

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG**

**Marcela Marília de Lima**

**Emprego de um polímero de impressão molecular  
restrito à ligação com macromoléculas por meio de  
revestimento com albumina para extração on-line de  
ivermectina em carne bovina seguido de análise por  
HPLC-UV.**

**Marcela Marília de Lima**

**Emprego de um polímero de impressão molecular restrito à  
ligação com macromoléculas por meio de revestimento com  
albumina para extração on-line de ivermectina em carne bovina  
seguido de análise por HPLC-UV.**

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

Alfenas - MG  
2013

Lima, Marcela Marília de.

Emprego de um polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina para extração on-line de ivermectina em carne bovina seguido de análise por HPLC-UV / Marcela Marília de Lima. - 2013.

57 f. -

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Impressão Molecular. 2. Extração em Fase Sólida. 3. Ivermectina. 4. Carne. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD: 615.9

**Marcela Marília de Lima**

**Emprego de um polímero de impressão molecular restrito à  
ligação com macromoléculas por meio de revestimento com  
albumina para extração on-line de ivermectina em carne bovina  
seguido de análise por HPLC-UV.**

A Banca Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Prof. Ricardo Mathias Orlando  
Instituição: Universidade Estadual de Campinas Assinatura: Ricardo Mathias Orlando

Prof. Patrícia Fênido Magia de Alvarenga  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: Patrícia F. M. de Alvarenga

Prof. Eduardo Costa de Figueiredo  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: E. Figueiredo

## Agradecimentos

Neste momento, ao ver este trabalho finalizado sinto uma emoção enorme e me lembro de que este trabalho só foi possível com a ajuda de pessoas que estiveram ao meu lado nesta caminhada. Portanto este é também o momento de agradecer.

Agradeço a Deus por me dar força, saúde e fé para persistir.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência, pela dedicação e por me ensinar a ser muito mais que mestre. Tenho certeza de que não poderia ter feito melhor escolha.

Agradeço a todos os meus colegas do LATF, que foram como uma família nestes últimos anos. Juntos compartilhamos nossas angustias, conquistas e comemorações o que tornou o trabalho mais prazeroso. Em especial, quero agradecer ao André Coutinho pela colaboração na realização dos experimentos.

Agradeço aos meus pais, por compreenderem a minha ausência e pelo amor incondicional que me fortalece a seguir em frente sempre.

Agradeço ao Leandro, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me incentivando e apoiando.

Agradeço aos meus colegas de trabalho pelo incentivo e pela compreensão. Agradeço principalmente, à colega Patrícia Penido pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço à UNIFAL-MG pela oportunidade.

Sem vocês, eu não teria conseguido chegar ao fim. Assim, posso dizer que esta conquista é nossa. Muito Obrigada!

## Resumo

A ivermectina (IVM) é um antiparasitário mundialmente utilizado na criação de animais. No entanto, quando o tempo de carência não é respeitado, resíduos de IVM são encontrados nos produtos de origem animal podendo causar danos à saúde humana. Assim, foi estabelecido em diversos países um limite máximo de resíduo (LMR) para este fármaco. Portanto, amostras de carne contendo IVM acima dos valores estabelecidos são consideradas adulteradas e têm sido a causa do embargo das exportações de carne bovina do Brasil, que é atualmente o maior país exportador deste produto no mundo. Os níveis de resíduos de IVM nos tecidos geralmente são muito baixos, pois este fármaco é capaz de produzir efeito terapêutico em pequenas doses. Assim, é necessário o emprego de técnicas sensíveis e seletivas de preparo de amostras e análise para verificar a presença de IVM em carne. Neste sentido, o principal objetivo deste trabalho foi sintetizar um polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAMIP-BSA), e empregar o mesmo na extração *on-line* de IVM em extratos proteicos de carne bovina, seguido de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por absorção no ultravioleta (UV). A IVM foi inicialmente extraída de amostras de carne moída empregando-se uma mistura de metanol:água (70:30, v/v), e o extrato resultante foi diretamente analisado pelo sistema *on-line* de extração e separação. O método apresentou linearidade na faixa de 50 a 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  com precisão de 3,8 a 17,0% e exatidão de -18,5 a 22,0%. Os limites de detecção e quantificação foram de 30 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente, sendo menores que o LMR para IVM em carne bovina que é de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O método foi considerado robusto e seletivo, tendo sido empregado com sucesso na monitorização de IVM em amostras de carne bovina.

