura 18 - Imagens da fibra extratora de MIP analisada por MEV: a) 50x; b) 100x.....	57
Figura 19 - Representação FEO e FE no interior do capilar de sílica, tendo em vista as condições de análise estabelecidas: condição com polaridade invertida e uso de CTAB.....	59
Figura 20 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções aquosas contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L ⁻¹ . Condição de amostragem eletrocinética -2 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de a) -12 kV, b) -14 kV.....	60
Figura 21 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções aquosas contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L ⁻¹ . Condição de amostragem eletrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de a) -12 kV, b) -14 kV.....	61
Figura 22 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções aquosas contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L ⁻¹ . Condição de amostragem eletrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de -15 kV. Condição intermediária testada.....	62
Figura 23 - Eletroferogramas obtidos a partir de dos padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 25 mmol L ⁻¹ pH 10 e corrida eletroforética com tampão a) 25 mmol L ⁻¹ e b) 50 mmol L ⁻¹ , contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L ⁻¹ . Condição de amostragem eletrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de -15 kV.....	64
Figura 24 - Eletroferogramas obtidos a partir de dos padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 50 mmol L ⁻¹ pH 10 e corrida eletroforética com tampão a) 25 mmol L ⁻¹ e b) 50 mmol L ⁻¹ , contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L ⁻¹ . Condição	65

	de amostragem eletrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de -15 kV.....	
Figura 25 -	Estruturas químicas dos padrões internos: a) ácido vanílico, b) ácido 3-hidroxibenzóico.....	66
Figura 26 -	Eletroferogramas obtidos a partir de dos padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 50 mmol L ⁻¹ pH 10, contendo a) 2,0 g L ⁻¹ de AV e b) 2,0 g L ⁻¹ de AHB.....	67
Figura 27 -	Eletroferogramas obtidos a partir de padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 50 mmol L ⁻¹ pH 10, contendo 2,0 g L ⁻¹ de AV, 2,0 g L ⁻¹ de AHB, 2,0 g L ⁻¹ de AH e 2,0 g L ⁻¹ de AMH. Verificação do tempo de eluição dos padrões internos em relação aos analitos.....	68
Figura 28 -	Curva analítica à referente correção dos sinais dos analitos pelo padrão interno AHB. a) AH, b) AMH em concentrações variando entre 0,5 a 5,0 g L ⁻¹ e AHB em concentração de 2 g L ⁻¹	69
Figura 29 -	Curva analítica à referente correção dos sinais dos analitos pelo padrão interno AV. a) AH, b) AMH em concentrações variando entre 0,5 a 5,0 g L ⁻¹ e AHB em concentração de 2,0 g L ⁻¹	70
Figura 30 -	Influência do tempo de extração na resposta analítica.....	72
Figura 31 -	Influência do tempo de dessorção na resposta analítica.....	73
Figura 32 -	Curva analítica obtida a partir dos padrões, preparados em urina, contendo AH e AMH em concentrações variando entre 0,5 a 5,0 g L ⁻¹ e contendo AHB em concentração de 2,0 g L ⁻¹ ...	74
Figura 33 -	Eletroferogramas de urina não fortificada (a- branco) e fortificada com AH e AMH nas concentrações de b) 0,5 g L ⁻¹ , c) 5,0 g L ⁻¹	77
Figura 34 -	Avaliação da precisão da fibra.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais atribuições de comprimento de onda nos espectros dos reagentes de síntese e dos polímeros.....	52
Tabela 2 - Resultados de linearidade dos analitos em urina.....	74
Tabela 3 - Precisão e exatidão intra-dia dos analitos.....	75
Tabela 4 - Precisão e exatidão inter-dia dos analitos.....	76
Tabela 5 - Concentração dos analitos em amostras reais.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH –	Ácido hipúrico
AHB –	Ácido hidroxibenzóico
AMH –	Ácido metilhipúrico
ATR –	Reflectância total atenuada
AV –	Ácido vanílico
CAAE –	Certificado de apresentação para Apreciação Ética
CEC –	Eletrocromatografia capilar
CGE –	Cromatografia capilar em gel
CIEF –	Focalização Isoelétrica Capilar
CTAB –	Brometo de cetil trimetilamônio
CZE –	Eletroforese em solução livre
CE –	Eletroforese capilar
EGDMA –	Etileno glicol dimetacrilato
FE –	Fluxo eletroforético

FEO –	Fluxo eletrosmótico
FT-IR –	Infra vermelho com transformada de Fourier
GC-MS –	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
HPLC –	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBE –	Índice biológico de exposição
IBMP –	Índice biológico máximo permitido
LQ –	Limite de quantificação
MB –	Monitorização biológica
MEKC –	Cromatografia eletroforética micelar
MEV –	Microscopia eletrônica de varredura
MIP –	Polímeros de impressão molecular
NIP –	Polímero não impresso
NR 7 –	Norma regulamentadora nº 7
OIT –	Organização Internacional do Trabalho
PI –	Padrão interno
SNC –	Sistema nervoso central

- SPE – Extração em fase sólida
- TG – Termogravimetria
- UV – Radiação Ultravioleta
- VR – Valor de referência da normalidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	SOLVENTES ORGÂNICOS: XILENO E TOLUENO	21
2.2	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR.....	25
2.3	ELETOFORESE CAPILAR: CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR	30
3	OBJETIVOS	36
3.1	GERAIS.....	36
3.2	ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	EQUIPAMENTOS.....	38
4.2	REAGENTES E PADRÕES	38
4.3	AMOSTRAS	39
4.4	METODOLOGIA.....	40
4.4.1	Síntese MIP	40
4.4.2	Síntese NIP	41
4.4.3	Confecção da fibra extratora	41
4.4.4	Caracterização do MIP e MIP	43
4.4.5	Processo de extração e dessorção com a fibra extratora	44
4.4.6	Condições de otimização das variáveis do sistema	44
4.4.6.1	<i>Configuração de método de detecção</i>	45
4.4.6.2	<i>Análise do campo elétrico ideal</i>	45
4.4.6.3	<i>Testes de concentração do tampão</i>	46

4.4.6.4	<i>Avaliação dos padrões internos</i>	46
4.4.6.5	<i>Testes do tempo de extração e dessorção</i>	47
4.4.7	Validação	47
4.4.8	Quantificação da creatinina	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	49
5.2	CONFECÇÃO DA FIBRA EXTRATORA	55
5.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA MEKC	57
5.3.1	Seleção do comprimento de onda	58
5.3.2	Otimização das condições de amostragem e corrida	58
5.3.3	Escolha do tampão de corrida	63
5.4	ESCOLHA PADRÕES INTERNOS	66
5.5	PREPARO DA AMOSTRA	72
5.5.1	Tempo e condições de extração e eluição	72
5.5.2	Figuras de mérito	74
5.5.3	Amostras reais	79
6	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Internacional do Trabalho, mais de dois milhões de trabalhadores são afetados por doenças ocupacionais anualmente. Pode-se definir doenças ocupacionais como variações que ocorrem na saúde do trabalhador, devido a fatores ligados à atividade desempenhada ou às condições de trabalho as quais o trabalhador está submetido¹. No local de trabalho, os trabalhadores podem estar expostos a diversos tipos de riscos tais como riscos químicos, físicos, biológicos, ergonômicos ou riscos de acidentes, podendo resultar em sérios danos à saúde e comprometendo o bem-estar dos indivíduos afetados². A exposição a agentes químicos, por exemplo, pode provocar intoxicações, agudas ou crônicas, dependendo do tempo e forma de exposição, da concentração e toxicidade da substância, de fatores ambientais, condições fisiopatológicas do indivíduo exposto e das propriedades físico-químicas dos compostos¹.

A maioria das indústrias utiliza solventes orgânicos em diferentes etapas do processo produtivo. O emprego destas substâncias é bastante amplo em laboratórios químicos e em diversos setores, como na indústria alimentícia, siderúrgica, plásticos e borrachas, petroquímico e também no meio rural³. Dentre os solventes orgânicos mais utilizados destacam-se tolueno, estireno, etilbenzeno e xileno, sendo empregados componentes de tintas e vernizes ou como matéria-prima para a síntese orgânica de outros compostos na indústria química. Entretanto, estes agentes são considerados de alto risco ocupacional e, devido a elevada toxicidade apresentam riscos significativos à saúde dos trabalhadores expostos⁴.

A monitorização biológica (MB) tem por objetivos monitorar os indivíduos expostos, avaliar o nível da exposição ocupacional e permitir o controle da eficiência dos sistemas de prevenção. A MB é definida como medição e quantificação de substâncias químicas ou de seus metabólitos, denominados indicadores biológicos de exposição, em tecidos, fluidos, secreções e outras amostras biológicas do trabalhador³.

Deste modo, após a quantificação dos IBE presentes em amostras de indivíduos expostos é possível avaliar se os níveis encontrados encontram-se dentro dos índices biológicos máximos permitidos estabelecidos pelas normas vigentes⁴.

A Norma Regulamentadora Nº 7 do Ministério do Trabalho e Previdência Social⁵ estabelece parâmetros para controle da exposição ocupacional a alguns agentes químicos, incluindo vários solventes orgânicos. A legislação estabelece valores de referência da normalidade, que corresponde ao valor possível de ser encontrado em populações não-expostas ocupacionalmente e o IBMP, correspondendo ao valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não corre risco de danos à saúde. Além destes parâmetros, a NR 7 estabelece também o material biológico a ser utilizado nas análises e o método analítico utilizado na determinação dos indicadores biológicos correspondentes. No caso dos solventes tolueno e xileno, os indicadores biológicos estabelecidos são, respectivamente, os metabólitos ácido hipúrico (AH) e ácido metil-hipúrico (AMH), excretados na urina.

Os métodos analíticos mais utilizados e indicados pela NR 7 para a quantificação destes metabólitos são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência. Oashi e colaboradores⁶ realizaram um trabalho de quantificação de metabólitos de compostos orgânicos voláteis, entre eles o AH e AMH, através da conversão dos mesmos em seus derivados éster metílicos, por ação de metanol e ácido clorídrico, sendo quantificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Entretanto, outros métodos de análise podem ser utilizados na determinação de ácido hipúrico e ácido metil-hipúrico. Recentemente, a eletroforese capilar tem sido utilizada na determinação de ácido hipúrico em soro de leite⁶ e urina⁷, por exemplo. Esta técnica e suas variações possuem alto poder de separação de compostos em solução em um curto tempo de análise⁸.

Aliado aos métodos de determinação citados, nossa hipótese é que seja possível extrair seletivamente AH e AMH de uma determinada amostra biológica (urina) pelo uso de polímeros de impressão molecular (MIP – *Molecularly Imprinted Polymers*)¹⁰. Os MIPs são polímeros sintéticos, altamente seletivos, obtidos pela fixação química de monômeros funcionais ao redor de uma molécula molde¹¹. Após a polimerização, a molécula molde é retirada e a cavidade gerada é complementar à molécula modelo em termos de grupos funcionais e estrutura tridimensional¹². Portanto, os MIP podem ser sintetizados a partir dos analitos de interesse, AH e AMH, a fim de realizar a extração rápida dos mesmos das amostras de urina, seguido da quantificação destas substâncias através da CE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica relata sobre os solventes orgânicos cujos metabólitos são os analitos em estudo. As características dos materiais, diferentes técnicas de síntese dos MIP e os princípios e aplicações da CE e MECK também são relatados.

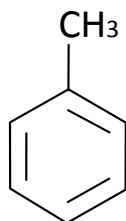
2.1 SOLVENTES ORGÂNICOS: XILENO E TOLUENO

Solventes são substâncias químicas ou mistura líquida de substâncias químicas, geralmente orgânicas, capazes de dissolver outro material¹³ e podem ser sintetizados ou obtidos a partir de fontes naturais. A maior parte dos solventes orgânicos é obtida a partir do refino do petróleo⁴.

Os solventes orgânicos são geralmente compostos altamente lipossolúveis, altamente voláteis, inflamáveis e são capazes, bem como seus produtos de decomposição ou metabólitos, de produzir efeitos tóxicos quando em contato com o organismo³. Estes compostos tendem a ser acumular em tecido de elevado conteúdo lipídico, perpetuando seus efeitos tóxicos². Diferenças sutis na estrutura química de um solvente orgânico podem alterar sua toxicidade, uma vez que as características tóxicas são inerentes ao número de átomos de carbono, a presença de duplas ou triplas ligações, às características da cadeia carbônica e aos tipos de grupos funcionais presentes¹³.

O tolueno, um dos solventes orgânicos produzidos em maior quantidade a nível mundial, é um hidrocarboneto aromático, volátil, incolor e de odor característico, obtido a partir do petróleo. É componente de tintas, colas, diluentes, borrachas, resinas, removedores e da gasolina¹⁴. Sua estrutura química é mostrada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química do tolueno



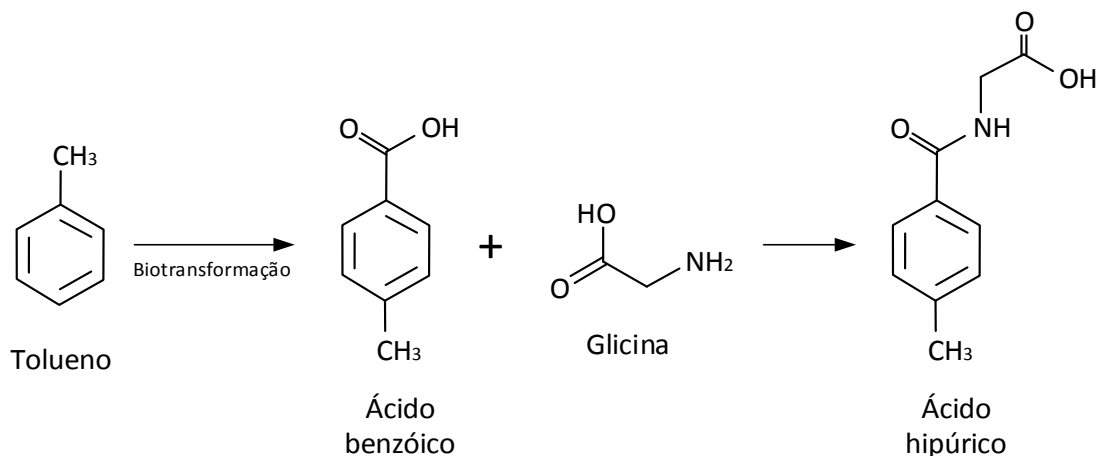
Fonte: do autor, 2016.

Este solvente é introduzido no organismo principalmente pela via respiratória: seus vapores se difundem rapidamente pelo organismo, penetrando na corrente sanguínea produzindo excitação e alterações de consciência. A segunda via de exposição é a cutânea, devido às características lipossolúveis deste solvente, provocando ressecamento e irritação da pele¹⁵. O contato com vapores gera irritações nos olhos, garganta, brônquios e na laringe e, a inalação provoca além de náuseas, dores de cabeça e confusão mental quando em pequenas concentrações. O tolueno, após a inalação, se acumula preferencialmente no cérebro e nos tecidos gordurosos, atuando como agente depressor.

Em intoxicações agudas (exposição a altas doses por curtos períodos de tempo), sua ação é predominante sobre o sistema nervoso central (SNC) causando excitação e euforia, tontura, falta de coordenação muscular, alucinações, podendo evoluir ao coma e a encefalopatia hepática persistente¹⁶. No aparelho cardiovascular, o tolueno provoca arritmias (bradicardia e fibrilação ventricular) e infarto do miocárdio¹⁵.

A biotransformação do tolueno no organismo ocorre no fígado e se dá, inicialmente, pela formação de álcool benzílico por ação do citocromo P-450. Em seguida ocorre a oxidação do álcool produzindo benzaldeído como composto intermediário. Por ação da enzima aldeído desidrogenase, o benzaldeído é convertido à ácido benzóico que, por sua vez, conjuga-se ao aminoácido glicina originando o metabólito ácido hipúrico (AH)³. Após a biotransformação (Figura 2) o metabólito é excretado pela urina. A monitorização biológica da exposição ao tolueno é feita então a partir da quantificação metabólito ácido hipúrico em urina¹⁷.

Figura 2 - Biotransformação do tolueno



Fonte: Fundação Jorge Duprat e Figueiredo (FUNDACENTRO), 2014 ¹⁵.

A NR 7 estabelece parâmetros para controle biológico da exposição ocupacional ao tolueno sendo o valor de referência estabelecido de até 1,5 g/g creatinina e o índice biológico máximo permitido de 2,5 g/g creatinina. Segundo a legislação vigente (NR 7), a amostra utilizada para controle de exposição ao tolueno é urina, sendo a quantificação feita por GC ou HPLC⁵.

A creatinina é um produto da desidratação da creatina fosfato³. Esta substância é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas e transportada para os músculos, onde é fosforilada a fosfocreatina, por ação da enzima creatina quinase, sendo que parte do total produzido é convertida em creatinina¹⁸. A taxa de excreção da creatinina, na ausência de doença renal, é relativamente constante, proporcional à massa muscular e paralela à produção endógena. Esta substância é filtrada principalmente nos rins e não sofre reabsorção renal¹⁹.

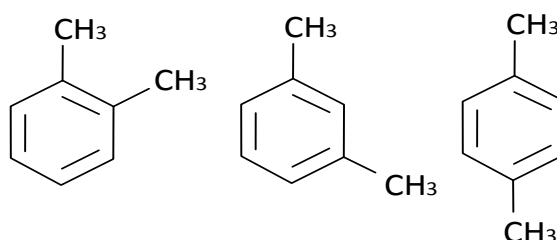
A creatinina é utilizada para avaliar a função renal através da taxa de filtração glomerular, tendo como base a concentração da creatinina no sangue, o volume urinário correspondente a 24 h e da creatinina urinária²⁰. Portanto, a taxa de filtração glomerular é feita pela taxa de depuração (*clearance*) da creatinina a partir da creatinina urinária e plasmática.

A quantidade constante de produção e excreção da creatinina, a torna um marcador útil para a quantificação e correção de substâncias presentes no organismo, em virtude de sua independência de fatores como dieta e hidratação¹⁸.

O xileno é um hidrocarboneto aromático, incolor, de odor doce, altamente inflamável constituído por uma mistura dos isômeros orto-xileno (o-xileno), meta-

xileno (m-xileno) e para-xileno (Figura 3)²¹. É utilizado como precursor de diferentes produtos químicos, solvente para tintas e vernizes, em indústrias de plásticos e fibras sintéticas e na indústria de petróleo, onde é usado como aditivo para combustíveis automotivos e de aeronaves²².

Figura 3 - Estruturas químicas do xileno



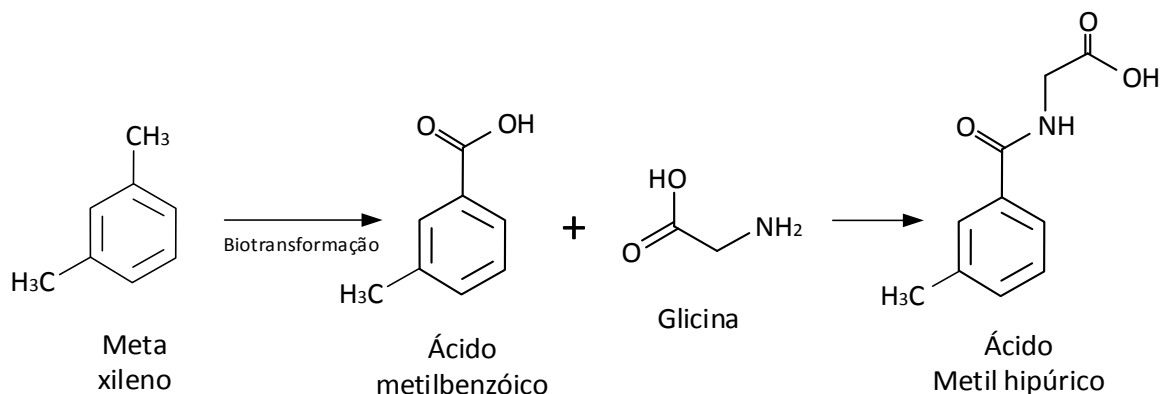
Fonte: COSTA *et al*, 2007²¹.

A principal via de introdução do xileno no organismo é a respiratória, sendo que cerca de 60% do total inalado é absorvido. O xileno é muito solúvel no sangue e nos tecidos, especialmente o adiposo e, embora sua distribuição pelo organismo não seja muito esclarecida, é possível verificar a presença deste solvente em todos os órgãos de uma pessoa exposta².

O xileno é nocivo se ingerido causando náuseas, dores de cabeça e vômitos; provoca irritação e dermatites após contato prolongado ou repetido com a pele; é prejudicial ao feto podendo prejudicar também a fertilidade e afeta o sistema nervoso central com vertigens e até perda de consciência²². A exposição a elevadas concentrações por longos períodos de tempo pode provocar danos hepáticos e renais, com aumento dos níveis de ureia no sangue, congestão pulmonar, danos neurológicos, insuficiência respiratória e hepatomegalia²³.

Noventa e cinco por cento das moléculas absorvidas pelo trato respiratório são metabolizadas no fígado. Na biotransformação do xileno ocorre a oxidação do solvente a álcool metil benzílico. Este é oxidado ao isômero correspondente metil benzaldeído, por ação da enzima álcool desidrogenase. O metil benzaldeído é então convertido ao correspondente orto, meta ou para-ácido metilbenzóico, se conjuga com o aminoácido glicina e posteriormente é eliminado na urina como o metabólito ácido metil-hipúrico (Figura 4)¹⁵.

Figura 4 - Biotransformação do m-xileno



Fonte: FUNDACENTRO, 2014 ¹⁵.

De acordo com a NR 7, a monitorização biológica da exposição ao xileno é feita pela quantificação, através de análise por GC ou HPLC, do metabólito AMH em urina. Para este metabólito não é estabelecido o VR, visto que esta substância não está presente no organismo de indivíduos não expostos ocupacionalmente. Já o IBMP é estabelecido em no máximo 1,5 g/g creatinina⁵.