**Palavras Chave:** Polímeros de impressão molecular. Materiais de acesso restrito. Preparo de amostras. Ivermectina. Carne bovina.

## Abstract

Ivermectin (IVM) is an antiparasitic drug worldwide used in livestock. However, when the grace period is not respected, IVM residues can be found in animal source products and can cause damages to the human health. Thus, it was established in many countries a maximum limit of residue (MRL) to this drug. Therefore, meat samples that contain IVM above the established values are considered adulterated and have been the cause of exportations embargo of meat from Brazil. IVM is able to produce a therapeutic effect even in lower doses. Hence, the residues levels in the tissues are usually very low, which makes necessary the use of selective and sensitive techniques of sample preparation and analysis. Thus, the main objective of this work was to synthesize a restricted access molecularly imprinted polymer coated with bovine serum albumin (RAMIP-BSA) and to employ it in the on-line extraction of IVM in minced meat samples, followed by a high performance liquid chromatography (HPLC) with an UV detector. The method has shown linearity from 50 to 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , with precision and accuracy ranging from 3.8 to 17.0 and from -18.5 to 22.0, respectively. The detection and quantification limits were 30 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectively. The method can be used in the monitoring of IVM in beef samples.

**Keywords:** Molecularly imprinted polymers. Restrict access materials. Sample preparation. Ivermectin. Beef.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABM** - Abermectina

**AIBN** - 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila

**ALC** - Agente de ligação cruzada

**AVM** - Avermectina

**BSA** - Albumina de soro bovino

**CLAE** - Cromatografia líquida de alta eficiência

**DPR** - Desvio padrão relativo

**EGDMA** - Etileno glicol dimetacrilato

**GDMA** - Glicerol dimetacrilato

**GMA** - Glicidil metacrilato

**GMMA** - Glicerol monometacrilato

**HEMA** - 2-hidroxietil metacrilato

**HPLC** - *High performance liquid chromatography*

**IR** - Iniciador radicalar

**IVM** - Ivermectina

**LMR** - Limite máximo de resíduo

**MAPA** - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

**MBM** - Milbemicinas

**MEV** - Microscopia eletrônica de varredura

**MF** - Monômero funcional

**MIP** - Polímero de impressão molecular

**MM** - Molécula modelo



**MSPE** - Microdispersão em fase sólida

**RAM** - Material de acesso restrito

**RAMIP** - Polímero de impressão molecular restrito a ligação de macromoléculas

**RAMIP-BSA** - Polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina de soro bovino

**TR** - Tempo de retenção

**UV** - Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Estrutura química das avermectinas.....	15
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura química da ivermectina.....	16
<b>Figura 3 -</b>	Esquema genérico da síntese de um MIP.....	19
<b>Figura 4 -</b>	Esquema genérico da síntese de um RAMIP.....	22
<b>Figura 5 -</b>	Sistema de síntese do polímero.....	28
<b>Figura 6 -</b>	Esquema de síntese do RAMIP-BSA.....	30
<b>Figura 7 -</b>	Esquema dos sistemas utilizados no teste de eliminação de macromoléculas sem (A) e com (B) a presença da coluna de RAMIP-BSA.....	31
<b>Figura 8 -</b>	Sistema <i>column switching</i> nas posições de amostragem (A), extração (B), eluição e separação (C).....	33
<b>Figura 9 -</b>	Micrografia eletrônica de varredura do RAMIP (A) e do RAMIP-BSA (B).....	36
<b>Figura 10 -</b>	Espectros de infravermelho do RAMIP e do RAMIP-BSA.....	37
<b>Figura 11 -</b>	Cromatogramas obtidos pela análise de 25 $\mu\text{L}$ de um padrão de BSA ( $44 \text{ mg mL}^{-1}$ ) sem o emprego de coluna e com a utilização da coluna RAMIP-BSA.....	38
<b>Figura 12 -</b>	Influência dos diferentes solventes testados para a extração de IVM em carne na resposta analítica.....	40
<b>Figura 13 -</b>	Gráfico dos diferentes volumes de metanol:água testado para extração de IVM em carne e suas respectivas áreas.....	41
<b>Figura 14 -</b>	Curva de calibração obtida pela análise de IVM em carne no intervalo de concentrações de 50 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ .....	45
<b>Figura 15 -</b>	Cromatogramas obtidos pela análise de uma amostra de carne sem fortificação (A), de uma amostra de carne fortificada com IVM na concentração 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B) e de uma amostra de carne fortificada com IVM na concentração 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (C).....	47
<b>Figura 16 -</b>	Diagrama de Pareto para análise da robustez.....	48
<b>Figura 17 -</b>	Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de carne.....	49