2.2 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

Impressão molecular é uma técnica capaz de produzir materiais poliméricos sintéticos, que apresentem cavidades seletivas a uma determinada molécula molde^{10,12}. O conceito de impressão molecular surgiu da teoria de Pauling para a formação de anticorpos, onde o antígeno era usado como molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos resultando numa configuração complementar. Esta técnica surgiu, portanto, do interesse da ciência em imitar a seletividade inerente a sistemas biológicos tais como sistema enzima-substrato ou antígeno-anticorpo¹¹.

A impressão molecular consiste no preparo de um polímero contendo locais de ligação de seletividade pré-determinada a um analito e cujo mecanismo de retenção baseia-se no reconhecimento molecular da substância de interesse²⁴.

A utilização dos polímeros de impressão molecular (MIP – do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) teve início com os experimentos desenvolvidos por Polyakov, em 1931. Este observou que cavidades específicas eram formadas durante a preparação

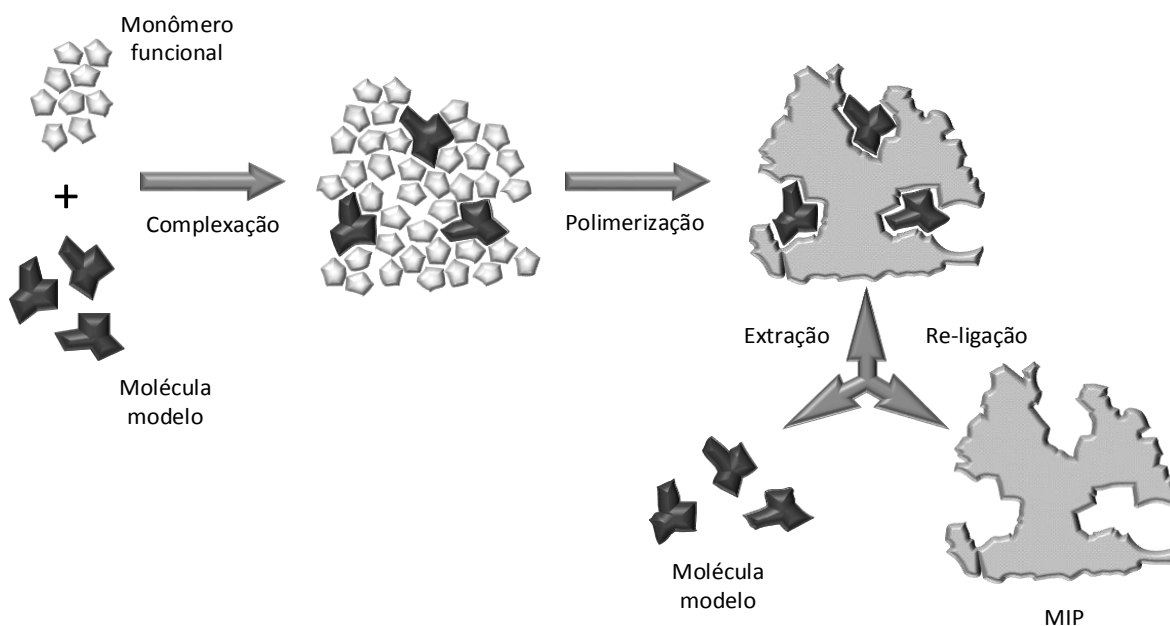
de sílica na presença de um composto para o qual se desejava um adsorvente específico²⁵. As cavidades criadas correspondiam a um tipo de impressão gerada pela interação (ligações de hidrogênio, interação de van der Waals, atrações inter iônicas, e outros tipos de interações intermoleculares) entre espécies químicas utilizadas como modelo e a sílica. Após a remoção da molécula modelo, observou-se que as cavidades específicas geradas permaneciam intactas, resultando em um extrator de fase sólida seletivo¹², capaz de manter suas características estruturais e físico-químicas inalteradas após várias etapas de extração¹².

O processo de geração destes receptores moleculares ocorre quando monômeros funcionais e o agente de ligação cruzada são polimerizados em torno de uma molécula modelo, também chamada de molécula de impressão ou molécula molde²⁶.

Durante o processo de síntese, os monômeros funcionais formam um complexo com a molécula molde e, seguindo a polimerização, os grupos funcionais da molécula de impressão são mantidos em posição por ação de um agente de ligação cruzada²⁶. A remoção subsequente da molécula molde revela locais de ligação (microcavidades de tamanhos uniformes) complementares à forma, tamanho e estereoquímica do analito (Figura 5). A síntese destes polímeros pode ocorrer a partir de diferentes técnicas, sendo dependente das características físico-químicas do analito de interesse, ou seja, da molécula molde.

O emprego do polímero gerado como sorvente para extração em fase sólida é versátil e o material polimérico apresenta alta resistência em meios fortemente ácidos e básicos além de serem compatíveis com diferentes tipos de solventes orgânicos²⁷. Também podem ser manipulados em altas pressões e temperaturas e possuem a capacidade de preservar suas características e seletividade originais por longos períodos quando armazenados a seco e a temperatura ambiente²⁸.

Figura 5 - Esquema genérico da síntese do MIP



Fonte: do autor,2016.

A técnica mais utilizada na síntese do MIP é a impressão não covalente. Neste processo, o analito modelo e o monômero funcional dão origem complexo molécula molde-monômero funcional através de ligações não-covalentes, tais como ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, de Van der Waals ou interações hidrofóbicas²⁹. Após a síntese, a molécula molde ou o analito de interesse também se ligam ao MIP pelas mesmas forças ou interações presentes durante a síntese. As vantagens deste modo estão ligadas às várias possibilidades de interações não-covalentes, que garantem maior flexibilidade de aplicação deste tipo de síntese para diferentes moléculas molde, além da facilidade de ligação e de remoção do analito modelo e a possibilidade de utilização de diferentes monômeros funcionais. Entretanto, este tipo de síntese apresenta incompatibilidade com água durante a polimerização e leva a formação de sítios de ligações heterogêneos que, por sua vez leva a formação de sítios seletivos e tamanho de partículas menos uniformes³⁰.

Outra técnica de preparação do MIP é a impressão covalente, na qual o complexo é formado a partir de ligações covalentes entre os monômeros funcionais e a molécula molde antes da polimerização. As principais vantagens desta técnica são a formação de um complexo estável, compatibilidade com água, a reação estequiométrica entre monômeros funcionais e molécula molde e as diversas condições de polimerização³⁰. Como desvantagens, tem-se uma síntese de custo

mais elevado, a lenta liberação e eluição da molécula molde (cinética lenta) durante processos de extração, podendo ser necessários métodos drásticos de remoção, como hidrólise³¹.

Uma terceira técnica de síntese do MIP utiliza a hidridização da impressão covalente e a não-covalente, também chamada de impressão semi-covalente³⁰. Neste processo, a molécula molde é impressa como um complexo estável formado com os monômeros funcionais através de ligações covalentes. Após a síntese, as ligações não covalentes passam a agir com o analito de interesse²⁶. Este tipo combina as vantagens das duas técnicas anteriores.

Na síntese do MIP, a polimerização em “*bulk*”, que ocorre em sistema homogêneo, é o procedimento mais usado. O analito modelo e os monômeros funcionais são inicialmente adicionados ao frasco reacional³⁰. A partir deste ponto, adiciona-se o iniciador radicalar e o reagente de ligação cruzada. Após a dissolução e homogeneização de todos os reagentes, o sistema é purgado com um fluxo de nitrogênio gasoso, visando eliminar o oxigênio presente que pode retardar a reação de polimerização. O iniciador radicalar age sobre os monômeros funcionais aumentando o número de radicais livres no meio, enquanto o agente de ligação cruzada promove a polimerização dos radicais em torno da molécula molde. Ao final da síntese forma-se um monólito, que será posteriormente macerado até atingir o tamanho de partícula desejado. Este processo garante partículas de tamanho homogêneo, porém de formato irregular devido a maceração¹². A molécula molde é então removida através de sucessivas lavagens das partículas do polímero obtido com solvente adequado²⁵. Os principais parâmetros envolvidos na síntese do MIP são razão molar modelo/monômeros funcionais (a quantidade de monômero funcional geralmente é superior a quantidade de molécula molde visando a formação de maior quantidade do complexo molécula molde-monômero funcional), tipo e volume do solvente, proporcionalidade de reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar, tempo de reação (polimerização) e temperatura¹².

O primeiro passo da síntese é a escolha de um monômero funcional que contenha em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir fortemente com o analito de interesse, a fim de formar uma espécie de complexo estável¹⁰. As propriedades físico-químicas a serem consideradas são a interação entre o monômero e a molécula molde (define que tipo de impressão), compatibilidade com o agente de ligação cruzada, solubilidade no solvente utilizado no processo de

impressão e a capacidade de se manterem inerte sob as condições de polimerização aplicadas³³.

Os monômeros funcionais são responsáveis pelas interações estabelecidas nos locais de reconhecimento³⁴. Os locais de reconhecimento são cavidades seletivas em relação ao modelo e permanecem intactos depois da finalização da polimerização¹². Na maior parte dos casos, utiliza-se monômeros funcionais com caráter ácido frente a uma molécula modelo básica, ou vice-versa, visando garantir a complementaridade entre o monômero funcional e o analito e maximizando a impressão do polímero. Na síntese não-covalente é normalmente utilizado excesso de monômeros funcionais em relação à molécula molde para favorecer a reação¹⁰.

O agente de ligação cruzada (cross-linker) atua sobre a morfologia do MIP (polímero do tipo gel, macroporoso ou pó microgel) e estabiliza os locais de ligação capazes de realizar o reconhecimento molecular³³. Este reagente permite um elevado grau de reticulação, de modo a se obter materiais porosos e com estabilidade mecânica elevada³⁴. Diversos agentes de ligação cruzada têm sido usados em impressão molecular com destaque para o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) devido à sua capacidade de formar polímeros térmica e mecanicamente estáveis e por possibilitar rápida transferência de massa durante a síntese³¹.

A principal função do solvente é dissolver os reagentes da síntese, sem, no entanto, interferir na formação do complexo entre os monômeros funcionais e a molécula molde, evitando sítios de ligação poucos seletivos¹⁰. O solvente também é responsável pela formação dos poros em polímeros macroporosos, uma vez que o aumento no volume do solvente permite aumentar o volume dos poros formados³⁴. Polímeros com pequena área superficial e pouco porosos tem baixa capacidade de reconhecimento molecular devido a lenta difusão dos analitos em direção aos macroporos, onde se localizam os sítios seletivos. Desta forma, o uso de um solvente porogênico pode garantir a área superficial e morfologia adequada ao MIP, desde que o solvente não interfira na interação entre molécula molde e o monômero funcional, uma vez que leva a formação de uma maior quantidade de poros por área de polímero¹⁰.

A função do iniciador radicalar é gerar radicais livres no meio reacional, possibilitando o início e a continuação da reação de polimerização¹⁰. O iniciador a ser utilizado na síntese deve ser escolhido de forma que seu tempo de meia vida permita que a concentração do iniciador seja capaz de manter a quantidade de radicais livres

constante no meio reacional³⁵. Também é necessário promover a eliminação do oxigênio presente no ambiente de síntese, pois pode haver excesso na produção de radicais livres e prejudicar a polimerização²⁵. Os primeiros radicais podem ser formados por estímulos físicos, como aumento de temperatura ou incidência de radiação UV, dando início à reação entre as substâncias envolvidas na polimerização³⁰. Entretanto, estes fatores não podem afetar os demais reagentes da síntese, decompondo-os. Variações bruscas na temperatura podem levar a formação descontrolada de radicais livres em solução interferindo na quantidade de cavidades formadas³³. A polimerização ocorre até a formação de uma ligação covalente inativa, seja pela interação entre dois radicais livres ou pela presença de oxigênio no meio³⁵.

A técnica de impressão molecular tem sido empregada em diversas áreas, em etapas de separação e concentração de analitos em diferentes amostras, com destaque para a extração em fase sólida (SPE)²⁵. O emprego dos MIP como materiais sorventes na extração em fase sólida oferece alto grau de seletividade e são mais estáveis quando comparados a sorventes como as resinas de troca iônica e a sílica modificada³⁵. Um procedimento de SPE consiste na passagem lenta de um líquido através de um meio sorvente disposto em cartuchos, onde analito é seletivamente retido. Em seguida, realiza-se uma etapa de limpeza com um solvente adequado, no intuito de extrair as espécies interferentes mantendo-se a ligação com as moléculas de interesse¹⁰. Esta etapa é necessária pois durante a reação de polimerização, há também a formação de sítios não específicos onde os interferentes podem ficar retidos. Na etapa final ocorre a eluição (etapa de extração) do analito, já na ausência dos interferentes³⁶.

A utilização do MIP na área de preparo de amostras e a utilização destes polímeros na extração em fase sólida apresenta um rápido aumento, basicamente devido ao caráter seletivo dos MIP bem como as vantagens da técnica de extração.

2.3 ELETROFORESE CAPILAR: CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR

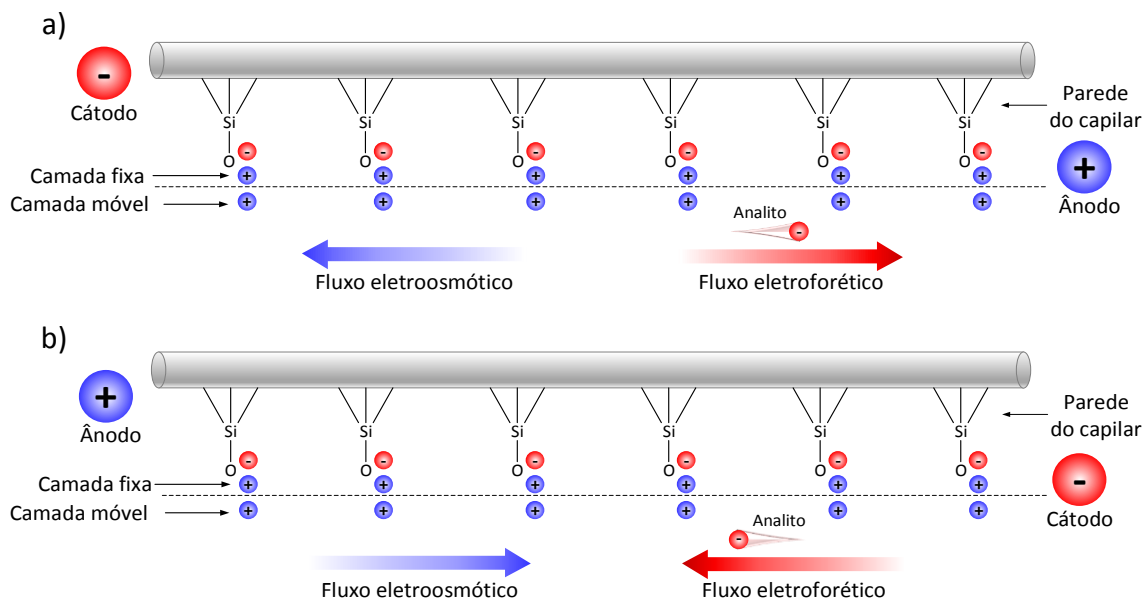
A CE é uma moderna técnica analítica que permite a separação rápida e eficiente de compostos com cargas elétricas presentes em pequenas quantidades de amostra³⁷. Nesta técnica a separação dos componentes da amostra ocorre pelo

deslocamento do soluto carregado eletricamente ou neutro, no interior de um capilar de sílica, preenchido com um eletrólito adequado, mediante aplicação de um campo elétrico³⁸. No método convencional, a amostra está contida em reservatórios onde também se localizam eletrodos de platina ou ouro, responsáveis por fazerem o contato elétrico entre o capilar de sílica e a fonte de alta voltagem. A injeção da amostra no sistema ocorre no ânodo sendo carregada até o cátodo através do fluxo eletrosmótico, gerado por cargas negativas presentes na parede interna do capilar³⁹. Os íons migram na direção do cátodo ou do ânodo em função de sua carga e a separação ocorre devido às diferenças de mobilidade dos compostos, da razão carga/volume das espécies e de fatores estruturais⁴⁰. O detector, que pode ser de diferentes tipos, encontra-se na extremidade oposta onde ocorre a injeção da amostra³⁷.

Geralmente, são utilizados capilares de sílica fundida com diâmetro interno de 20 a 100 μm , recobertos externamente com uma camada de poliimida, que garante certa flexibilidade ao capilar. Também é comum a utilização de capilares fabricados com material polimérico⁴¹. Capilares com diâmetro interno de 50 μm oferecem melhor resolução do que a obtida com capilares de 100 μm de diâmetro, devido à melhor dissipação do calor gerado no interior do capilar de menor diâmetro, permitindo que o potencial elétrico aplicado seja maior, conseqüentemente aumentando a velocidade de separação^{42,43}.

Na superfície interna do capilar, os grupos silanois ($\text{pK}_a \sim 4,5$)⁴⁴, presentes nas paredes de sílica, sofrem dissociação quando em contato com o meio aquoso com pH acima de 3, tornando a superfície carregada negativamente, enquanto que os íons H^+ liberados, são transferidos para a solução que preenche o capilar (Figura 6). Quando o potencial é aplicado estes cátions migram em direção ao cátodo e, ao migrarem, induzem o aparecimento do fluxo eletrosmótico no capilar⁴⁵.

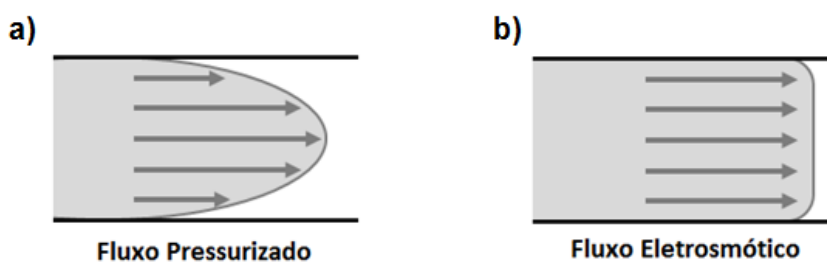
Figura 6 - Representação da migração de ânions em EC.



Fonte: do autor, 2016.

Uma das principais diferenças entre a CE e outras técnicas de separação é o perfil linear de migração⁴⁰. O fluxo eletromótico gerado pela ionização dos grupos silanóis faz com que as forças componentes da velocidade eletrosmótica sejam iguais para os analitos presentes em solução em qualquer região do capilar. Já o fluxo pressurizado, como por exemplo o presente em análises por HPLC, apresenta um perfil parabólico, sendo que nesta configuração os analitos migram com maior velocidade na região central do capilar, diminuindo a eficiência de separação e levando ao alargamento dos picos (Figura 7)⁴⁶.

Figura 7 - Representação do perfil de migração no interior de um capilar mediante a) fluxo pressurizado, b) fluxo eletrosmótico.



Fonte: do autor, 2016.

A introdução da amostra no capilar pode ser feita através de duas técnicas. Na injeção hidrodinâmica, a aplicação de vácuo no reservatório contendo o eletrólito de corrida ou pressão no reservatório contendo a amostra, por certo período de tempo, faz com que pequenas quantidades de amostra entrem no capilar, por transferência de volume⁴⁷. Na injeção eletrocinética, a migração dos componentes presentes na amostra para o interior do capilar ocorre pela aplicação de um potencial elétrico no recipiente contendo a amostra, por alguns segundos⁸. Neste método, a amostra injetada depende da relação carga/massa dos solutos presentes⁴⁸.

A CE é considerada uma técnica versátil uma vez que a mesma instrumentação pode ser utilizada para uma série de técnicas baseadas em diferentes princípios de separação, tais como eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), eletroforese capilar em gel (CGE), eletroforese capilar por focalização isoeétrica (CIEF) e a eletrocromatografia capilar (CEC). Além do tipo de separação, estas técnicas se diferenciam pela diversidade de compostos que podem ser analisados em cada modo^{49,37}.

A MEKC é uma técnica eletroforética, desenvolvida na década de 90 por Shigeru Terabe, que amplia as possibilidades de aplicações da CE. Nesta técnica, a separação ocorre baseada na interação dos analitos com certos aditivos, formando uma fase micelar dispersa que se move com velocidade diferente dos demais componentes da solução⁴⁹. Oferece maior seletividade a uma ampla gama de compostos, englobando a separação de substâncias neutras e iônicas⁵⁰. Esta técnica tem, portanto, como característica principal a adição ao eletrólito utilizado nas corridas de uma substância surfactante, ou seja, substância que apresenta caráter hidrofílico e hidrofóbico⁵¹.

Deste modo, a MEKC difere-se das demais técnicas por utilizar uma solução micelar iônica em vez da solução de tampão salino⁵². Estas soluções podem solubilizar compostos hidrofóbicos, devido a capacidade das micelas em interagir com os analitos através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas^{53,37}. Cabe ressaltar que os agentes surfactantes (ou tensoativos) devem ser solúveis na solução tampão, de modo a formar as micelas e a solução micelar deve ser homogênea, transparente no UV-vis e de baixa viscosidade⁵⁴.

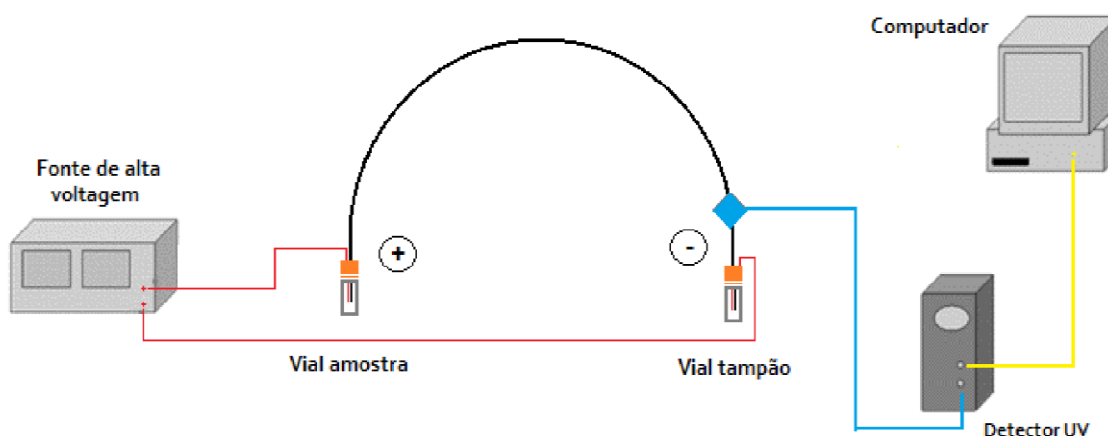
O princípio de separação dos analitos por MEKC baseia-se na formação de micelas que interagem com os analitos, criando um sistema cromatográfico de duas fases, no qual o eletrólito corresponde à fase que sofre ação do fluxo eletrosmótico

(fase primária) enquanto as micelas representam a fase transportada pela combinação do fluxo eletrosmótico e eletroforético (fase pseudo-estacionária)^{37,50,55}.

Surfactantes catiônicos podem ser utilizados em MEKC para reverter a carga dos grupos silanóis ($pK_a \sim 4,5$) presentes na superfície interna do capilar que, em contato com tampões de pH maiores que 3, encontram-se carregados negativamente⁴⁵. Estes surfactantes, positivamente carregados, interagem com os grupos silanóis carregados negativamente através de atrações eletrostáticas. Em concentrações maiores que 0,4 mM de surfactantes, ocorre a formação de uma dupla camada pela interação das partes hidrofóbicas e, neste caso, a parte catiônica está voltada ao eletrólito que preenche o capilar, promovendo a inversão de carga na parede interna e consequentemente a inversão do fluxo eletrosmótico⁵⁰.

A MEKC, assim como as demais técnicas relacionadas à EC, permite a utilização de um grande número de detectores, podendo ser de absorção no UV-Vis, método de detecção mais comumente empregado (Figura 8), fluorescência, espectrometria de massas, condutividade, amperometria dentre outros. A escolha do detector adequado deve levar em consideração as propriedades do componente a ser analisado e a concentração deste⁴⁸.

Figura 8 - Representação esquemática do sistema de EC.



Fonte: do autor, 2016

As principais vantagens das diferentes técnicas de EC são a alta resolução, baixo consumo de amostra, rapidez na análise e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo⁵⁶. A utilização de capilares de sílica de diâmetro interno reduzido oferece ainda inúmeras vantagens à EC quando comparadas a eletroforese em gel ou em

papel, por exemplo. O capilar permite a redução do efeito Joule, permitindo uma eficiente dissipação do calor e permite a aplicação de altas voltagens, resultando em separações de alta eficiência^{37,40,56}.

Constitui um método de análise relativamente barato, na qual os capilares apresentam alta durabilidade e capacidade de reutilização sem perda de suas características. A CE também permite a separação de compostos iônicos e não-iônicos, polares ou apolares, bem como de moléculas com pesos moleculares variados^{48,57}.

Uma das desvantagens mais comuns em CE é o entupimento do capilar de sílica, sendo muitas vezes necessário recorrer a filtração prévia das amostras em filtros de diâmetro reduzido^{58,59}.

Outras desvantagens relacionadas a CE muitas vezes estão relacionadas ao método de detecção. No caso de detecção por UV-vis, por exemplo, o caminho óptico reduzido limita a sensibilidade da detecção, uma vez que a absorção é função do diâmetro do capilar (Lei de Lambert-Beer)⁶⁰. Quando da utilização de detecção por UV-vis, também pode ser necessário a utilização de ânions cromóforos, devido ao fato da maioria dos solutos aniônicos de baixo peso molecular não exibirem sinal detectável^{45,61}. Neste caso, pode ocorrer aumento do ruído na análise relacionado a concentração do agente cromóforo⁶⁰.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho proposto foram divididos em gerais e específicos e são listados a seguir.

3.1 GERAIS

- a) Desenvolvimento de um método analítico a ser aplicado na área de análise de metabólitos de solventes orgânicos em amostras biológicas de trabalhadores expostos;
- b) Aplicar a tecnologia de impressão molecular na área de Toxicologia Analítica, através da síntese e aplicação de MIP na análise de metabólitos de solventes orgânicos.
- c) Aplicar os polímeros de impressão molecular no preparo de amostras complexas, oriundas de trabalhadores expostos a solventes orgânicos;
- d) Promover a separação dos analitos de interesse utilizando a cromatografia eletrocínética micelar;
- e) Quantificar os metabólitos definidos, pela NR 7, como indicadores biológicos de exposição aos solventes orgânicos xileno e tolueno, em amostras biológicas;
- f) Aplicar a metodologia desenvolvida para o preparo de amostras, separação por MEKC e quantificação de ácido hipúrico e ácido metil-hipúrico em amostras de urina de trabalhadores expostos solventes orgânicos.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar um MIP seletivo aos metabólitos ácido hipúrico e ácido metil-hipúrico, tendo como molécula molde o AMH;

- b) Verificar a seletividade do MIP para os metabólitos desejados, quando comparado com a utilização do polímero não impresso;
- c) Caracterização dos polímeros sintetizados por diferentes técnicas;
- d) Confeccionar um novo modelo de extrator em fase sólida, descartável que permita a extração dos analitos de interesse de forma miniaturizada e elimine a etapa final de lavagem;
- e) Otimizar condições experimentais para a extração de ácido hipúrico e ácido metil-hipúrico de amostras de urina.
- f) Avaliar o melhor padrão interno a ser utilizado na correção dos possíveis desvios;
- g) Otimizar as condições experimentais para separação e quantificação dos metabólitos por MEKC;
- h) Realizar a quantificação da creatinina, substância endógena, que permite a correção dos metabólitos;
- i) Validar a metodologia, de acordo com estabelecido pela RDC nº 27, de 17 de maio de 2012;
- j) Aplicar a metodologia desenvolvida a amostras reais, oriundas de trabalhadores expostos aos solventes orgânicos, xileno e tolueno.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, os materiais e metodologias utilizados a cada etapa do trabalho são apresentados. Os equipamentos, reagentes, o preparo das soluções, caracterizações e análises quantitativas estão detalhadamente relatados.

4.1 EQUIPAMENTOS

A síntese do MIP foi realizada em banho termostático (B. Braun Biotech International, Frigomix B 10014845) a fim de manter a temperatura constante durante todo o processo. As sucessivas lavagens do MIP após a síntese e maceração contou com auxílio do agitador vórtex (Thermolyne Maxi Mix, M37615) e centrífuga (Nova Técnica, NT-811) para separação do sólido e sobrenadante.

Os reagentes analíticos utilizados, após pesagem (balança analítica Kern 410), foram solubilizados em solvente adequado com auxílio do banho ultrassom (Unique Ultra Cleaner, USC-2800 A) O ajuste do pH dos padrões e soluções tampão foi acompanhado do uso de instrumento medidor (pHmetro MS Tecnoyon, mPA 210).

O equipamento de EC, *homemade*, é equipado com espectrofotômetro na região do infra-vermelho (OceanOptics USB 2000+) e fonte de alta tensão CZE 30PN2000, voltagem máxima 30Kv, corrente máxima 0,3mA (Spellman®).

4.2 REAGENTES E PADRÕES

A solução tampão foi preparada com os seguintes reagentes de qualidade analítica: tetraborato de sódio (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e hidróxido de potássio (Vetec®, São Paulo, Brasil) e água deionizada ($>18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$), obtida do sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford, EUA).

Para verificar a influência da concentração do tampão na separação dos analitos foram testadas duas concentrações, sendo estas de 25 mmol L^{-1} e

50 mmol L⁻¹, utilizando o brometo de CTAB, como inversor de fluxo eletrosmótico, em concentração constante de 0,5 mmol L⁻¹.

Para a síntese do MIP, utilizou-se ácido metil hipúrico, como molécula modelo, 4-vinilpiridina, como monômero funcional, ácido 4,4'-azobis 4-cianoaléico, como iniciador radicalar, etileno glicol dimetacrilato, como agente de ligação cruzada, e metanol (todos da Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha). Também foram utilizados como padrões ácido hipúrico (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), ácido vanílico e ácido 3-hidroxibenzóico (Acros®, Waltham, EUA), como padrões internos (PI). As soluções foram preparadas utilizando como solvente tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 10, com concentração de CTAB de 0,5 mmol L⁻¹. Esta solução teve concentração de ácido hipúrico e ácido metil hipúrico de 5 g L⁻¹ e a concentração de cada padrão interno foi de 2 g L⁻¹.

4.3 AMOSTRAS

Mediante aprovação do Comitê de Ética (CAAE 38738114.2.0000.5142), as amostras de urina foram provenientes de 10 doadores, estudantes e funcionários da Universidade Federal de Alfenas. Para otimização das variáveis do sistema foi utilizado um pool de urina de voluntários de ambos os sexos, não expostos aos solventes orgânicos tolueno e xileno. As amostras para otimização das condições de extração foram preparadas em urina de indivíduos não expostos fortificadas com concentrações de 0,5 g L⁻¹ a 5,0 g L⁻¹ de ácido hipúrico e ácido metil hipúrico, bem como de padrão interno ácido 3-hidroxibenzóico na concentração de 1,0 g L⁻¹. As amostras foram diretamente submetidas ao processo de extração sem nenhum preparo prévio.

4.4 METODOLOGIA

A metodologia inclui o protocolo utilizado na síntese dos materiais, as etapas de confecção da fibra extratora, a caracterização dos polímeros, a otimização das variáveis do sistema de MEKC, validação e quantificação da creatinina.

4.4.1 Síntese MIP

A síntese do MIP foi realizada em “*bulk*”, método no qual todos os reagentes utilizados são adicionados ao frasco reacional ao mesmo tempo, obedecendo certa ordem de adição³². A síntese, realizada com o mínimo de solvente possível, dá origem a um monólito, posteriormente macerado e tamizado.

Os reagentes utilizados na síntese foram: metanol, como solvente (11 mL); ácido metil hipúrico, como molécula modelo (2,041 mmol); 4-vinil piridina, como monômero funcional (8,39 mmol); etileno glicol dimetacrilato, como agente de ligação cruzada (0,688 mmol) e ácido 4,4'-azobis 4-cianoaléico, como iniciador radicalar (1,53 mmol).

Os reagentes foram solubilizados em um frasco âmbar de 100 mL e em seguida a mistura reacional foi submetida a um fluxo de nitrogênio (vazão 5 L min⁻¹), durante 10 min, a fim de retirar o oxigênio presente, evitando o consumo posterior dos radicais livres. O frasco reacional foi selado e colocado em banho-maria a 75 °C, mantido a temperatura constante, por 24 h.

Após o tempo de síntese, o polímero formado foi triturado em almofariz e peneirado em tamises para selecionar a granulometria entre 106 e 75 µm. Em seguida, o polímero foi mantido em estufa a 70 °C, por 3 h, para secagem do material.

Obteve-se cerca de 3,0 g de polímero seco com a granulometria desejada. Esta quantidade foi dividida em 8 tubos Falcon de 15 mL, cada um contendo aproximadamente 0,4 g do polímero, e posteriormente submetida à sucessivas lavagens com solução de metanol e ácido acético na proporção 9:1 para retirar resíduos dos reagentes utilizados na síntese. O tubo contendo o polímero foi agitado

por 30 segundos em Vortex, levado ao ultrassom por uma hora e centrifugado por 15 minutos a 537 g ($r=12$ cm).

A solução de lavagem, após centrifugação, foi filtrada e analisada por espectrofotometria. Foi feita uma varredura abrangendo todos os comprimentos de onda do ultravioleta e visível, sendo a solução metanol:ácido acético 9:1 utilizada como branco. As lavagens foram realizadas até que a solução de lavagem filtrada (metanol:ácido acético) não apresentasse sinal em nenhum comprimento de onda, especialmente na região de detecção dos analitos (216 a 228 nm). Após as lavagens, o MIP limpo foi seco a temperatura ambiente e utilizado na confecção das fibras extratoras.

4.4.2 Síntese NIP

O NIP consiste em um polímero não impresso cuja síntese não utiliza a molécula modelo, ou seja, ocorre a polimerização sem que haja a formação de cavidades moleculares criadas pela molécula molde.

A síntese do NIP foi realizada nas mesmas condições do MIP, seguindo todas as etapas de modo equivalente até a lavagem. Após as lavagens, o NIP também foi seco a temperatura ambiente e foi utilizado na confecção das fibras extratoras.

4.4.3 Confecção da fibra extratora

A confecção de um extrator em fase sólida visava rapidez no preparo das amostras e extração dos analitos de interesse (AH e AMH) de amostras de urina de forma seletiva. O extrator confeccionado teve como base um capilar de vidro neutro (Figura 9), utilizado na determinação de micro-hematócrito (marca Perfecta®, com 75 mm de comprimento, diâmetro interno de 1 mm e diâmetro externo de 1,5 mm). Para a confecção do capilar extrator, a extremidade oposta onde o MIP seria depositado foi fechada com aquecimento em Bico de Bunsen.

Figura 9 - Capilar de vidro neutro utilizado na confecção do capilar extrator.



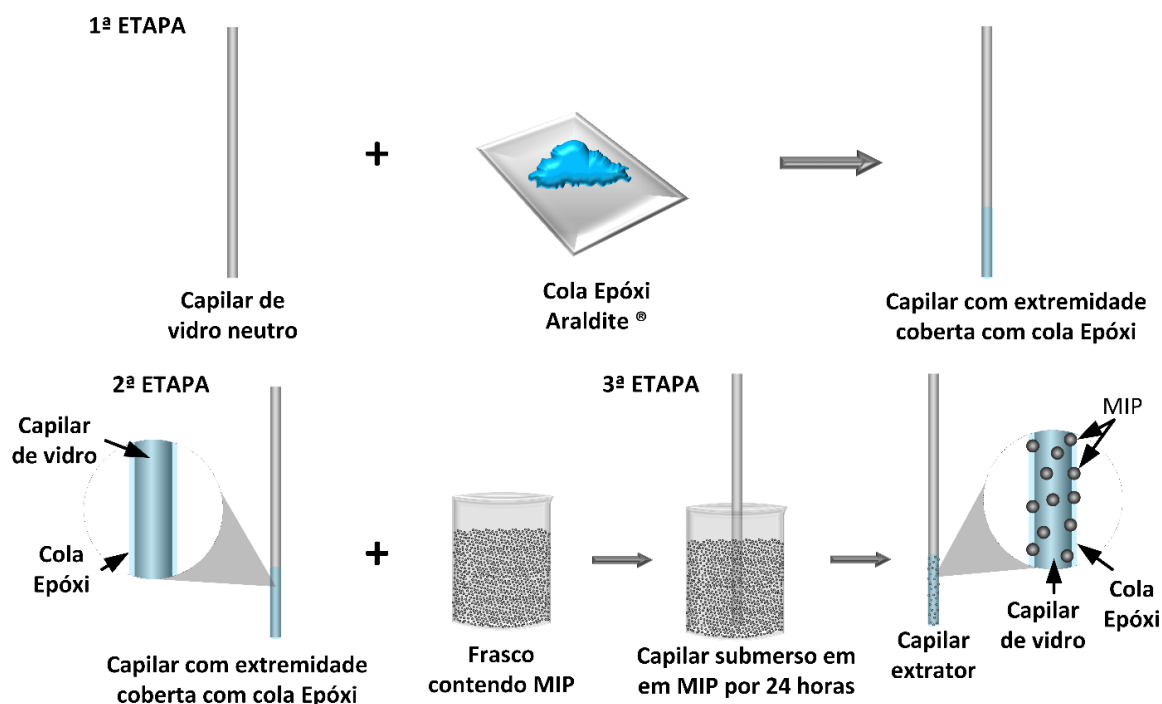
Fonte: Perfecta®

O MIP sintetizado foi depositado em cerca de 1,5 cm da extremidade externa do capilar de vidro utilizando cola epóxi (Araldite® Hobby). O processo de confecção do capilar de MIP (Figura 10) consiste em três etapas:

- 1- Após fechar a ponta do capilar no Bico de Bunsen, 1,5 cm da extremidade do capilar, oposta à extremidade fechada, foi revestida com cola epóxi (mistura feita com a mesma quantidade de cada um dos ingredientes da cola);
- 2- O capilar com a cola foi revestido com o MIP sólido e seco, já pulverizado e com tamanho de partícula selecionado, em movimentos circulares, para evitar a formação de grumos e buscando uma cobertura homogênea;
- 3- A fibra permaneceu submersa no frasco contendo as partículas de MIP por 24 h, até secagem completa da cola.

A fibra extratora, após a finalização e secagem completa da cola, é constituída por aproximadamente 0,0017 g de cola epóxi e 0,0039 g de polímero.

Figura 10 - Etapas da confecção da fibra extratora



Fonte: do autor, 2016.

As fibras extratoras de NIP foram confeccionados seguindo as mesmas etapas de confecção que as fibras extratoras de MIP.

O tipo de configuração do capilar de MIP permitiu que sua utilização na extração dos analitos de interesse ocorresse de forma única, ou seja, após as etapas de extração e dessorção dos analitos, o capilar pode ser descartado, eliminando assim a etapa de lavagem.

O custo estimado por fibra extratora confeccionada é de 0,16% do valor total dos reagentes utilizados na síntese dos polímeros, correspondendo a aproximadamente a \$0,64.

4.4.4 Caracterização do MIP e NIP

Ambos os materiais foram caracterizados através de análises de infravermelho (FT-IR), termogravimetria (TG) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os espectros de IV para as amostras, foram obtidos, na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , em espectrofotômetro Nicolet iS50 FT-IR – Thermo Scientific, modo ATR, com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} e contato direto da amostra sob o cristal (feixe de infravermelho). Os espectros foram com adição da amostra diretamente ao equipamento, sem tratamento prévio.

A análise termogravimétrica foi realizada em atmosfera de ar sintético, com vazão de 100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo a temperatura máxima de 1000 $^{\circ}\text{C}$. Utilizou-se equipamento SDT Q600 V20.9 Build 20 (TA Instruments).

As características morfológicas dos polímeros foram analisadas MEV, utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura Hitachi Analytical Table Top Microscope TM3000 com voltagem de 15 kV.

4.4.5 Processo de extração e dessorção com a fibra extratora

O procedimento de extração consistiu em submergir a fibra extratora em 1,5 mL de amostra por sete minutos; sendo que, após este tempo o capilar foi submerso em água por 5 segundos (tempo fixo) para lavagem da fibra extratora.

Para a dessorção dos analitos, a fibra recém lavada em água, era submergido em um *insert* de vidro contendo 200 μL da solução tampão (eletrólito) utilizada na corrida eletroforética, ou seja, o tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10 contendo 0,5 mmol L^{-1} de CTAB. O tempo estabelecido para a dessorção também foi de sete minutos.

4.4.6 Condições de otimização das variáveis do sistema

A otimização das variáveis do sistema de MEKC teve como objetivo promover a separação dos analitos aliado ao menor tempo de eluição.

4.4.6.1 Configuração de método de detecção

Em relação ao método de detecção, utilizou-se o espectrômetro OceanOptics® USB 2000+, UV-Vis cujas configurações permitem conexão da fibra óptica ao sistema de separação garantindo flexibilidade ao sistema de análise proposto. Este modelo comercial possui detector Sony ILX511B (*2048-element linear silicone CCD array*), faixa de detecção variando entre 200 e 1100 nm e resolução óptica de aproximadamente 0,1 nm.

O software do espectrômetro permitiu o ajuste de variáveis, como o tempo de integração (*integration time*) e a média das varreduras (*scans to average*) a fim de aumentar a sensibilidade, promover melhorias no sinal analítico e a minimização do ruído. O tempo de integração foi ajustado em 100 milissegundos e corresponde a somatória da luz detectada em um certo período de tempo enquanto a média dos *scans* foi ajustada para 4, correspondendo ao número de médias feitas a partir das aquisições feitas pelo software.

4.4.6.2 Análise do campo elétrico ideal

O sistema de MEKC utiliza um capilar de sílica fundida, revestido externamente com poliimida, exceto na janela de detecção, de 75 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno. A injeção da amostra ocorre na extremidade oposta àquela onde se encontra o detector.

Foram realizados testes para verificação do campo elétrico ideal de amostragem e de corrida. As diferenças de potencial aplicadas variaram entre -2 e -8 kV para a etapa de amostragem e de -10 a -16 kV para a corrida eletroforética. O objetivo foi verificar em qual combinação destes potenciais era possível obter a melhor separação entre os picos dos analitos. Todas as combinações possíveis foram testadas, sendo realizados 16 testes ao todo.

Para estes testes foram preparadas soluções padrões contendo 5 g L⁻¹ de cada um dos analitos, ácido hipúrico e ácido metil hipúrico, tendo como solvente o próprio

tampão de corrida, ou seja, tetraborato de sódio pH 10 com concentração de 50 mmol L⁻¹ e CTAB em concentração 0,5 mmol L⁻¹.

4.4.6.3 Testes de concentração do tampão

A literatura relata o uso de tampões tetraborato de sódio com concentrações variando entre 20 e 50 mmol L⁻¹ ¹⁷, sendo algumas vezes necessária a adição de uma substância capaz de inverter o fluxo eletrosmótico⁵⁵.

Para verificar a influência da concentração do tampão utilizado no preparo das soluções e na corrida eletroforética na separação dos analitos foram testadas duas concentrações, sendo estas de 25 mmol L⁻¹ e 50 mmol L⁻¹, ambas em pH 10, mantendo a concentração de CTAB em 0,5 mmol L⁻¹.

Os padrões de ácido hipúrico e ácido metil hipúrico foram preparados na concentração de 5 g L⁻¹ com o tampão de 25 mmol L⁻¹ e também com o tampão de 50 mmol L⁻¹ pH 10. Também foram realizados testes variando a concentração do tampão de corrida, utilizando os mesmos tampões mencionados.

As corridas eletroforéticas também foram realizadas utilizando cada um dos tampões de concentrações diferentes citados. Todas as combinações permitidas foram testadas.

4.4.6.4 Avaliação dos padrões internos

O ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico) e o ácido 3-hidroxibenzóico foram testados como padrões internos. As soluções foram preparadas utilizando como solvente tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 10, sendo a concentração de CTAB de 0,5 mmol L⁻¹.

Nesta etapa, as soluções utilizadas tiveram concentração de ácido hipúrico e ácido metil hipúrico fixa de 5,0 g L⁻¹ e a concentração testada de cada padrão interno foi de 2,0 g L⁻¹.

4.4.6.5 Testes do tempo de extração e dessorção

O tempo ideal de extração com o capilar extrator é aquele em que há equilíbrio entre a concentração dos analitos e padrão interno na solução e na fibra revestida com MIP, enquanto o tempo de dessorção busca a migração completa dos compostos da fibra para a solução de tampão (solução de eluição).