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 -</b>	Planejamento fatorial para análise da robustez.....	34
<b>Tabela 2 -</b>	Resultados de precisão e exatidão obtidos da análise de IVM em carne através método proposto.....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 Ivermectina	14
1.2 Polímeros de impressão molecular (MIP)	17
1.3 Materiais de acesso restrito (RAM)	20
1.4 Polímeros de impressão molecular restrito a ligação de macromoléculas (RAMIP)	21
1.5 Preparo de amostras	24
<b>2. OBJETIVOS</b>	25
2.1 Gerais	25
2.2 Específicos	25
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	26
3.1 Equipamentos e acessórios	26
3.2 Reagentes e soluções	27
3.3 Síntese do RAMIP-BSA	27
3.4 Caracterização dos polímeros	30
3.5 Amostras	31
3.6 Sistema <i>Column Switching</i>	32
3.7 Validação analítica	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	35
4.1 Síntese do RAMIP-BSA	35
4.2 Caracterização dos polímeros	36
4.3 Otimização do método	38
4.3.1 Otimização da etapa de extração com solvente	39
4.3.2 Otimização das variáveis do sistema <i>Column Switching</i>	42
4.4 Validação analítica	44
<b>5. ANÁLISE DE AMOSTRAS</b>	49
<b>6. CONCLUSÕES</b>	50
<b>REFERÊNCIAS</b>	51

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos na criação de animais é uma prática frequente nos dias atuais. Diversos medicamentos vêm sendo empregados para fins profiláticos, terapêuticos ou como promotores de crescimento. Dentre eles, destaca-se o uso dos antiparasitários que são medicamentos utilizados com a finalidade de evitar a perda de peso e manter a saúde dos animais por meio do combate a parasitas. A ivermectina (IVM) é um dos antiparasitários mais utilizados no mundo devido ao seu amplo espectro de ação. No entanto, quando o período de carência não é observado, resíduos deste fármaco podem ser encontrados nos alimentos de origem animal, causando danos à saúde humana<sup>1</sup>. Assim, limites máximos de resíduos (LMR) para este fármaco em carne bovina foram estabelecidos em diversos países.

Cabe destacar que devido à extensão territorial e às condições climáticas favoráveis, o Brasil é atualmente o maior país exportador de carne bovina do mundo<sup>2</sup>. No entanto, nos últimos anos vários episódios foram documentados em relação ao embargo das exportações de produtos de origem animal provenientes do Brasil, principalmente a carne bovina. Dentre os motivos, destaca-se o nível de resíduos de medicamentos veterinários acima dos limites máximos permitidos pela legislação dos países importadores. A IVM já foi responsável pelo embargo da carne oriunda do Brasil pelo Japão, Estados Unidos, países da Comunidade Europeia dentre outros<sup>3</sup>.

A IVM é um fármaco extremamente potente, sendo mesmo em pequenas doses capaz de produzir efeito terapêutico. Assim, os níveis de resíduos deste medicamento nos tecidos animais geralmente são muito baixos. Os métodos descritos para análise de IVM em carne geralmente empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada a detectores sensíveis como o de fluorescência e o espectrômetro de massas<sup>4</sup>. No entanto, a presença de proteínas nas amostras de carne pode limitar o emprego destes métodos, pois elas podem danificar o equipamento, comprometendo a eficiência da análise<sup>5</sup>. Assim, é necessário que a etapa de preparo de amostra seja criteriosamente planejada. Devido à complexidade desta matriz, este processo geralmente é realizado em duas etapas. Primeiramente os analitos são extraídos com um solvente sendo sequencialmente realizada a extração

em fase sólida. Além disso, quando o detector de fluorescência é empregado é necessário realizar a derivatização da amostra já que a IVM é um composto que não fluoresce em sua forma inalterada.