Para a realização destes testes, as soluções padrão foram preparadas em urina para verificar o efeito de matriz existente. Inicialmente, soluções estoque contendo 50 g L^{-1} ambos os analitos e uma solução contendo também 50 g L^{-1} do padrão interno foram preparadas em metanol. Volumes de $200 \text{ }\mu\text{L}$ foram pipetados da solução estoque contendo os analitos de interesse e $100 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque do padrão interno e transferidas para um balão volumétrico de 5 mL , a fim de preparar uma solução contendo 2 g L^{-1} dos analitos e 1 g L^{-1} do padrão interno.

Após a pipetagem, procedeu a evaporação do solvente utilizando fluxo de nitrogênio (vazão de 1 g L^{-1}) e, em seguida, o volume final de 5 mL foi completado com urina proveniente de doadores não expostos.

4.4.7 Validação

Durante a validação, os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão, baseados nas diretrizes da Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da Anvisa⁶³. Utilizou-se um pool de urina obtido pela mistura de dez amostras de indivíduos que se declararam não expostos a tolueno e xileno, a fim de corrigir e de compensar o efeito da matriz no processo de extração das amostras.

A linearidade foi estudada através da análise, em sextuplicata, de amostras de urina fortificadas com soluções padrões de ácido hipúrico e ácido metilhipúrico nas concentrações de $0,5$; $1,0$; $2,0$; $3,0$; $4,0$ e $5,0 \text{ g L}^{-1}$. O limite de quantificação (LQ) foi determinado considerando o menor valor quantificado com precisão e exatidão. A precisão e exatidão intra e interdias foram avaliadas por meio de amostras de urina

fortificadas com padrões de ácido hipúrico e ácido metilhipúrico em concentrações de 0,5; 2,0; e 5,0 g L⁻¹ analisadas em triplicata.

Também foi analisada a reprodutibilidade do processo de fabricação da fibra a partir de dez análises consecutivas. A recuperação da extração foi avaliada comparando-se o resultado analítico das amostras extraídas, com o resultado obtido com solução padrão não extraída, representando 100% de recuperação.

4.4.8 Quantificação da creatinina

A correção pela creatinina corresponde à razão entre a substância ou metabólito analisado e a substância endógena³. A quantificação da creatinina urinária é feita a partir da reação de Jaffé, reação colorimétrica, na qual a creatinina reage com ácido pícrico em condições alcalinas, formando um complexo de cor, lido a 510 nm. A intensidade de formação da cor é proporcional a creatinina na amostra^{64,65}.

A creatinina foi quantificada através do método colorimétrico, utilizando o equipamento Lab Test – Lab Max Pleno (Diagnóstica S/A), utilizando 40 µL de urina (amostra) e 10 µL de água destilada. Após a diluição, as cubetas contendo as amostras são posicionadas no equipamento que procede a alcalinização do meio. Em seguida, a adição do agente colorimétrico, feita de forma automatizada, permite a formação do complexo de cor, proporcional à concentração de creatinina na amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão deste trabalho, referentes aos polímeros sintetizados e a fibra extratora, variáveis do sistema de MEKC e análise de padrões e amostras são apresentados a seguir.

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

As sínteses dos polímeros mostraram-se reprodutíveis e eficientes, com rendimentos acima de 85% para ambos os materiais. Obteve-se cerca de 6,65 g do MIP e aproximadamente 6,73 g do NIP, o que permitiu a confecção de mais de 1000 fibras extratoras de cada polímero.

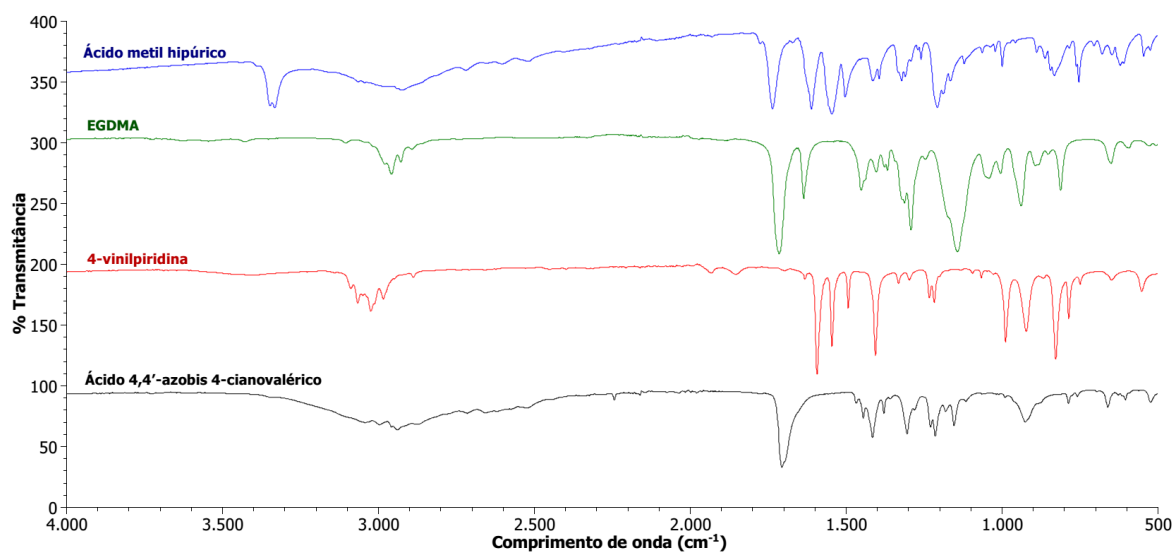
Os polímeros foram caracterizados por análises de infravermelho (FT-IR), termogravimetria (TG) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A caracterização análise por FT-IR teve por objetivos verificar a ausência ou presença de resíduos da molécula molde, no caso do MIP, bem como identificar algumas características estruturais dos polímeros e dos reagentes de síntese.

Os espectros FT-IR referentes aos reagentes utilizados na síntese são mostrados na Figura 11.

A molécula molde, ácido metil hipúrico, apresenta bandas referentes a C=O de amida em 1737 cm^{-1} . Entre 3348 e 3333 cm^{-1} são observadas bandas características de N-H de amida e também O-H de ácido carboxílico. As bandas referentes ao estiramento C-H aromático aparecem entre 3065 a 2922 cm^{-1} e em 1612 e 1414 cm^{-1} as bandas características de C=C aromático. Observa-se em 1208 cm^{-1} , a banda característica da ligação C-N.

Figura 11: Espectros FT-IR referentes aos reagentes utilizados nas sínteses dos polímeros.



Fonte: Do autor, 2016.

Para a 4-vinilpiridina as bandas na região entre 3089 a 2984 cm^{-1} referem-se a estiramento C-H aromático, enquanto na região entre 1594 a 1406 cm^{-1} observa-se bandas referentes a C=C aromático e C=N. Em menores comprimentos de onda, 900 a 600 cm^{-1} , os sinais são referentes ao desdobramento fora do plano da ligação C-H aromático.

Bandas na região de 3045 a 2880 cm^{-1} , observadas do espectro de FTIR do ácido 4,4'-azobis 4-cianoaléico, referem-se ao estiramento O-H de ácido carboxílico. Em 2244 cm^{-1} , as bandas mostradas são características da ligação tripla entre carbono e nitrogênio (nitrila). Em 1223 cm^{-1} , observa-se a banda referente ao estiramento C-N e, em 1416 e 1305 cm^{-1} as bandas características do desdobramento de CH_3 . A banda referente a C=O de ácido carboxílico aparece em 1706 cm^{-1} .

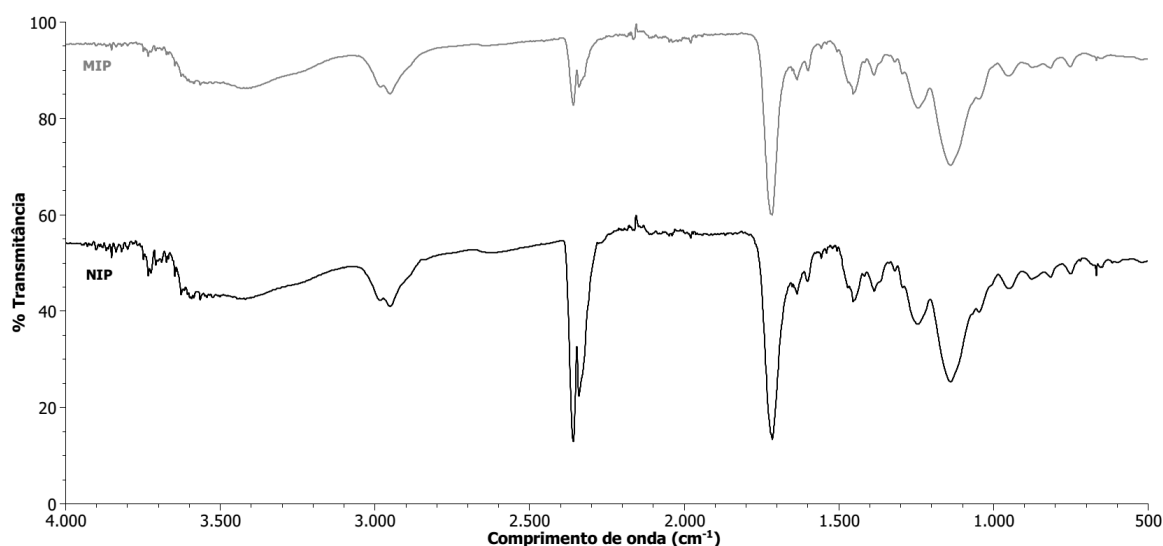
Para o etileno glicol dimetacrilato, observa-se bandas mais evidentes na região de 1715 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de C=O do grupo éster e, a 1143 cm^{-1} banda correspondente a deformação axial de C-O de éster. A banda em 1636 cm^{-1} refere-se à ligação C=C de alceno. As bandas entre comprimentos 2980 a 2929 cm^{-1} são características do estiramento C-H não aromático.

Na Figura 12 pode-se ver os espectros FTIR para o MIP e NIP sintetizado. Em relação às bandas características do MIP observa-se, na região de 3494 cm^{-1} , banda referente ao O-H de ácido carboxílico do agente de ligação cruzada ou oriundo do

solvente metanol. Na região entre 2984 e 2974 cm^{-1} , nota-se bandas correspondentes ao estiramento C-H do iniciador radicalar ou reagente de ligação cruzada. A banda em 1719 cm^{-1} remete a carbonila de éster, estando ligeiramente deslocada a valores menores devido a dupla conjugada, existente no agente de ligação cruzada. Em 1455 cm^{-1} , observa-se banda referente ao desdobramento de CH_3 . A banda correspondente ao estiramento C-N, proveniente do ácido 4,4'-azobis 4-cianovalérico, aparece em 1250 cm^{-1} . Banda referente ao estiramento de C-O de álcool, éster ou ácido carboxílico é observada em 1139 cm^{-1} .

Para o NIP foram observadas bandas semelhantes às do MIP. Porém, para o polímero não impresso, algumas apresentaram pequenos deslocamentos em relação às bandas observadas no MIP. A banda correspondente ao estiramento O-H do agente de ligação cruzada aparece em 3538 cm^{-1} . Em 1716 cm^{-1} , observa-se banda referente a C=O de éster e ácido carboxílico. Os desdobramentos de CH_3 são vistos em 1456 e 1386 cm^{-1} para o NIP. Já as bandas correspondentes ao estiramento C-N e C-O são observadas na mesma região que para o MIP.

Figura 12 - Espectros FT-IR dos polímeros sintetizados



Fonte: Do autor, 2016.

De modo geral, valores de comprimento de onda (cm^{-1}) dos reagentes e polímeros são descritos na Tabela 1.

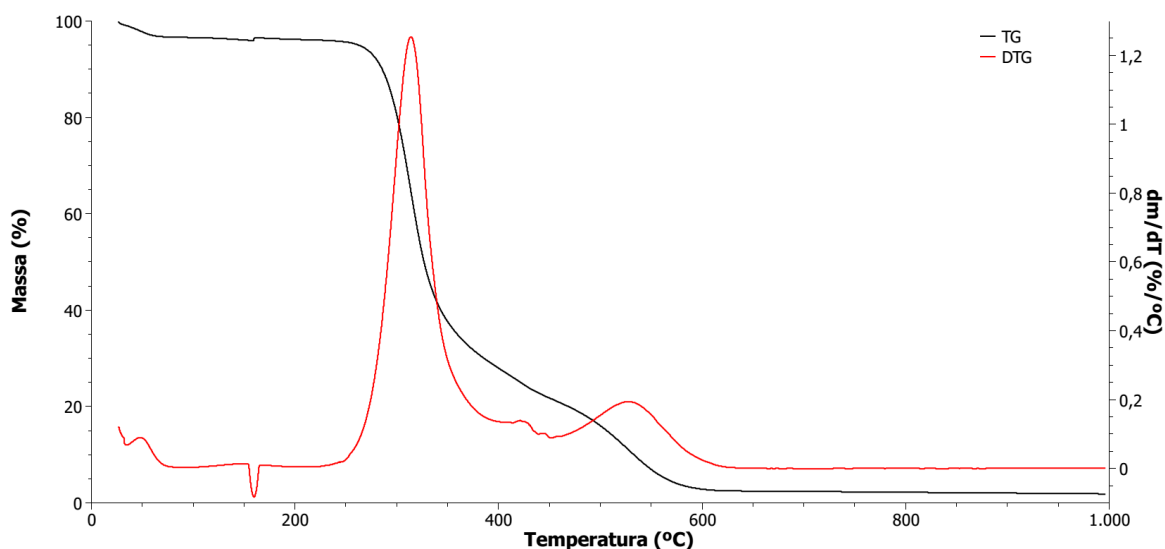
Tabela 1 - Principais atribuições de comprimento de onda nos espectros FT-IR.

Substância	Principais atribuições	Comprimento de onda (cm ⁻¹)
Ácido metilhipúrico	C=O	1737
	N-H	3348
	O-H	3333
	C-H aromático	3065 a 2922
	C=C aromático	1612 a 1414
	C-N	1208
4-vinilpiridina	C-H aromático	3089 a 2984
	C=C aromático	1594 a 1406
	C=N	1594 a 1406
	C-H aromático	900 a 600
Ácido 4,4'-azobis 4-cianovalérico	O-H ácido carboxílico	3045 a 2880
	C≡N	2244
	C-N	1223
	C-H desdobração	1416 a 1305
	C=O ácido carboxílico	1706
EGDMA	C-O éster	1715
	C=O éster	1143
	C=C alceno	1636
	C-H não aromático	2980 a 2929
	O-H ácido carboxílico	3494
MIP	C-H	2984 – 2974
	C=O éster	1719
	CH ₃ desdobração fora do plano	1455
	C-N	1250
	C-O	1139
	O-H	3538
NIP	C=O éster	1716
	CH ₃ desdobração fora do plano	1456 – 1386
	C-N	1250
	C-O	1139

Já a TG permitiu o estudo de possíveis reações de decomposição e processos de dessorção e adsorção dos materiais em atmosfera com presença de oxigênio (ar sintético).

Na análise térmica do MIP (Figura 13) nota-se um evento endotérmico de transição de fase em torno de 150 °C, que pode ser atribuído à fusão de resíduos da molécula molde (ponto de fusão 163 - 165 °C)⁶⁶. A curva TG indica um evento térmico próximo a 300 °C e, a curva DTG confirma que, a temperatura em que a reação de perda de massa (decomposição) é máxima corresponde a 316 °C. Outra perda de massa ocorre próxima a 500 °C, possivelmente devido a carbonização do material com perda de gás carbônico e água.

Figura 13 - Curvas TG/DTG obtidas a partir de análise do MIP. Condições de análise: ar sintético com vazão de 100 mL min⁻¹, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, tmax de 1000 °C.

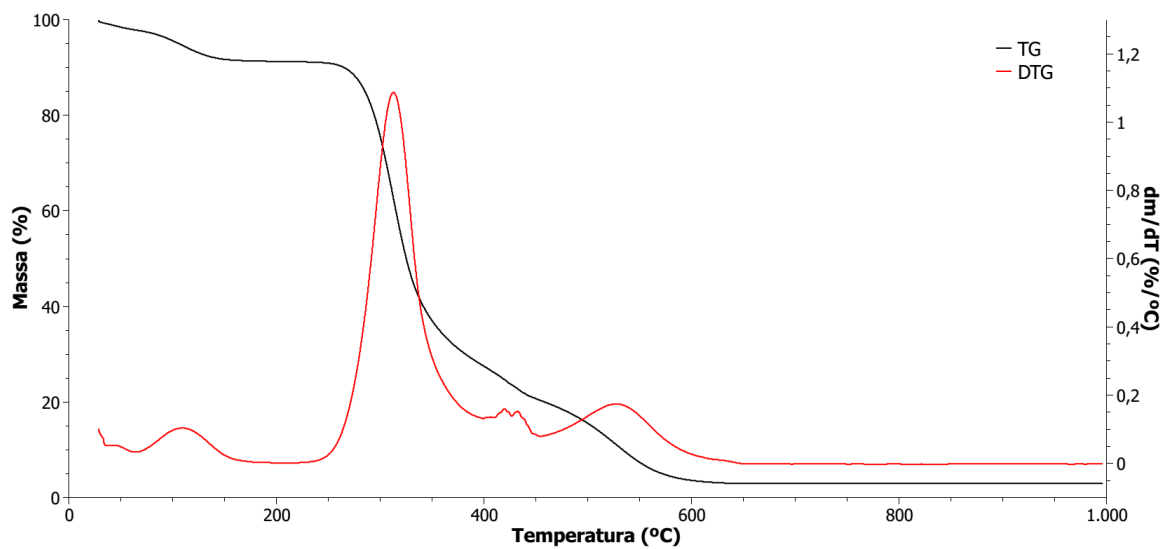


Fonte: Do autor, 2016.

As curvas obtidas a partir das análises térmicas para o NIP são mostradas na Figura 14. É possível observar eventos de decomposição e perda de massa semelhantes aos observados para o MIP. No início da análise, observa-se uma pequena perda de massa em torno de 100 °C, o que pode ser atribuído à perda de água oriunda da secagem incompleta do material. Assim como visto nas curvas referentes ao MIP, há um evento térmico em temperaturas em torno de 315 °C e 350 °C, indicando que a reação de perda de massa é máxima nestas temperaturas.

As semelhanças entre as curvas do MIP e NIP podem ser atribuídas a composição dos polímeros, igual para ambos, diferindo apenas na presença de resíduos da molécula molde e água.

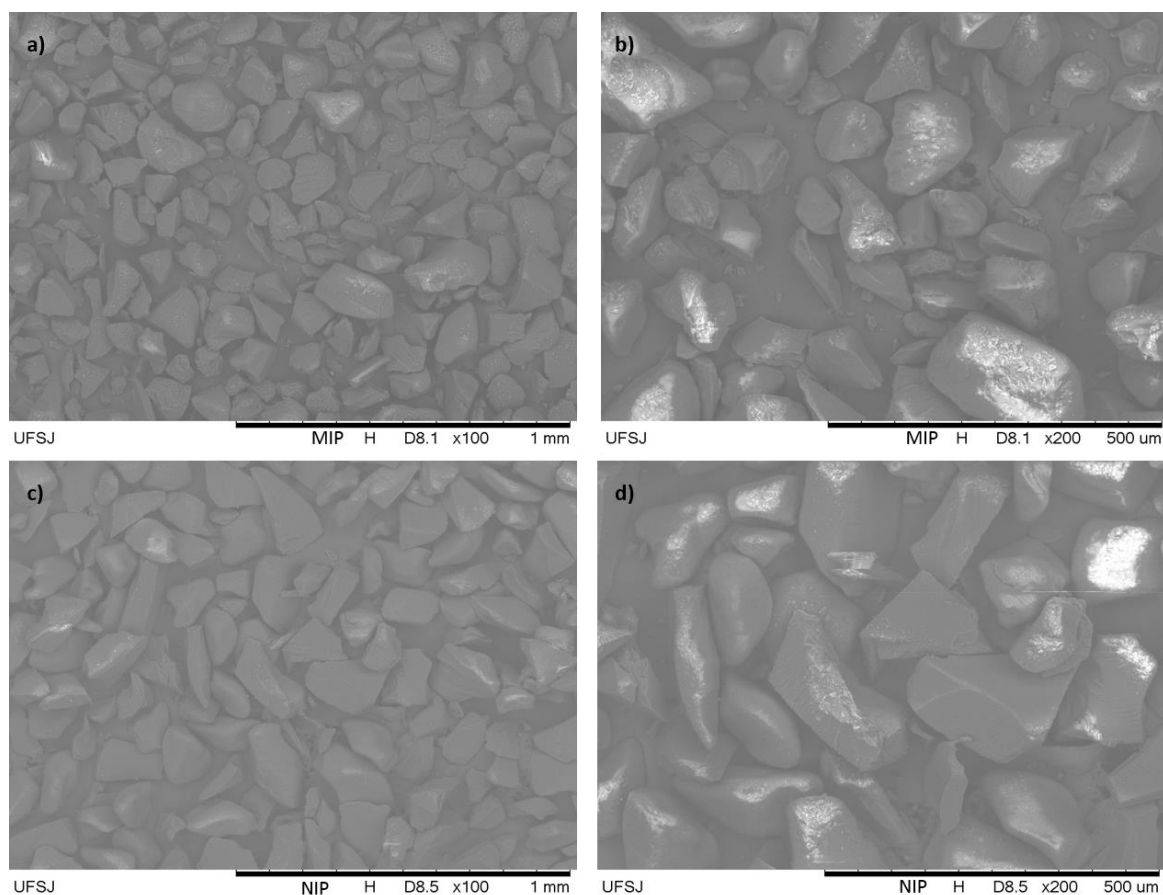
Figura 14 - Curvas TG/DTG obtidas a partir de análise do NIP. Condições de análise: ar sintético com vazão de 100 mL min⁻¹, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, tmax de 1000 °C.



Fonte: Do autor, 2016.

A análise por MEV permitiu observar detalhes referentes a superfície dos grãos dos polímeros. A Figura 15 mostra a superfície dos polímeros quando utilizados aumentos de 100 e 200 vezes. É possível observar que não há grande diferença no formato e tamanho das partículas de MIP e NIP. Tal semelhança pode ser explicada pelo uso do mesmo método de síntese utilizado para obtenção ambos os polímeros (polimerização em *bulk*)³², com a formação do monólito e possivelmente pelo processo de maceração dos polímeros.

Figura 15 – Imagens obtidas por MEV: a) MIP 100x; b) MIP 200x; c) NIP 100x; d) NIP 200x

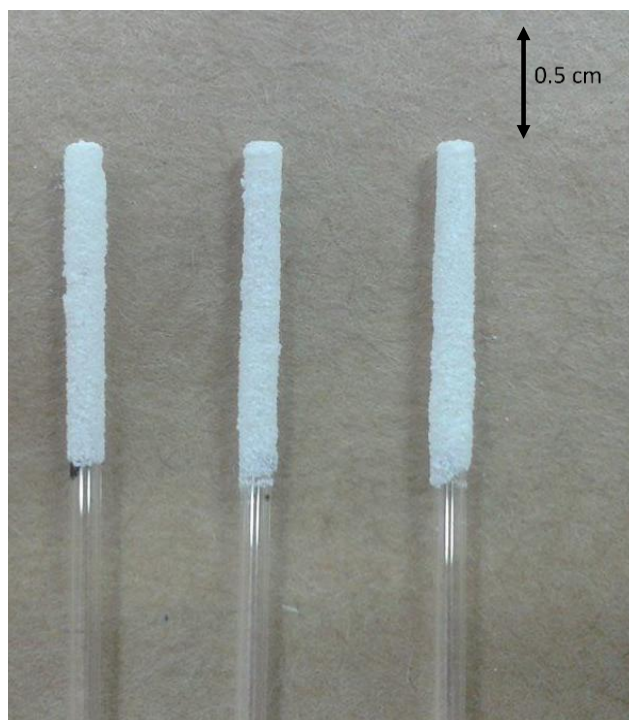


Fonte: Do autor, 2016.

5.2 CONFECCÃO DA FIBRA EXTRATORA

O capilar confeccionado conforme descrito anteriormente se apresentou estável após a adesão do MIP sobre a camada de cola Epóxi aplicada no capilar de vidro neutro (Figura 16). Não houve perda de material após a secagem completa da cola.

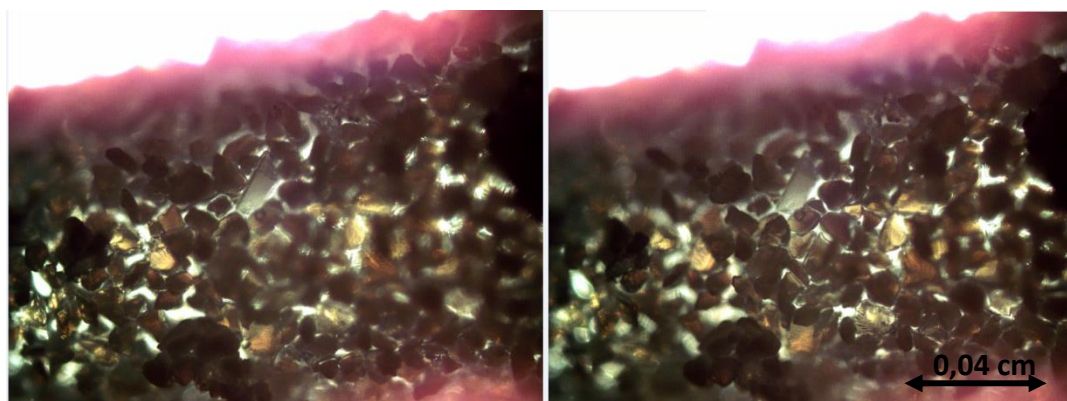
Figura 16 - Extremidade da fibra extratora revestida com MIP



Fonte: do autor, 2015.

Analisou-se o capilar extrator com auxílio do microscópio Axio Scope.A1 acoplado à câmera AxioCam ICc 3 (Zeiss®), permitindo a observação das partículas de MIP aderidas à superfície do capilar recoberto com a cola (Figura 17).

Figura 17 - Superfície da fibra extratora observada ao microscópio óptico, aumento de 40x.

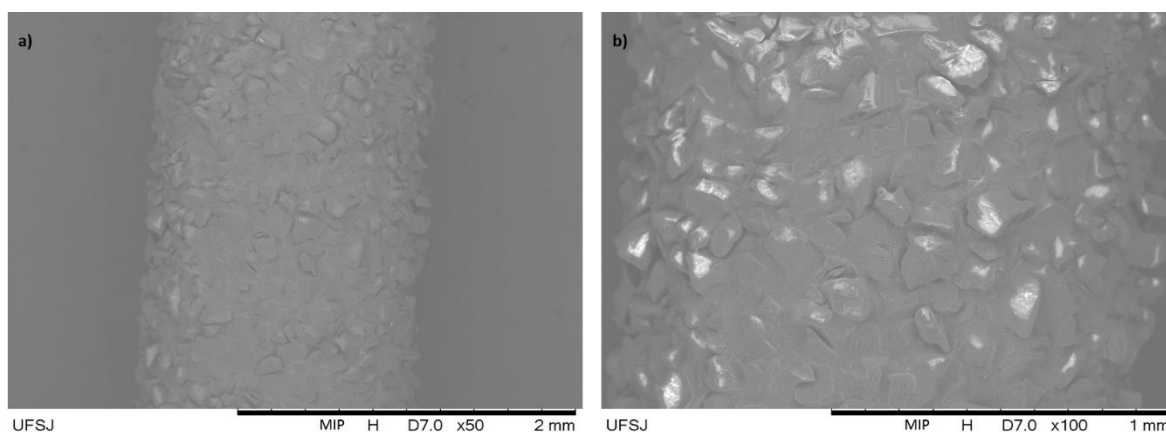


Fonte: do autor, 2015.

Também foram realizadas análises de MEV das fibras extratoras confeccionadas, a fim de se observar como ocorreu a adesão do polímero ao capilar de vidro com a utilização da cola epóxi (Figura 18). É possível observar que houve completa cobertura do capilar, sendo este totalmente revestido pelo polímero. As mesmas características foram observadas nos capilares confeccionados com NIP.

Observou-se que fibra extratora finalizada manteve todas as suas propriedades em relação a quantidade de material depositado e recobrimento do capilar de vidro neutro.

Figura 18 - Imagens da fibra extratora de MIP analisada por MEV: a) 50x; b) 100x.



5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA MEKC

Em relação à MEKC, foram estudadas variáveis que interferem na separação dos analitos e também no tempo da corrida, tais como o tampão de corrida a ser utilizado e sua concentração ideal e o campo elétrico aplicado tanto na amostragem quanto durante a corrida eletroforética. Também foi avaliado o comprimento de onda ideal e com maior absorbância para os analitos em estudo. A otimização destes parâmetros teve por objetivo selecionar as melhores condições de análise de modo a obter-se picos bem separados e de melhor resolução (maior 1,5) aliado a uma corrida rápida.

5.3.1 Seleção do comprimento de onda

O sistema de análise proposto consiste em uma etapa de preparo da amostra de urina, correspondendo à extração seguida da dessorção dos analitos de interesse com o extrator em fase sólida de MIP confeccionado e, a etapa de separação e quantificação por MEKC com detector UV-Vis.

Para determinação do comprimento de onda ideal para análise de AH e AMH por espectrofotometria UV-vis foi preparada uma solução contendo ambos os analitos na concentração de 2 g L^{-1} , sendo preparada em tampão de tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10 contendo $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB. Esta solução foi submetida a uma varredura em espectrofotômetro UV-Vis, tendo o próprio tampão como branco.

A partir do espectro obtido foi escolhido o comprimento de onda de 216 nm, visto que há melhor absorbância tanto para o AH quanto para o AMH. Este comprimento de onda selecionado permitiu sinais de absorbância acima de 0,01 tanto para os analitos de interesse quanto para os padrões internos avaliados.

5.3.2 Otimização das condições de amostragem e corrida

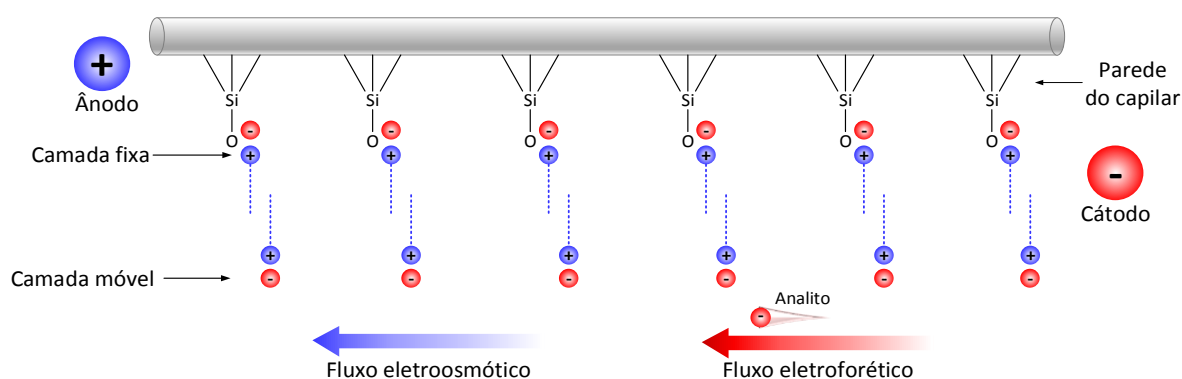
Nos sistemas de EC, bem como no MEKC, duas forças atuam sobre a migração dos íons em solução: o fluxo eletrosmótico (FEO) e o fluxo eletroforético (FE). O FEO atua na direção do ânodo para o cátodo. Já o FE, dependente da carga do analito, aparece na direção do eletrodo de carga oposta, ou seja, para um analito de carga positiva o fluxo eletroforético é gerado na direção do cátodo. Geralmente, em um sistema de MEKC, o polo positivo encontra-se no recipiente da amostra enquanto o polo negativo no recipiente contendo o eletrólito de corrida^{37,40}.

Para determinação dos analitos em estudo, devido as características dos mesmos (carregado negativamente quando em pH 10), utilizou-se voltagens negativas tanto para amostragem quanto para as corridas e, nesta configuração, o polo negativo passou a se localizar no recipiente da amostra. Com a utilização da voltagem invertida, o FEO também foi alterado e passou a se deslocar do recipiente do tampão para o da amostra (do polo positivo ao polo negativo). Para promover o deslocamento do fluxo elétrico e eletrosmótico na mesma direção e assim aumentar a eficiência da separação dos analitos, houve a necessidade de se utilizar um inversor

de fluxo, sendo o reagente escolhido o CTAB. De acordo com Carpio *et al* (2010), a concentração ideal deste reagente para este tipo de análise seria de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ⁶².

Portanto, o uso do CTAB e da voltagem invertida permitiu que o FEO e o FE se descolassem na mesma direção, sendo a resultante das forças atuantes nos analitos direcionadas do polo negativo (recipiente da amostra) para o polo positivo (recipiente do tampão) (Figura 19).

Figura 19 - Representação FEO e FE no interior do capilar de sílica, tendo em vista as condições de análise estabelecidas: condição com polaridade invertida e uso de CTAB.



Fonte: do autor, 2016.

Em relação às condições de análise testadas para o sistema de MEKC, foram a voltagem e tempo de amostragem bem como a voltagem utilizada para a corrida. Inicialmente, o tempo de amostragem foi fixado em 10 segundos. Com o tempo de amostragem definido, foram testadas as voltagens de amostragem, que variaram de -2 kV a -8 kV, com incrementos de 2 kV. Após estabelecer a melhor condição de amostragem foram avaliadas diferentes voltagens de corrida, ainda mantendo o tempo de amostragem em 10 segundos variando a tensão entre -10 e -16 kV.

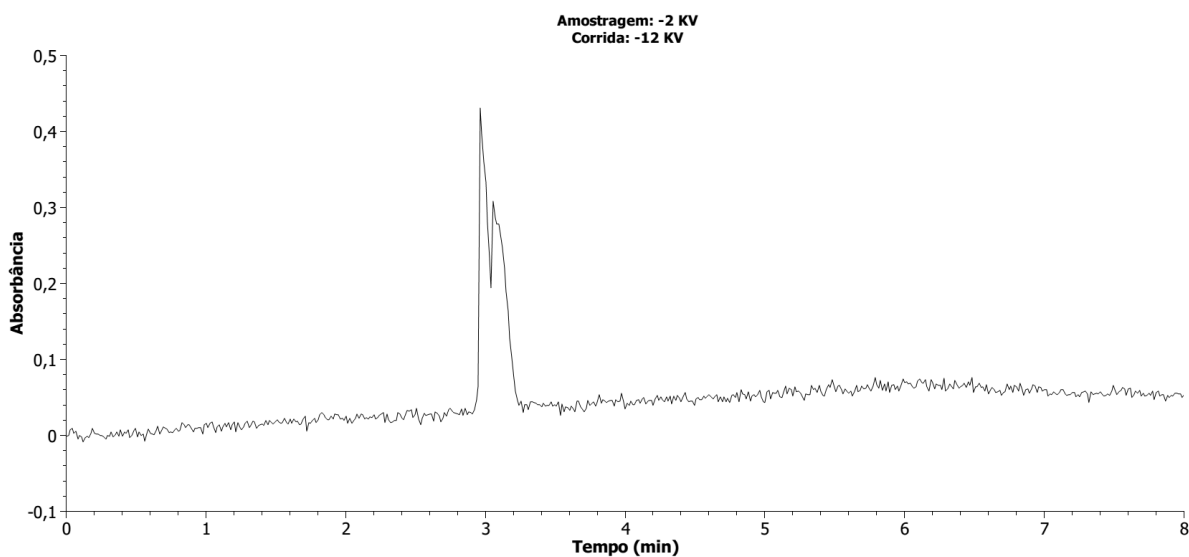
As combinações possíveis foram feitas fixando a voltagem de amostragem e variando as voltagens de corrida, ou seja, quando fixada a voltagem de amostragem em -2 kV por exemplo, esta foi combinada com as voltagens de corrida de -10, -12, -14 e -16 kV. Foram, portanto, realizados 16 testes combinando as voltagens de amostragem e corrida.

As melhores condições observadas durante a triagem foram a voltagem de amostragem -2 kV combinada com as voltagens de corrida de -12 e -14 kV (Figura

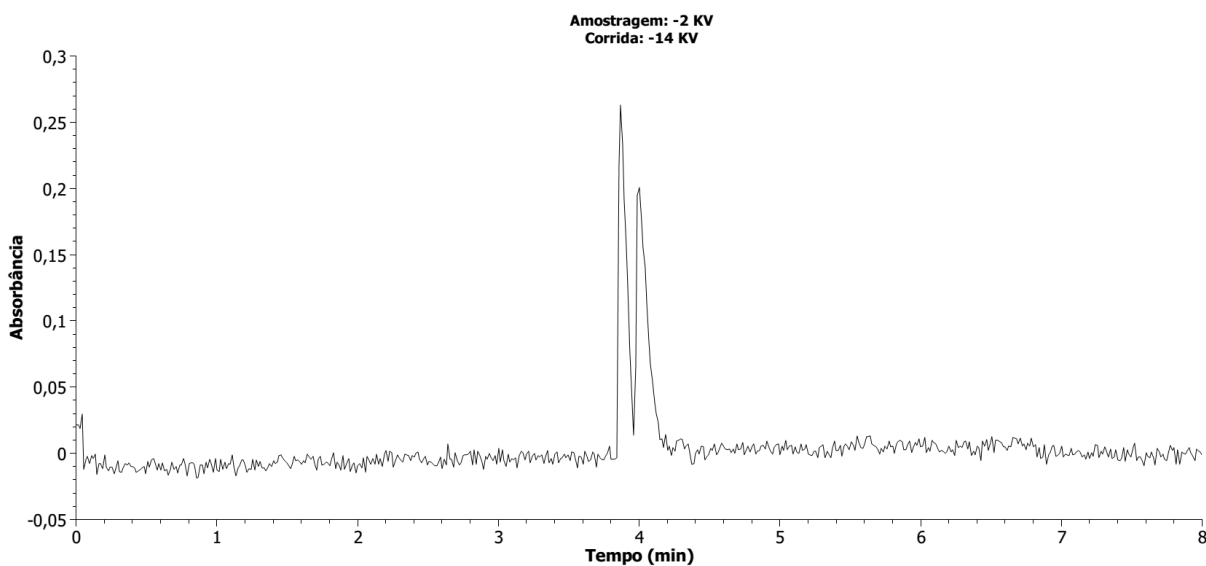
20) e a voltagem de amostragem -4 kV também combinada com as voltagens de corrida de -12 e -14 kV (Figura 21).

Figura 20 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções aquosas contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L⁻¹. Condição de amostragem eletrocinética -2 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de a) -12 kV, b) -14 kV.

a)

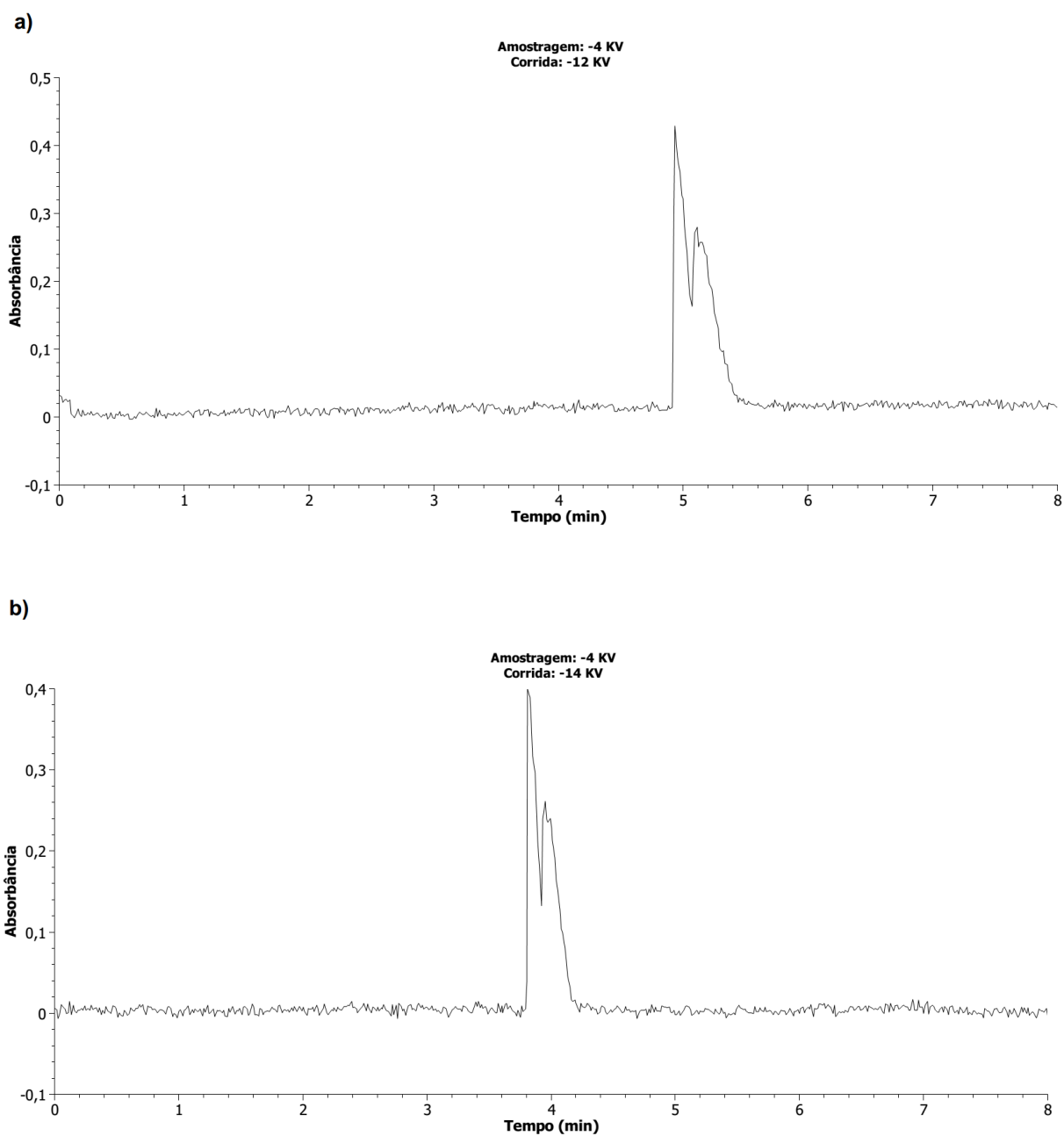


b)



Fonte: Do autor, 2016.

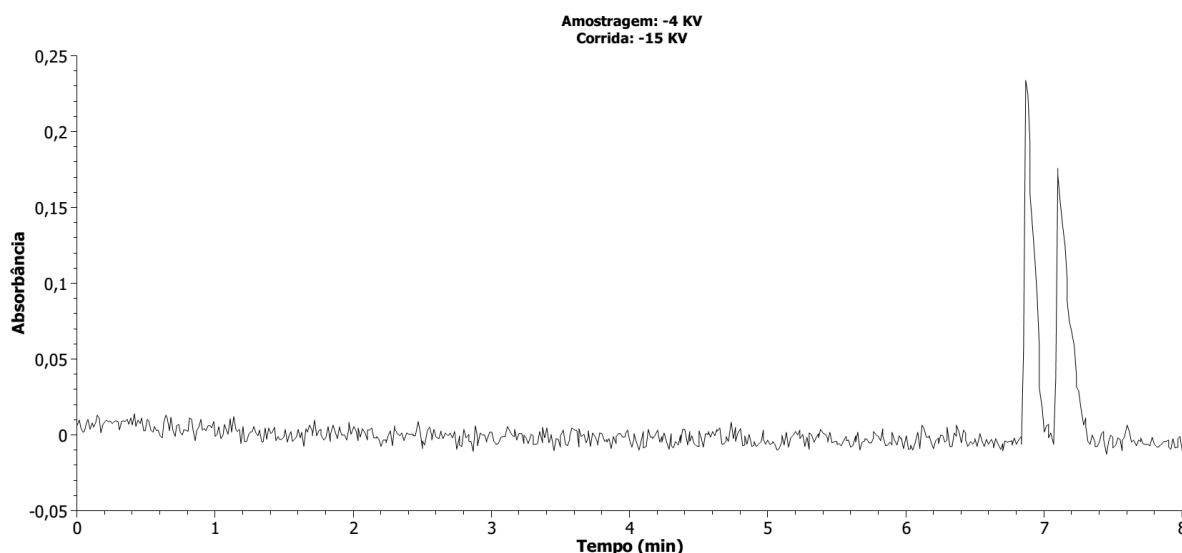
Figura 21 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções aquosas contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L⁻¹. Condição de amostragem eletrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de a) -12 kV, b) -14 kV.