Poucos trabalhos descrevem o emprego da CLAE com detector ultravioleta (UV) na análise de IVM em carne, devido à sua menor sensibilidade em relação a outros detectores<sup>4</sup>. No entanto, seu emprego torna-se possível desde que seja realizado um preparo de amostra adequado, a fim de pré-concentrar os analitos de interesse. Além disso, é necessário eliminar as proteínas presentes nas amostras a fim de proteger o equipamento de análise. Neste contexto, o emprego dos polímeros de impressão molecular restritos à ligação com macromoléculas (RAMIP) vem ganhando destaque. Devido à alta seletividade e capacidade de eliminação de macromoléculas destes materiais, é possível realizar o preparo da amostra através do sistema *column switching*, o qual é acoplado ao cromatógrafo através do emprego de válvulas, o que permite diminuir consideravelmente o tempo de análise.

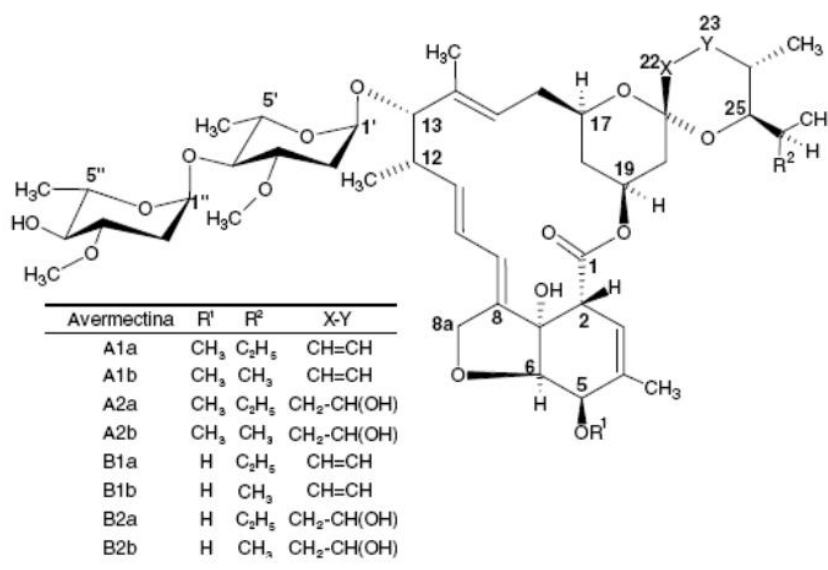
A segurança alimentar é um tema cada vez mais relevante, devido à crescente busca por uma melhor qualidade de vida e conscientização dos consumidores quanto ao direito de adquirir produtos seguros à saúde. Além disso, a carne é um produto de grande importância na economia brasileira. Assim é de grande interesse o desenvolvimento de métodos mais práticos, simples e com sensibilidade e seletividade adequadas para análise de IVM na carne bovina.

## 1.1 Ivermectina

A IVM é um antiparasitário semissintético, pertencente à classe das avermectinas e à família das lactonas macrolíticas, produzido originalmente pela fermentação da espécie *Streptomyces avermitilis*. É um fármaco extremamente potente capaz de produzir atividade antiparasitária em pequenas doses contra os dois maiores filos de parasitas, os nematóides e os artrópodes, sendo por isso amplamente utilizado na medicina veterinária<sup>1</sup>.

As lactonas macrolíticas tiveram sua atividade antiparasitária descoberta em 1974, quando o microrganismo *Streptomyces avermitilis* foi isolado de uma