Fonte: Do autor, 2016.

Devido às características observadas nos gráficos das melhores condições, foi ainda testada uma condição intermediária com voltagem de amostragem de -4 kV e a de corrida como sendo -15 kV (Figura 22).

Figura 22 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções aquosas contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L⁻¹. Condição de amostragem eletrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de -15 kV. Condição intermediária testada.



Fonte: Do autor, 2016.

A partir dos testes realizados e dos gráficos foi possível perceber que a melhor separação dos analitos ocorreu utilizando a voltagem de -4kV para amostragem e voltagem de -15 kV para a corrida. Observou-se que utilizando a voltagem de amostragem a -4 kV houve uma separação inicial dos analitos ao promover a injeção das amostras no capilar. Aliado a essa separação inicial, a utilização da voltagem de corrida de -15 kV favorece a migração dos analitos através do capilar sem promover a mistura dos analitos já separados inicialmente e sem aquecimento excessivo do sistema, o que poderia provocar o alargamento dos picos.

Altas voltagens de corrida permitiram a migração mais rápida dos analitos carregados na direção do polo correspondente. Entretanto voltagens muito mais altas que as testadas provocaram a junção dos picos, não havendo separação satisfatória dos analitos. Como um tempo de amostragem de 10 segundos resultou em picos com intensidades satisfatórias dos analitos, este tempo foi mantido como condição de trabalho.

5.3.3 Escolha do tampão de corrida

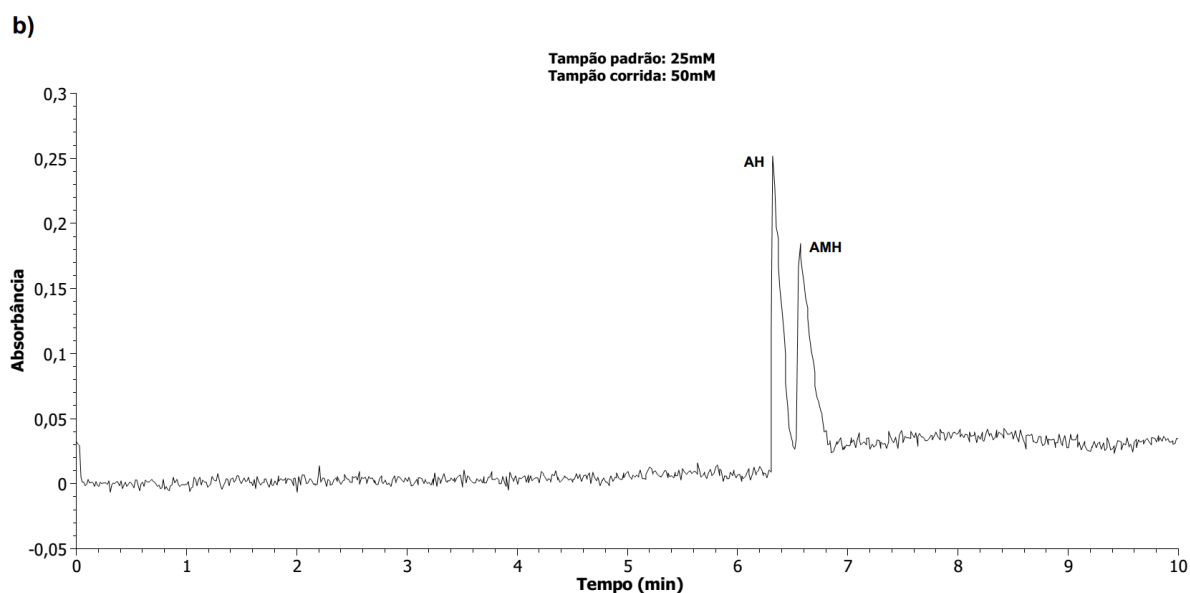
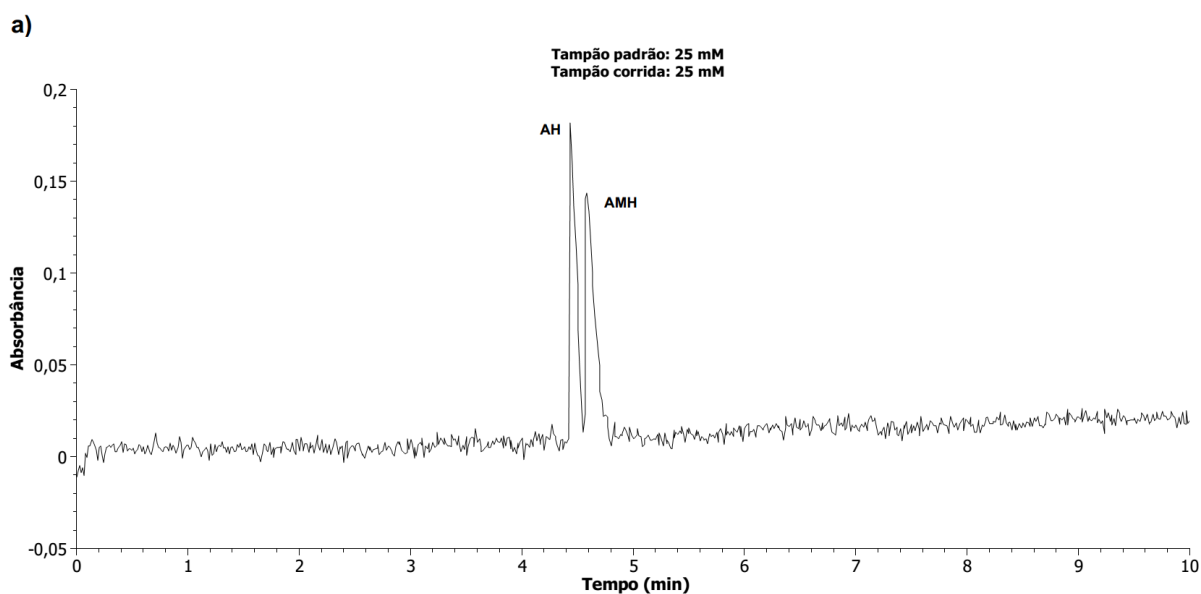
O tampão de corrida ideal deve apresentar baixa absorvância no comprimento de onda dos analitos com baixa mobilidade a fim de minimizar a geração de calor e o alargamento dos picos³⁷. O intervalo de pH de trabalho ideal em MEKC varia entre 2 e 11, sendo dependente do analito, enquanto a concentração das soluções tampões variam geralmente entre 5 e 200 mmol L⁻¹ ³⁷.

A literatura descreve como tampão mais utilizado para determinação de metabólitos através da EC o tampão tetraborato de sódio em pH 10⁷. Os capilares de sílica possuem em sua superfície interna grupos silanol (SiOH), os quais são fracamente ácidos e, em contato com o meio aquoso, estes grupos dissociam, tornando a superfície negativamente carregada. O controle desta carga superficial é feito pela adição de compostos tensoativos, que promovem a desativação dinâmica da camada interna do capilar. Como mencionado, foi adicionado à solução tampão um inversor de fluxo eletrosmótico favorecendo, não só o controle das cargas na parede interna do capilar de sílica, mas também o deslocamento e a separação dos analitos durante a corrida devido às alterações provocadas no fluxo eletrosmótico.

A fim de melhorar a separação dos analitos foram testadas diferentes concentrações de tetraborato de sódio pH 10 e concentração de CTAB fixa (0,5 mmol L⁻¹), tanto no preparo dos padrões quanto para a corrida. As soluções utilizadas para estes testes foram soluções contendo ambos os analitos em concentrações conhecidas, iguais e equivalentes a 2 g L⁻¹.

Os eletroferogramas obtidos a partir da análise dos padrões preparados com tampão de 25 mmol L⁻¹ são mostrados na Figura 23.

Figura 23 - Eletroferogramas obtidos a partir de dos padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 25 mmol L⁻¹ pH 10 e corrida eletroforética com tampão a) 25 mmol L⁻¹ e b) 50 mmol L⁻¹, contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L⁻¹. Condição de amostragem electrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de -15 kV.

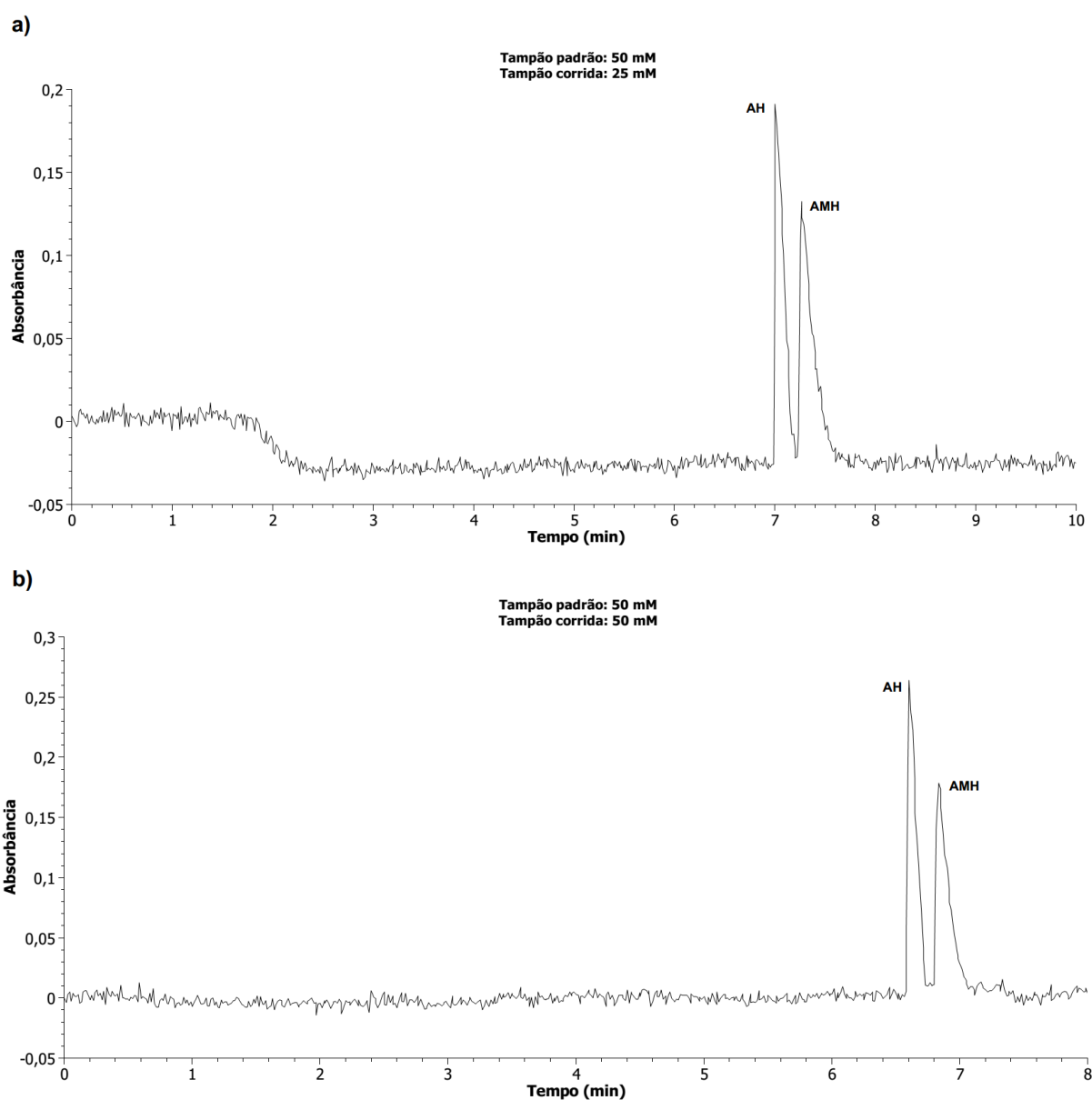


Fonte: Do autor, 2016.

Nota: a) corrida: 25 mmol L⁻¹, b) corrida: 50 mmol L⁻¹

A Figura 24 mostra os eletroferogramas obtidos a partir da análise dos padrões preparados com tampão de 50 mmol L⁻¹.

Figura 24 - Eletroferogramas obtidos a partir de dos padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 10 e corrida eletroforética com tampão a) 25 mmol L⁻¹ e b) 50 mmol L⁻¹, contendo AH e AMH em concentração de 5,0 g L⁻¹. Condição de amostragem electrocinética -4 kV; corrida eletroforética com diferença de potencial de -15 kV.



Fonte: Do autor, 2016.

Nota: a) corrida: 25 mmol L⁻¹, b) corrida: 50 mmol L⁻¹

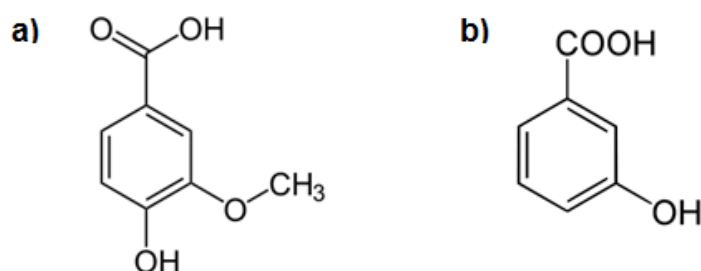
Foi possível perceber que a separação dos analitos foi mais eficiente quando da utilização do tampão mais concentrado. O aumento da concentração provoca o aumento na interação eletrostática entre os íons em solução e, conseqüentemente provoca um aumento na intensidade do campo elétrico do tampão mais concentrado. A condutividade do tampão mais concentrado também provoca diminuição da força do campo elétrico causando um aumento e conseqüentemente melhora na resolução dos picos⁶⁷.

5.4 ESCOLHA PADRÕES INTERNOS

O padrão interno ideal é uma substância ausente na amostra e padrões, adicionada em quantidade constante a todas as soluções utilizadas, com a finalidade de compensar erros sistemáticos e aleatórios, efeitos de matriz e erros oriundos do preparo de amostra³. A correlação é dada pela razão entre o sinal do analito e o sinal da resposta do padrão interno.

Os padrões internos testados foram escolhidos devido a semelhança estrutural com os analitos de interesse e ao fato de serem substâncias que normalmente não são encontradas como metabólitos no organismo. Os testes foram feitos utilizando-se padrões de ácido vanílico, AV, (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico) e ácido 3-hidroxibenzóico, AHB (Figura 25).

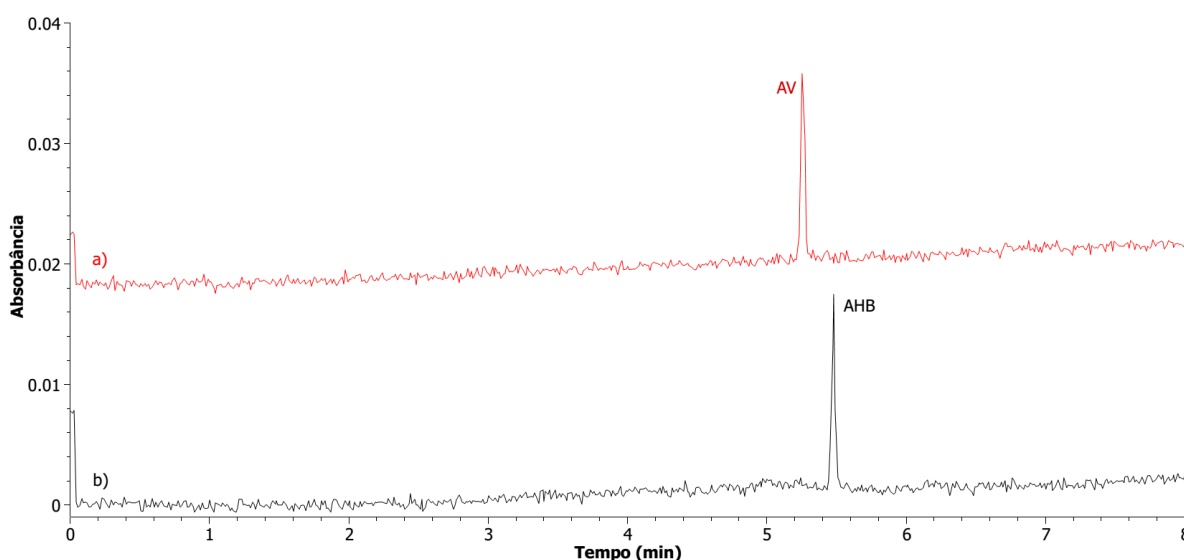
Figura 25 - Padrões internos: a) ácido vanílico, b) ácido 3-hidroxibenzóico.



Fonte: do autor, 2016

Inicialmente, para identificação do padrão interno ideal, foram utilizadas soluções estoque contendo ambos os padrões internos em concentração de 2 g L^{-1} , preparadas no próprio eletrólito de corrida, para verificar o tempo de saída de cada um. Estas soluções foram injetadas no sistema de MEKC, inicialmente, sem passar pela etapa de extração com o extrator de MIP. Estes testes permitiram concluir que ambas as substâncias testadas também apresentaram sinais de absorbância maiores que 0,015 no comprimento de onda definido como ideal (216 nm). Os tempos de eluição para cada um dos padrões internos testados foram diferentes. O ácido vanílico eluiu após 5,20 minutos da injeção, enquanto o sinal do ácido 3 hidroxibenzoico foi gerado no eletroferograma após 5,43 minutos (Figura 26).

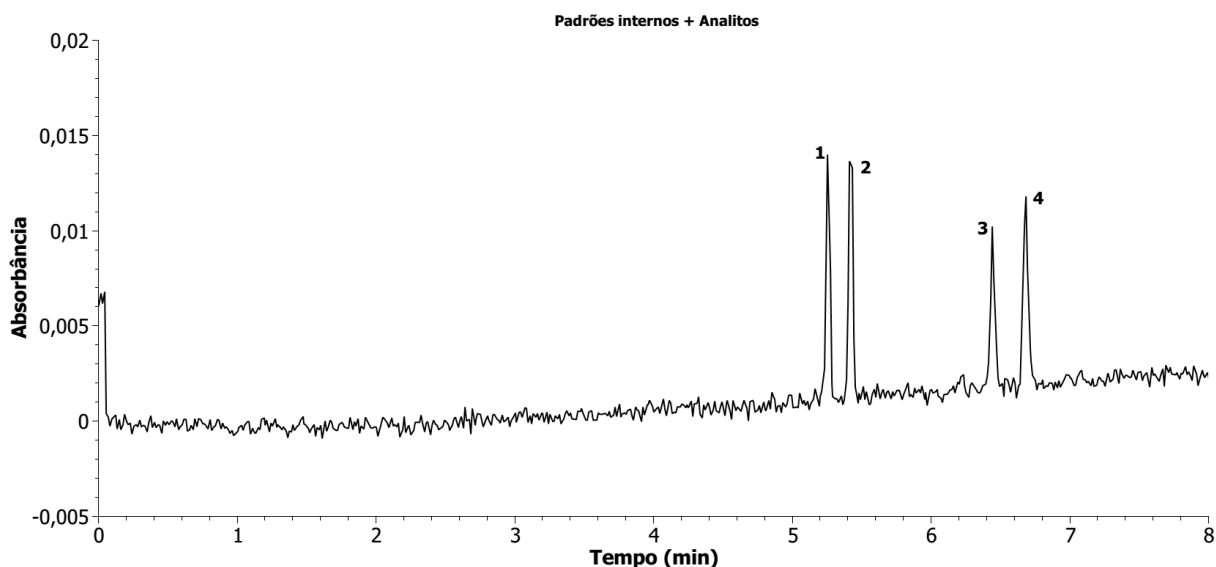
Figura 26 - Eletroferogramas obtidos a partir de dos padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 10, contendo a) $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de AV e b) $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de AHB.



Fonte: Do autor, 2016.

Em análises posteriores, foram testadas soluções contendo os dois padrões internos e os dois analitos, sendo estas soluções também preparadas em tampão 50 mmol L^{-1} . Foi possível observar que estes tempos dos padrões internos foram também diferentes dos tempos de eluição dos analitos, cujos sinais aparecem a partir de 6,3 minutos (6,37 minutos para o ácido hipúrico e 6,63 minutos para o ácido metil hipúrico) (Figura 27).

Figura 27 - Eletroferogramas obtidos a partir de padrões preparados com tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 10, contendo 2,0 g L⁻¹ de AV, 2,0 g L⁻¹ de AHB, 2,0 g L⁻¹ de AH e 2,0 g L⁻¹ de AMH. Verificação do tempo de eluição dos padrões internos em relação aos analitos.



Fonte: Do autor, 2016.

Nota: 1- ácido vanílico, 2- ácido 3 hidroxibenzoico, 3- ácido hipúrico, 4- ácido metilhipúrico.

A diferença de mobilidade dos padrões internos e dos analitos de interesse se deve principalmente à diferença no tamanho das moléculas, uma vez que em pH 10 (pH do tampão) todos estão carregados negativamente. Os grupos volumosos dos analitos de interesse tendem a retardar o movimento dos mesmos em direção ao eletrodo negativo, enquanto a menor quantidade de grupos volumosos nos padrões internos permite a estes maior mobilidade durante a corrida.

Ainda em relação aos analitos e padrões internos, foi confeccionada uma curva de calibração contendo os padrões internos em concentração fixa de 2,0 g L⁻¹ e com a concentração dos analitos variando entre 0,5 e 5,0 g L⁻¹. Os estes foram feitos para verificar a eficiência da extração com o capilar de MIP, tanto dos padrões internos quanto dos analitos e verificar qual PI permite melhor correção dos desvios.