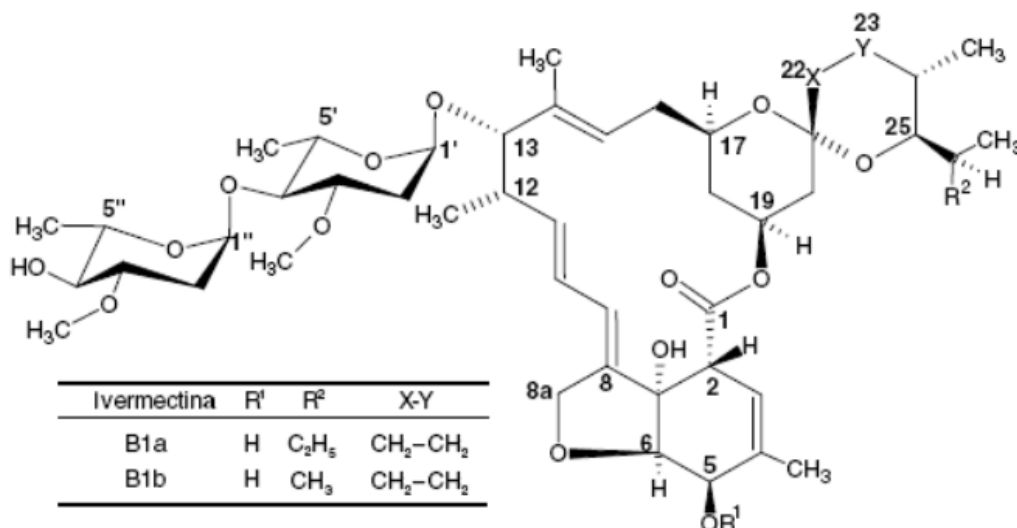
amostra de solo no Japão e demonstrou, após testes *in vivo*, apresentar propriedades antihelmínticas<sup>6</sup>. As substâncias isoladas foram classificadas em avermectinas (AVM) e milbemicinas (MBM) embora apresentassem estruturas e propriedades físico-químicas semelhantes<sup>7</sup>. A diferença estrutural entre as AVM e as MBM é um substituinte dissacarídeo e monocarídeo, respectivamente, na posição 13 do anel macrolítico (Figura 1). Além disso, as AVM foram subdivididas em oito diferentes tipos de acordo com os radicais ligados nos carbonos 5 e 25 do anel macrolítico e com os substituintes e ligação entre os grupos X e Y<sup>8</sup>, como mostra a Figura 1.



**Figura 1** – Estrutura Química das avermectinas (adaptada de M. LI et al.<sup>8</sup>)

Dentre os compostos descobertos, a AVM B1a e a AVM B1b apresentaram atividades idênticas e foram consideradas as mais importantes AVM produzidas pelo fungo *Streptomyces avermitilis*. Atualmente são conhecidas comercialmente como Avermectina (ABM) e são produzidas em uma mistura contendo de 80% da AVM B1a e 20% da e AVM B1b<sup>9</sup>.

A IVM foi sintetizada em 1981 pelos cientistas da Merck Sharp and Dohme pela saturação da ligação entre os carbonos 22 e 23 da ABM, onde obteve-se um composto mais eficaz e seguro, por apresentar excelente atividade antiparasitária aliado a baixa toxicidade<sup>10</sup>. A Figura 2 mostra a estrutura da IVM.



**Figura 2** – Estrutura Química da Ivermectina (22,23 diidroavremectina B1a e B1b) (adaptada de M. LI et al.<sup>9</sup>).

O mecanismo de ação da IVM se deve à sua capacidade de ligar-se aos receptores capazes de controlar a abertura dos canais de cloro no neurônio pós-sináptico. Após a ligação IVM-receptor, o canal de íons é aberto e o cloreto flui para o interior do neurônio pós-sináptico o que causa a hiperpolarização da membrana e o bloqueio da transmissão dos impulsos elétricos, levando o parasita a morte por paralisia tônica da musculatura<sup>11</sup>.

O modo de administração da IVM afeta fortemente sua farmacocinética e por ser extremamente baixa a sua solubilidade em água, a principal via de administração é a aplicação subcutânea<sup>12</sup>. Devido ao seu caráter lipofílico, a IVM se acumula principalmente nos tecidos adiposos os quais funcionam como reservatório deste fármaco<sup>13</sup>. Estudos farmacocinéticos mostraram que este composto apresenta um grande volume de distribuição e um longo tempo de residência, sendo por isto encontrado no organismo muito tempo após sua administração<sup>14</sup>.

Embora a IVM não apresente propriedades mutagênicas e carcinogênicas, testes em laboratórios mostraram que este fármaco pode ser embriotóxico<sup>5</sup>. Sendo assim, foi estabelecido em diversos países, um LMR deste fármaco na carne bovina. Portanto, a carne contendo resíduos de IVM acima do LMR permitido é considerada um produto adulterado e tem sido a causa do embargo da exportação da carne brasileira.



O LMR de IVM em carne, segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>15</sup> e o Codex Alimentarius<sup>16</sup> é de 100 µg kg<sup>-1</sup>. Isto demonstra a necessidade do emprego de técnicas sensíveis de análise bem como a utilização de um adequado preparo da amostra, a fim de eliminar os interferentes majoritários como as macromoléculas, para que seja possível a análise de IVM em carne.

## 1.2 Polímeros de impressão molecular

Há muito tempo as interações biomoleculares (enzima-substrato, antígeno-anticorpo, fármaco-receptor) têm despertado o interesse de pesquisadores quanto à sua natureza seletiva. Principalmente nas últimas décadas, observa-se uma busca crescente por materiais sintéticos dotados de sítios seletivos de reconhecimento<sup>17</sup>. Estes materiais denominados polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymers*), são formados pela polimerização de unidades monoméricas na presença de uma molécula modelo (MM) a qual é posteriormente removida resultando em cavidades cuja forma, funcionalidade, tamanho e arranjo espacial são complementares à molécula impressa, o que torna o polímero seletivo a essa molécula<sup>18</sup>.

O principal mecanismo de formação dos MIPs é a polimerização pela formação de radicais livres. Diversas metodologias são descritas para a síntese dos MIPs, sendo que a mais utilizada é a polimerização em *bulk* devido à sua simplicidade e rapidez. Neste método, todos os reagentes são adicionados em uma ampola de síntese. A ampola é lacrada e submetida a aquecimento ou radiação UV para formação de radicais livres que dão início à síntese. Uma massa rígida é formada após síntese, a qual é posteriormente triturada e peneirada<sup>19</sup>. Apesar da simplicidade, esta técnica apresenta desvantagens como baixo rendimento além de resultar na formação de partículas heterogêneas.

Para superar esses inconvenientes, várias estratégias têm sido propostas como a polimerização por precipitação. A síntese por este método ocorre de maneira semelhante à síntese em *bulk*, no entanto um volume maior de

solvente é utilizado. A precipitação ocorre quando o polímero adquire densidade maior que a solução. Além disso, a formação do polímero ocorre sob agitação e aquecimento o que favorece a formação de partículas mais homogêneas<sup>20</sup>.

Outra metodologia empregada para obtenção de partículas mais homogêneas é a síntese por suspensão. Neste método, os reagentes são dissolvidos em um solvente orgânico e em seguida adicionados em uma fase polar dispersiva formando uma emulsão a qual é estabilizada por um tensoativo<sup>21</sup>.

Para garantir o reconhecimento molecular é necessário que os reagentes de síntese sejam criteriosamente selecionados<sup>22</sup>. Os principais componentes utilizados na obtenção do MIP são: a molécula modelo (MM), o monômero funcional (MF), o iniciador radicalar (IR), o agente de ligação cruzada (ALC) e o solvente.

A MM é utilizada para moldar estereoquimicamente os sítios de ligação. É importante observar a presença de grupos funcionais capazes de se ligar ao MF. Além disso, a MM não deve apresentar grupos que interfiram na formação do polímero<sup>23</sup>.

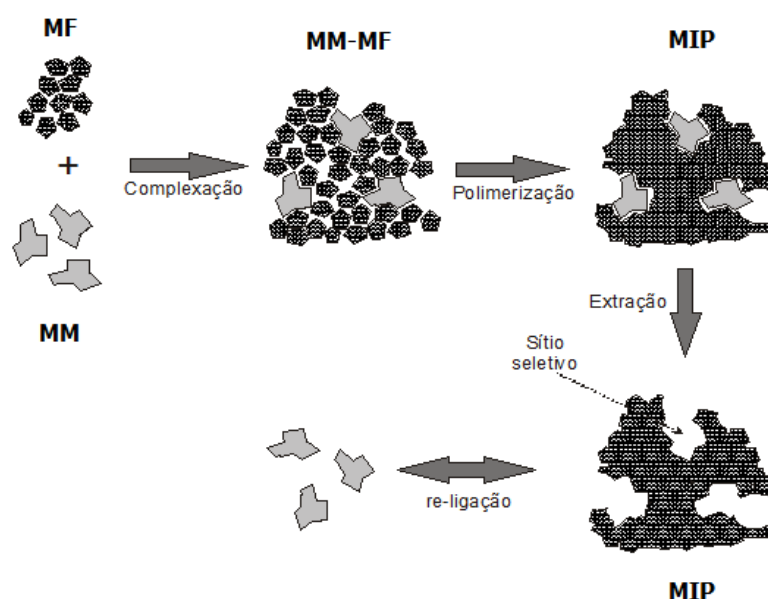
Para aumentar a seletividade do MIP, o MF deverá ser selecionado de acordo com os grupos funcionais presentes na MM, afim de estabelecer pontos de interação. A força das interações entre eles determina a seletividade do material. Além disso, é importante observar a proporção entre o MF e a MM, a qual deve ser determinada de acordo com o tipo de ligação que ocorre entre eles<sup>24</sup>.