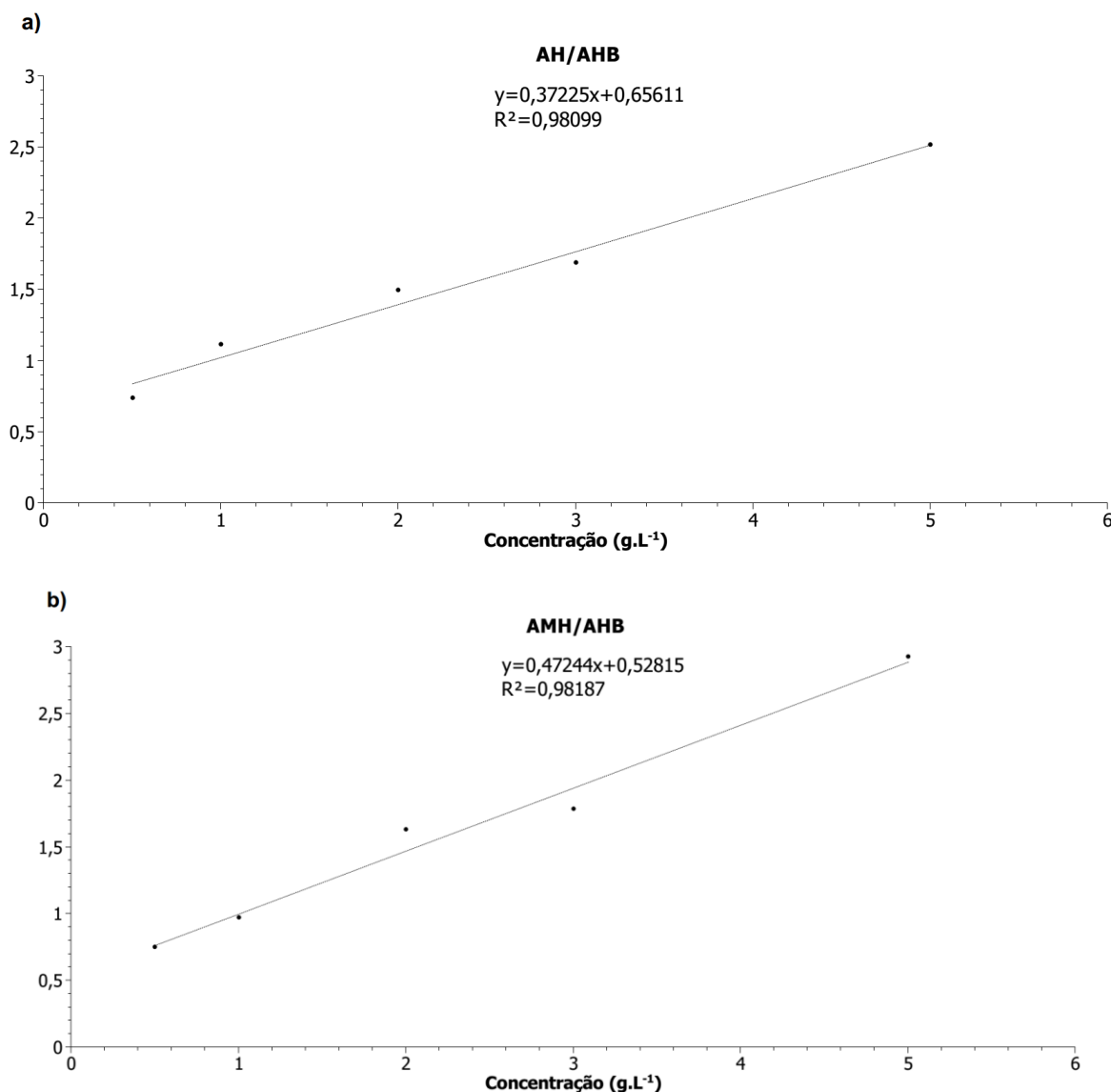
Para esta etapa foi estabelecido aleatoriamente como tempo de extração e dessorção 5 minutos, com tempo de lavagem em água de 5 segundos. As análises foram feitas em triplicata e a partir dos sinais de absorbância obtidos para padrões internos e analitos são mostrados foi calculada razão entre os sinais para verificar qual

deles permitiria a melhor correção das absorvâncias devido à possíveis variações nas condições de análises.

Foram plotadas curvas relacionando a concentração dos analitos nas amostras e a razão analitos/padrões internos e avaliado o R^2 correspondente a cada razão analisada. A Figura 28 mostra as curvas referentes a correção feita com o ácido 3 hidroxibenzoico.

Figura 28 – Curva analítica à referente correção dos sinais dos analitos pelo padrão interno AHB.

a) AH, b) AMH em concentrações variando entre 0,5 a 5,0 g L⁻¹ e AHB em concentração de 2 g L⁻¹.



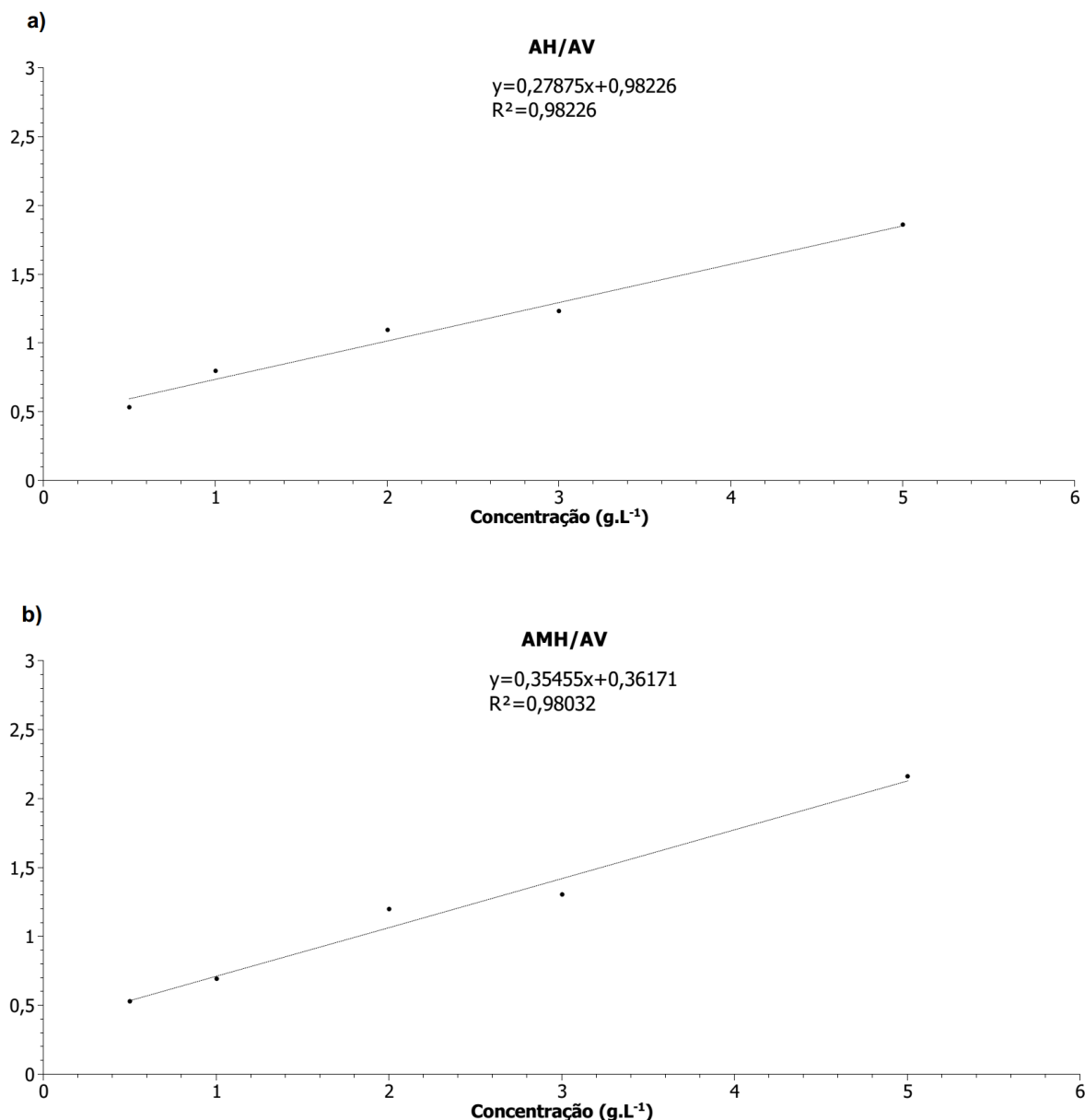
Fonte: Do autor, 2016.

Nota: a) ácido hipúrico, b) ácido metil hipúrico

A correção de possíveis desvios obtida a partir da utilização do ácido vanílico é mostrada na Figura 29.

Figura 29 - Curva analítica à referente correção dos sinais dos analitos pelo padrão interno AV.

a) AH, b) AMH em concentrações variando entre 0,5 a 5,0 g L⁻¹ e AHB em concentração de 2,0 g L⁻¹



Fonte: Do autor, 2016.

Nota: a) ácido hipúrico, b) ácido metil hipúrico

Através da análise dos gráficos observou-se que os valores de R² para o padrão interno ácido 3-hidroxibenzóico foi mais satisfatório em relação ao ácido vanílico.

Deste modo, é possível inferir que a correção feita pelo ácido 3-hidroxibenzóico foi mais eficaz e passou-se a trabalhar somente com este padrão interno.

5.5 PREPARO DA AMOSTRA

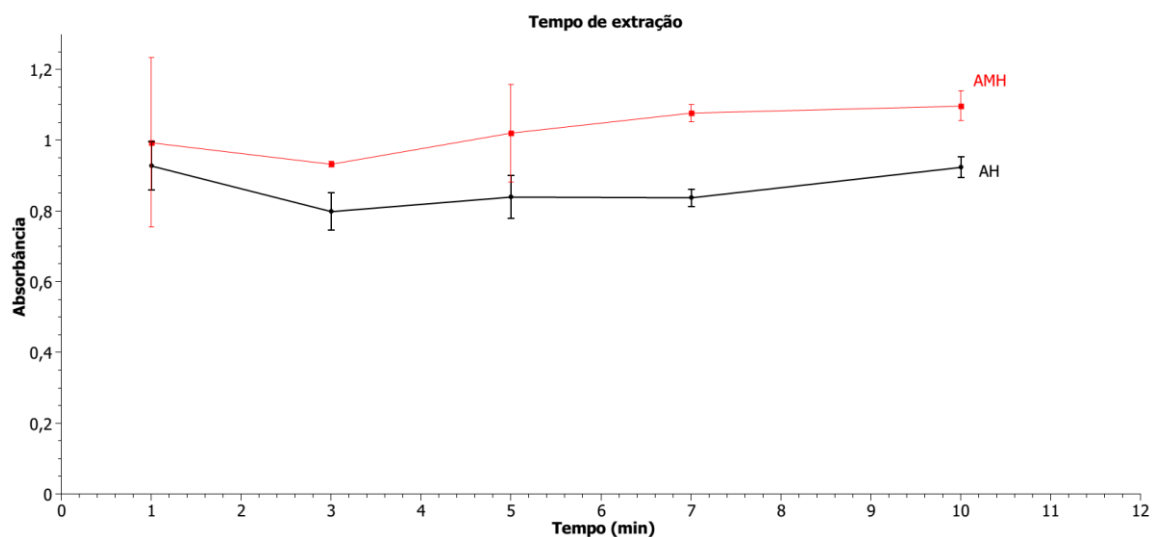
Em relação ao preparo de amostra com o capilar de MIP foram avaliadas variáveis tais como os padrões internos ideais, o tempo de extração na amostra e o tempo de eluição.

5.5.1 Tempo e condições de extração e eluição

Após o preparo dos padrões referentes a esta etapa (padrões preparados a partir de um pool de urina de pessoas não expostas), as soluções foram colocadas em *vials* para submersão do capilar extrator por certos períodos de tempo, permitindo verificar qual o tempo ideal de extração. Buscou-se encontrar um tempo ideal de extração que garantisse o equilíbrio entre a fibra e solução, permitindo, portanto, uma melhor extração e eluição dos analitos.

Os tempos de extração testados variaram entre 1 a 10 minutos. Foram observados os sinais provenientes da correção feita com os padrões internos e os desvios padrões apresentados para cada tempo. Foram montados gráficos (Figura 30) que permitiram observar em qual tempo ocorria o equilíbrio solução-fibra, no caso da extração, e fibra-solução, no caso da dessorção. Observou-se a amplitude dos sinais analíticos de cada um dos analitos em função dos tempos de extração-dessorção.

Figura 30 - Influência do tempo de extração na resposta analítica.

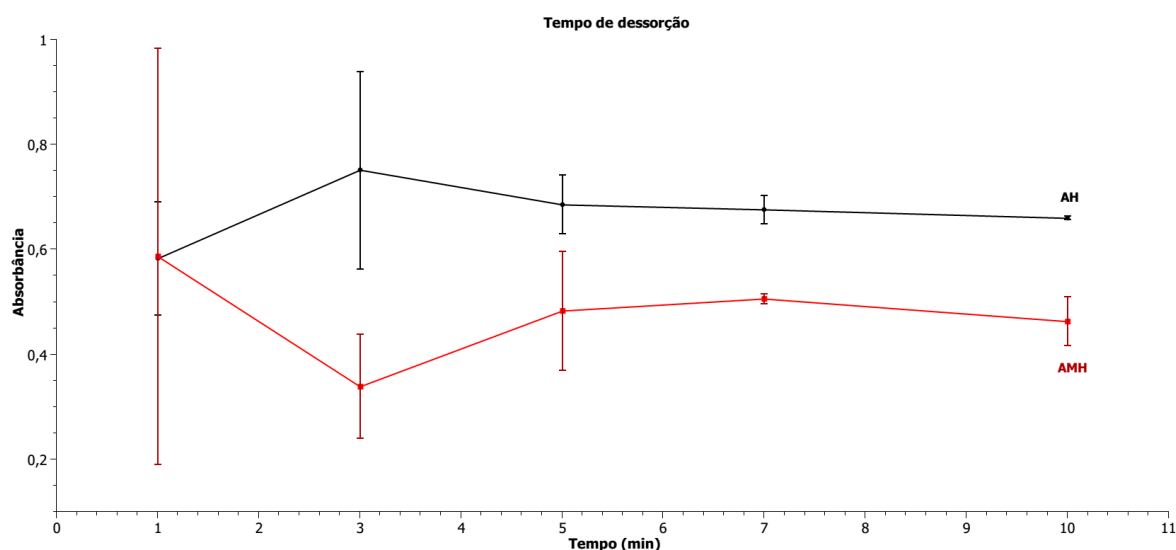


Fonte: Do autor, 2016.

A partir dos resultados obtidos estabeleceu-se como tempo ideal de extração 7 minutos. Como a técnica de extração em fase sólida é uma técnica não-exaustiva foi necessário encontrar o tempo de equilíbrio para a etapa extração, sendo que este ocorre entre a solução contendo os analitos e a fibra extratora. As triplicatas realizadas em tempo de 7 minutos apresentaram o menor desvio padrão indicando maior proximidade do equilíbrio solução-fibra, que os demais tempos testados.

Os tempos de dessorção testados também variaram entre 1 a 10 minutos. A partir da análise dos resultados, o tempo de dessorção que apresentou o menor desvio padrão entre as medidas foi 7 minutos (Figura 31).

Figura 31 - Influência do tempo de dessorção na resposta analítica



Fonte: Do autor, 2016.

Para a dessorção, o equilíbrio considerado ocorre de forma semelhante à etapa de extração, porém ocorre entre a fibra extratora e a solução de eluição. Nesta etapa, o menor desvio padrão observado entre as triplicatas analisadas também se deu em 7 minutos. Portanto, para a solução testada ($2,0 \text{ g L}^{-1}$ dos analitos e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ do padrão interno, em urina), os sinais de absorbância observados nos eletroferogramas variaram de acordo com os tempos de extração e dessorção, atingindo o equilíbrio, para ambas as etapas, em 7 minutos devido ao menor desvio padrão apresentado para os analitos.

Deste modo, as extrações e dessorções passaram a ser realizadas analisando os tempos determinados, mantendo-se o tempo de lavagem do capilar extrator em água fixo em 5 segundos.

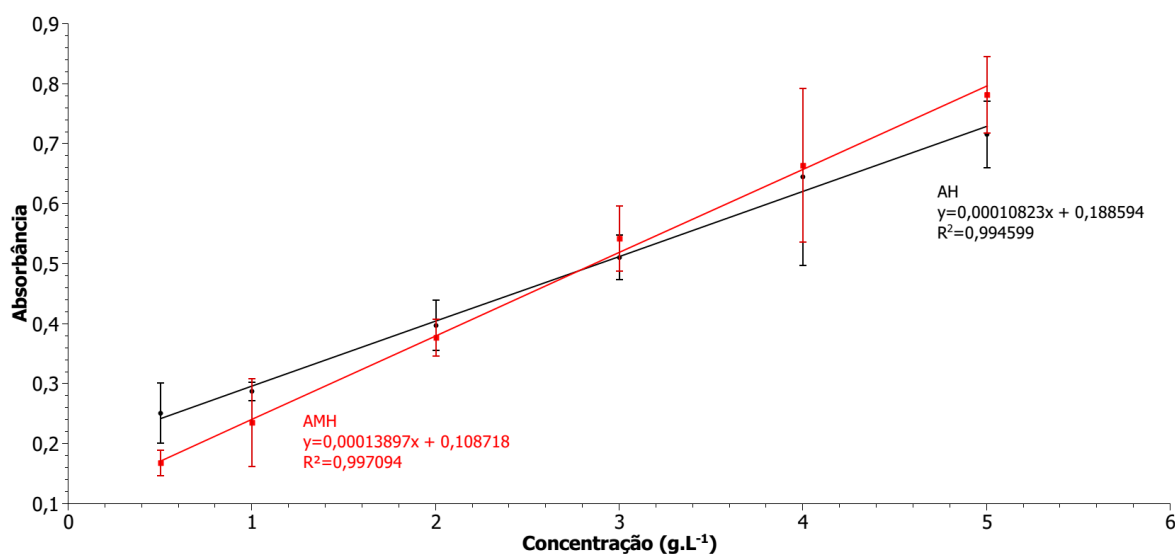
5.5.2 Validação e figuras de mérito

A partir das avaliações anteriores foram estabelecidas certas concentrações para confecção da curva de calibração. Os padrões tiveram concentrações variando entre $0,5$ e $5,0 \text{ g L}^{-1}$, sendo preparados em urina, conforme descrito anteriormente.

Também passou a ser utilizado somente o padrão interno AHB, em concentração de 2,0 g L⁻¹.

A curva foi elaborada com seis pontos em sextuplicata e, conforme os procedimentos realizados anteriormente, obteve-se as médias das razões entre os sinais dos analitos e padrões internos. O intervalo estudado mostrou-se linear como pode se observar na Figura 32 a qual mostra a equação da reta e coeficiente de determinação para cada um dos analitos.

Figura 32 - Curva analítica obtida a partir dos padrões, preparados em urina, contendo AH e AMH em concentrações variando entre 0,5 a 5,0 g L⁻¹ e contendo AHB em concentração de 2,0 g L⁻¹.



Fonte: Do autor, 2016.

Os resultados de linearidade tais como as equações de reta, coeficientes de determinação e limites de quantificação são mostrados na Tabela 2. Pode-se observar que o sinal analítico respondeu ao aumento da concentração dos analitos dos padrões utilizadas (0,5 a 5,0 g L⁻¹).

Tabela 2 - Resultados de linearidade dos analitos em urina

Parâmetros	Ácido hipúrico	Ácido metil hipúrico
Faixa linear (g L ⁻¹)	0,5 – 5,0	0,5 – 5,0
R ² (n=5)	0,994599	0,997094
Coeficiente angular (a) (n=5)	0,00010823	0,00013897
Coeficiente linear (b) (n=5)	0,188594	0,108718
LQ (g L ⁻¹)	0,5	0,5

Fonte: Do autor, 2016.

Normas estabelecidas para validação de métodos analíticos publicadas por agências reguladoras oficiais como a Anvisa, estabelecem que o coeficiente de variação em relação à concentração nominal para o limite de quantificação deve ser menor ou igual a 20% e menor ou igual a 15% para as maiores concentrações^{63,68}. O limite de quantificação foi definido como sendo 0,5 g L⁻¹ para ambos os analitos.

Para os parâmetros avaliados a partir da curva de calibração foi possível observar que a precisão e exatidão intra-dia (Tabela 3) encontram-se dentro dos limites recomendados para quantificação de substâncias endógenas^{63,68}.

Tabela 3 - Precisão e exatidão intra-dia dos analitos

	Conc. Nominal/ g L⁻¹	0,5	2,0	5,0
	Conc. Analisada / g L⁻¹	0,58	1,94	4,89
Ácido Hipúrico	DPR %	20,00	10,42	7,73
	E %	16,59	-3,12	-2,30
	Conc. Nominal/ g L⁻¹	0,5	2,0	5,0
	Conc. Analisada/ g L⁻¹	0,47	1,97	4,89
Ácido Metil hipúrico	DPR %	12,41	8,18	8,17
	E %	-5,72	-1,25	-2,23

Fonte: Do autor, 2016.

Nota: Precisão (RDS%) = [desvio padrão/média]x100

E% = [(concentração nominal/ concentração analisada)x100]/concentração analisada

As concentrações de 0,5, 2 e 5 g L⁻¹ foram empregadas para a determinação da precisão e exatidão inter-dia (Tabela 4).

Tabela 4 - Precisão e exatidão inter-dia dos analitos.

	Conc. Nominal/ g L⁻¹	0,5	2,0	5,0
	Conc. Analisada / g L⁻¹	0,41	1,77	5,61
Ácido Hipúrico	DPR %	7,36	15,04	12,49
	E %	-15,37	-11,55	12,21
	Conc. Nominal/ g L⁻¹	0,5	2,0	5,0
Ácido	Conc. Analisada/ g L⁻¹	0,45	1,85	5,58
Metilhipúrico	DPR %	16,00	10,08	12,43
	E %	-10,52	-7,25	11,58

Fonte: Do autor, 2016.

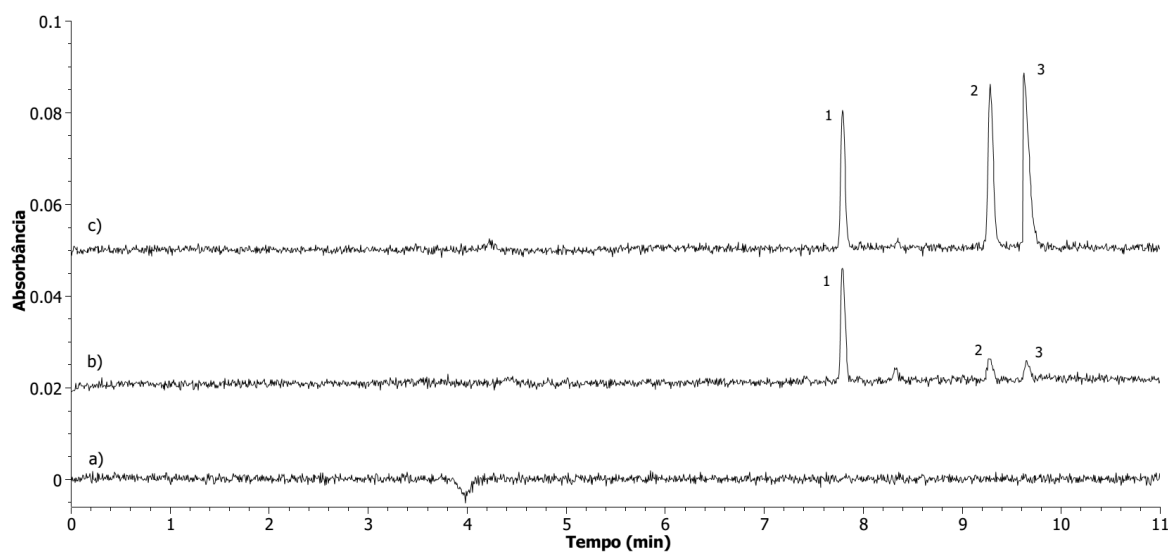
Nota: Precisão (RDS%) = [desvio padrão/média]x100

E% = [(concentração nominal/ concentração analisada)x100]/concentração analisada

As análises realizadas inter-dia também mostraram precisão e exatidão dentro dos parâmetros descritos.

Os eletroferogramas (Figura 33) obtidos apresentaram resolução maior que 1,5, para o branco, o padrão de concentração 0,5 g L⁻¹, correspondente ao limite de quantificação e para o padrão de maior concentração 5,0 g L⁻¹.

Figura 33 - Eletroferogramas de urina não fortificada (a- branco) e fortificada com AH e AMH nas concentrações de b) 0,5 g L⁻¹, c) 5,0 g L⁻¹. O AHB foi usado como padrão interno na concentração de 2 g L⁻¹ nos eletroferogramas b e c.



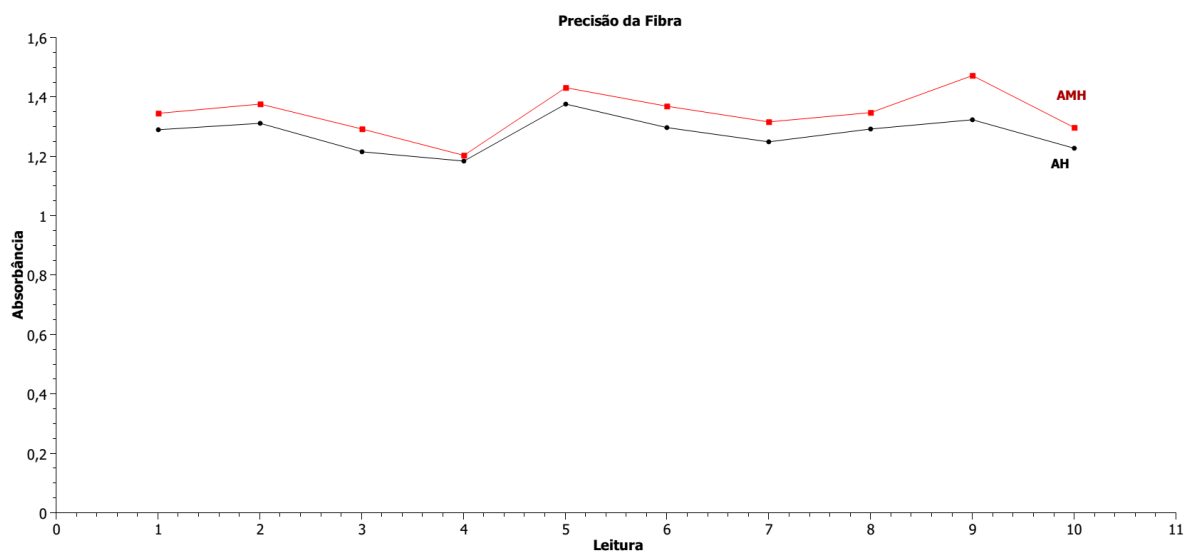
Fonte: Do autor, 2016.

Nota: 1- ácido 3 hidroxibenzóico, 2- ácido hipúrico, 3- ácido metil hipúrico

Foram realizados testes sequenciais de extração e dessorção utilizando a solução de maior concentração (5,0 g L⁻¹), a fim de verificar a precisão da fabricação da fibra extratora de MIP (Figura 34). Em todos os casos, a precisão expressa como desvio padrão relativo foi menor que 16%.

Além disso, verificou-se a seletividade das fibras confeccionadas com MIP, NIP e de capilares de vidro contendo somente a cola epóxi em sua extremidade. Observou-se que os sinais analíticos obtidos quando da utilização da fibra revestida com MIP correspondiam ao dobro do sinal observado quando da extração com a fibra revestida com NIP. Em relação ao capilar revestido somente com a cola epóxi não foram observados sinais nos eletroferogramas. Desta forma, pode-se inferir que a fibra extratora confeccionada com o MIP sintetizado possui seletividade adequada para análise dos analitos em estudo. Isto se deve ao fato do NIP não possuir sítios de reconhecimento molecular e, conseqüentemente não promover a extração de grandes quantidades dos analitos.

Figura 34 - Avaliação da precisão da fibra



Fonte: Do autor, 2016.

5.5.3 Amostras reais

As amostras foram cedidas por trabalhadores expostos aos solventes orgânicos, sendo a coleta realizada após o expediente. As amostras foram analisadas logo após a coleta e a creatinina foi quantificada a partir da reação de Jaffé^{64,65}.

Foram analisadas ao todo 12 amostras, doadas por indivíduos expostos aos solventes orgânicos tolueno e xileno. Entretanto, apenas um indivíduo apresentou sinal correspondente ao ácido hipúrico nos eletroferogramas e os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração dos analitos em amostras reais

	Creatinina (g L ⁻¹)	Conc. Analisada (g L ⁻¹)		Conc. corrigida (g g creatinina ⁻¹)	
		AH	AMH	AH	AMH
Indivíduo 1	2,72	0,496	ND	0,1823	ND
Indivíduo 2	1,80	< LQ	ND	< LQ	ND
Indivíduo 3	1,32	< LQ	ND	< LQ	ND
Indivíduo 4	1,74	< LQ	ND	< LQ	ND
Indivíduo 5	1,62	< LQ	ND	< LQ	ND

Fonte: Do autor, 2016.

A partir das análises das amostras reais foi possível quantificar somente o ácido hipúrico presente na urina de um dos doadores. Siqueira e Paiva estabeleceram valores de referência para o ácido hipúrico em urina em uma população de voluntários saudáveis e não expostos ocupacionalmente ao tolueno⁶⁹. Os valores de ácido hipúrico urinário encontrados foram 0,18 g/g creatinina, como média da população avaliada e 0,38 g/g creatinina como valor máximo.

Observa-se que o valor médio encontrado pelo método proposto se assemelha ao valor correspondente à média dos indivíduos não expostos e, que para a maioria das amostras coletadas a quantidade de ácido hipúrico foi ainda menor, fora do limite de quantificação. O ácido metil hipúrico esteve abaixo do limite de quantificação para todas as amostras analisadas.

A concentração de ácido hipúrico encontrada está abaixo do valor de referência estabelecido pela NR 7, de 1,5 g deste metabólito por grama de creatinina^{3,5}.

Observa-se, portanto, que os trabalhadores, mesmo estando expostos aos solventes orgânicos durante a jornada de trabalho, não correm riscos de danos à saúde.

6 CONCLUSÃO

A síntese do MIP apresentou alto rendimento e originou um polímero seletivo tanto ao AH quanto ao AMH. A confecção de um novo modelo de extrator em fase sólida permitiu o preparo da amostra de forma rápida e miniaturizada.

Os resultados obtidos após a validação remetem a viabilidade da extração em fase sólida utilizando a fibra extratora confeccionada com o MIP. O baixo custo no preparo das fibras extratoras indica a viabilidade da confecção e utilização do extrator em fase sólida na análise dos analitos de interesse.

A otimização das variáveis do sistema de MEKC permitiu melhorias nos sinais analíticos permitindo separar e quantificar os analitos de interesse com resolução maior que 1,5.

Considerando a etapa de preparo de amostras e separação e quantificação por MEKC, o tempo final de análise do método desenvolvido foi de aproximadamente 13 minutos, permitindo a análise sequencial de amostras. Os eletroferogramas obtidos confirmaram a seletividade do MIP em relação ao ácido hipúrico e ácido metil hipúrico devido à ausência de sinais de possíveis interferentes.

Os polímeros de impressão molecular apresentam-se como uma técnica promissora para o preparo de amostras complexas, com diversas possibilidades de aplicações e exploração de suas propriedades. Já o sistema de MEKC permitiu a separação dos analitos e do padrão interno de modo reprodutível.

A metodologia desenvolvida se mostrou eficaz para a monitorização da exposição a tolueno e xileno tanto em relação ao preparo de amostra quanto em relação a separação e quantificação dos analitos.

Os limites de quantificação obtidos para os analitos estiveram abaixo da concentração de metabólitos no organismo que indicam danos à saúde devido a exposição. A extração dos analitos e separação e quantificação por MEKC se mostrou eficaz e com sinais de boa resolução nos eletroferogramas para concentrações de AH e AMH próximas ao IBMP dos metabólitos em estudo.

A análise de amostras reais, provenientes de trabalhadores expostos aos solventes, permitiu observar que os níveis dos metabólitos encontrados no organismo dos doadores estiveram abaixo de $0,5 \text{ g L}^{-1}$.

REFERÊNCIAS

- 1 UNESP. Doenças ocupacionais: o que são e como preveni-las? **Boletim**, Ilha Solteira, 2013. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. p. 1.
- 2 BERTONCELLO, L. **Efeitos da exposição ocupacional a solventes orgânicos no sistema auditivo**. 1999. 29f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Audiologia Clínica) – Centro de Especialização em Fonaudiologia Clínica, Porto Alegre, 1999.
- 3 OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1997.
- 4 BULCAO, R. et al. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1343-1348, 2008.
- 5 BRASIL. Ministério do Trabalho e Previdência social. **Norma Regulamentadora nº7 (NR 7)**. Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. Aprovado pela Portaria SSST n.º 24, de 29 de dezembro de 1994.
- 6 OHASHI, Y. et al. Simultaneous determination of urinary hippuric acid, *o*-, *m*- and *p*-methylhippuric acids, mandelic acid and phenylglyoxylic acid for biomonitoring of volatile organic compounds by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, n. 2, p. 167-171, 2006.
- 7 TIENSTRA, P. A. et al. Assessment of the capabilities of capillary zone electrophoresis for the determination of hippuric and orotic acid in whey. **Journal of Chromatography A**, v. 608, n. 1, p. 357-361, 1992.
- 8 SHIRAO, M. et al. Determinations of organic acids in urine by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 680, n. 1, p. 247-251, 1994.
- 9 BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. 1ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.
- 10 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. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

11 MARTÍN-ESTEBAN, A. Recent molecularly imprinted polymer-based sample preparation techniques in environmental analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 9, p. 8-14, 2016.

12 DIAS, A. C. B. et al. Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 988-996, 2008.

13 BRUCNER, J. V.; WARREN, D. A. Toxic Effects of Solvents and Vapors. In: KLAASSEN, C.D.; WATKINS, J. B. **Essentials of Toxicology**. New York: McGrawHill, 2010. cap. 24, p. 869-916.

14 NEGHBAB, M.; HOSSEINZADEH, K., HASSANZADEH, J. Early Liver and Kidney Dysfunction Associated with Occupational Exposure to Sub-Threshold Limit Value Levels of Benzene, Toluene, and Xylenes in Unleaded Petrol. **Safety and Health at Work**, v. 6 (4), p. 312-316, 2015.

15 FUNDACENTRO. **Manual de orientação sobre controle médico ocupacional da exposição a substâncias químicas**. São Paulo, 2014.

16 CRUZ, S. L.; RIVERA-GARCIA, M. T.; WOODWARD, J. J. Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets. **Journal of Drug and Alcohol Research**, v. 3, p. 1-8, 2014.

17 FUJII, T. et al. Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis. Comparison with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 730, n. 1, p. 41-47, 1999.

18 COSTA, K. N. S. et al. Avaliação dos riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 32, n. 116, p. 50-56, 2007.

19 Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). **Ficha de Informação Toxicológica: Xileno**. São Paulo, 2012.

20 Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS). **Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos: Xileno**. Rio de Janeiro, 2013.

21 SILVA, A. S. R. da et al. Behavior of the creatinine and urea seric and urinary concentrations during a periodization developed in professional soccer players: relations with the glomerular filtration rate. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 6, p. 293-297, 2006.

22 SODRÉ, F. L., COSTA, J. C. B., LIMA, J. C. C. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

23 BASTOS, M. B., KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 74-87, 2011.

24 LIMA, M. M. et al. On-line restricted access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. **Analytical methods**, v. 197, Part A, p. 7-13, 2016.

25 POLYAKOV, M. V. Adsorption properties and structure of silica gel. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, v. 2, p. 799-805, 1931.

26. HAUPT, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. **The Analyst**, v. 126, n. 6, p. 747-756, 2001.

27 MIGUEL, E. C. **Determinação de quercetina, kanamicina e piraclostrobina usando métodos fotoluminescentes e polímeros de impressão molecular**. 2012. 193 f. Tese de doutorado, Química Analítica – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

28 ALVES, L. T. de O. **Síntese e caracterização de MIP a partir da fenilalanina visando sua aplicação na técnica de extração em fase sólida**. 2015. 105 f. Dissertação de mestrado, Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

29 SELLERGREN, B. **Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 2000.

30 HE, C. *et al.* Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, n. 2, p. 133-150, 2007.

31 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. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361-374, 2008.

32 SANTOS, M. G. et al. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 161-195, 2012.

33 CORMACK, P. A. G.; HAUPT, K.; MOSBACH, K. Imprinted Polymers. In: WILSON, I. D.; POOLE, C. **Handbook of methods and instrumentation in separation science**. Lund: Academic Press, 2009, vol. 1, p. 347.

34 SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1609-1619, 2009.

35 HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2495-2504, 2000.

36 MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, n. 7, p. 795-802, 2001.

37 TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

38 SÁIZ, J. et al. Simultaneous separation of cations and anions in capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 162-172, 2014.

39 KLASSEN, A. **Desenvolvimento de métodos para determinação de aminas aromáticas em amostras têxteis por eletroforese capilar**. 2012. 182f. Tese de doutorado, Química Analítica – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

40 TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

41 SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4 (4), p. 287-297, 2012.

42 SHIHABI, Z. K. A simple approach to enhance detection in capillary electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 17, p. 1562-1575, 2010.

43 LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary Electrophoresis**. 2 ed. Boca Raton-Fl: CRC Press, 1996.

44 LEUNG, K.; NIELSEN, I. M. B.; CRISCENTI, L. J. Elucidating the bimodal Acid-Base behavior of the water-silica interface from First Principles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131 (51), p. 18358-18365, 2009.

45 COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.

46 SEGATO, M. P.; SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 431-440, 2009.

47 ASSIS, R. A. **Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar com detector de ICPMS**. Tese de doutorado, Química Analítica - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

48 SANTOS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 585-589, 2000.

49. HANCU, G. et al. Principle of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3 (1), p. 1-8, 2013.

50 TERABE, S. Capillary separation: Micellar Electrokinetic Chromatography. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 99-120, 2009.

51 COMSTOCK, M. J. **Organized surfactant assemblies in separation science**. 5 ed. Washington, DC: American Chemical Society, 1987.

52 SCHIMTT-KOPPLIN, P. **Capillary electrophoresis – Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.

53 MUIJSELAAR, P. G.; OTSUKA, K.; TERABE, S. Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.780, p. 41-61, 1997.

54 ALTRIA, K. D.; McLEAN, R. Development and optimisation of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 807-813, 1998.

55 ALTRIA, K. D. Enhanced pharmaceutical analysis by CE using dynamic surface coating system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 447-453, 2003.

56 WANG, C.; HUANG, C.; HSIEH, Y. Determination of metabolites of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by β -cyclodextrin modified capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 1-2, p. 69-74, 2003.

57 PETRE, C. F. **Alkaline oxidation of hydrosulfide and methyl mercaptide by iron/cerium oxide-hydroxide in presence of dissolved oxygen. Possible application for removal of Total Reduced Sulfur (TRS) emissions in the Pulp & Paper industry**. 2007. PhD Thesis, Département De Génie Chimique Faculté Des Sciences Et De Génie, Université Laval Québec, Québec 2007.

58 VIEIRA, A. C., et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of urinary trans,trans-muconic acid: a comparison with ionic exchange extraction. **Analyst**, v. 137, n. 10, p. 2462-2469, 2012.

59 FENG, Q. Z., ZHAO, L. X.; LIN, J. M. Molecularly imprinted polymer as micro-solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, n.1, p.70-76, 2009.

60 SANGER, C. Detection in Capillary Electrophoresis. **Separation Science**, Cheshire-UK, 2015. Disponível em:

<http://www.sepscience.com/Information/Archive/CE-Solutions/1438-/CE-Solutions-6-Detection-in-Capillary-Electrophoresis>. Acesso em :11/03/2016.

61 SILVA, J. A. F.da *et al.* Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v.30, n. 3, p. 740-744, 2007.

62 CARPIO, A. *et al.* Differentiation of organic goat's milk based on its hippuric acid content as determined by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 13, p. 2211-2217, 2010.

63 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.

64 TOORA, B. D., RAJAGOPAL, G. Measurement of creatinine by Jaffe's reaction - Determination of concentration of sodium hydroxide required for maximum color development in standard, urine and protein free filtrate of serum. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, n. 3, p. 325-345, 2002.

65 BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**, 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999.

66 Sigma-Aldrich®. 4-Methylhippuric acid, MSDS nº328022. St. Louis, MO. Agosto, 2016.

67 WILSON, K.; WALKER, J.M. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

68 CASSIANO, N. M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

69 SIQUEIRA, M. E., PAIVA, M. J. N. Hippuric acid in urine: references values. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 6, p. 723-727, 2002.

ANEXOS

Anexo A - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

1) Atividade/Cargo: _____

2) Idade: _____ anos

3) Peso: _____ kg

4) Tempo de serviço: _____

5) Horas trabalhadas por dia: _____

6) Consome bebida alcoólica? () sim () não

Caso sim, há quanto tempo? _____

Qual a frequência? _____

7) Possui alguma doença? () sim () não

Caso sim, qual (is)? _____

8) Faz uso de medicamentos? () sim () não

Caso sim, qual (is)? _____

Qual a dose? _____

Há quanto tempo? _____

Observações: _____

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados sobre a pesquisa

Título do projeto: “Emprego de polímeros de impressão molecular na extração de ácido hipúrico e ácido metil-hipúrico em amostras de urina seguido de análise por eletroforese capilar”.

- Pesquisadora: Carolina Nasser Boscarl
- Cargo/função: mestranda do Instituto de Química da Unifal-MG
- Avaliação do risco da pesquisa: Os riscos envolvidos na coleta de amostra estão relacionados ao constrangimento pessoal durante o processo. Os participantes podem se sentir acanhados durante a coleta (mesmo sendo esta realizada de modo privado) e/ou entrega do material.

Objetivos: Analisar as substâncias (ácido hipúrico e ácido metil hipúrico) presentes na urina do trabalhador utilizando combinação de técnicas analíticas.

Justificativa: Avaliar o grau de exposição ocupacional à solventes e verificar se os níveis destas substâncias no organismo estão dentro dos limites de referência estabelecidos.

Ações adicionais: A empresa e os trabalhadores participantes não serão identificadas na divulgação dos resultados finais da pesquisa. Caso haja interesse em tomar conhecimento dos resultados finais das análises, os mesmos poderão ser informados somente ao responsável legal da empresa participante. Havendo solicitação por parte da empresa participante em conhecer as medidas cabíveis em relação aos resultados obtidos e aos limites estabelecidos, será sugerido a consulta à profissionais voltados à Saúde Ocupacional (Médico do Trabalho). Para a realização desse trabalho, necessito que o (a) senhor(a) concorde em responder a um breve questionário que abrange alguns dados pessoais e seu histórico de saúde. Além disso, será necessária a doação de aproximadamente 50 mL de urina para as análises durante certo período. Você receberá um frasco apropriado para a coleta e será orientado sobre a maneira correta de proceder à mesma. É garantido o sigilo absoluto de sua identidade em relação aos resultados obtidos durante a pesquisa. Caso haja interesse, o resultado individual da análise de sua urina estará em posse do responsável legal da empresa. Não haverá benefício financeiro ou de qualquer outro tipo. É também garantido que o (a) senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa

a qualquer momento, sem prejuízos, e que as amostras coletadas não serão utilizadas para outros fins (elas somente serão utilizadas de acordo com os objetivos deste trabalho e após uso serão devidamente descartadas). O(a) senhor(a) receberá uma cópia deste documento e eu me colocarei à disposição para eventuais esclarecimentos antes, durante e após a pesquisa. Declaro que, depois de esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar desse Projeto de Pesquisa.

Alfenas, _____ de _____ de 20_____.

Assinatura do (a) doador (a)

Assinatura do (a) pesquisador (a)

Para maiores informações, dúvidas e esclarecimentos sobre a pesquisa, falar com Carolina Nasser Boscari - telefone: (35) 9194 4155; e-mail: carolina.boscari@unifalmg.edu.br; endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro - Alfenas. Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unifal - MG, Alfenas, MG.