O IR é responsável pela formação de radicais livres que possibilitam a polimerização. Para a formação de radicais é necessário empregar um estímulo físico como incidência de radiação UV ou aumento da temperatura. Além disso, é necessário eliminar o oxigênio do ambiente de síntese devido ao seu alto potencial de produzir radicais capazes de prejudicar a reação de polimerização<sup>17</sup>.

Outro componente envolvido na síntese de um MIP é o ALC, cuja função é conferir estabilidade mecânica, além de estabilizar o sítio de reconhecimento molecular e controlar a porosidade do polímero. Além disso, a escolha

adequada do agente de ligação cruzada pode afetar a hidrofobicidade, especialmente quando a amostra de interesse é uma matriz a base de água<sup>25</sup>.

A principal função do solvente é dissolver os reagentes da síntese. No entanto, é importante que ele não altere a formação do complexo MF-MM. Assim, a escolha adequada do solvente empregado na síntese do polímero é importante para garantir a estabilidade das interações. Além disso, essa escolha influencia diretamente nas características morfológicas do material<sup>26</sup>. Na Figura 3 podemos observar o esquema genérico da síntese do MIP.



**Figura 3** - Esquema genérico da síntese de um MIP

Os MIPs são classificados como covalentes, não covalente e semicovalente de acordo com o tipo de interação estabelecida entre a molécula modelo e o monômero funcional. A primeira abordagem envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre a MM e o MF. Assim, após a polimerização, a MM é retirada do polímero por quebra das ligações correspondentes. A principal vantagem é a formação de sítios de ligação mais homogêneos, que conferem uma maior seletividade ao polímero impresso. Em contrapartida, essa forte ligação dificulta o processo de remoção da MM, sendo necessário, em muitos casos, até procedimentos drásticos de hidrólise<sup>27</sup>.

A síntese não covalente se baseia na formação de interações relativamente fracas (ligações de hidrogênio, interações iônicas, forças de van der Waals) entre a MM e o MF selecionado. Esta abordagem é a mais usada para a preparação de MIP, devido à maior facilidade de retirada da molécula molde do polímero<sup>28</sup>. Contudo, esse tipo de síntese leva à formação de polímeros menos seletivos, pois se formam também sítios de ligação não específicos devido ao excesso de MF utilizado.

Finalmente uma opção intermediária é denominada de síntese semicovalente, na qual o processo de polimerização ocorre por ligações covalentes, garantindo assim a maior seletividade do MIP; enquanto que as demais interações do material são realizadas por ligações não covalentes, o que facilita o processo de remoção da MM<sup>29</sup>.

Os MIPs têm sido empregados principalmente na SPE para a extração seletiva de diferentes substâncias contidas em matrizes relativamente complexas<sup>30</sup>, como plasma<sup>31</sup>, saliva<sup>32</sup>, urina<sup>33</sup>, alimentos<sup>34</sup> e amostras ambientais<sup>35</sup>. Além disso, os MIPs são estáveis e extremamente robustos. Sua capacidade de reconhecer a MM pode permanecer inalterada após tratamento com ácidos, bases, solventes orgânicos e temperaturas altas<sup>18</sup>.

### 1.3 Materiais de acesso restrito

O termo materiais de acesso restrito (RAM do inglês *restrict access materials*) foi proposto pela primeira vez por Desilets et al., em 1991<sup>36</sup>, em referência a um sorvente especificamente desenhado para permitir a extração em fase sólida de pequenas moléculas limitando assim o acesso de moléculas maiores, como as proteínas<sup>37</sup>.

O mecanismo de eliminação de macromoléculas pelo RAM se deve à presença de grupos em sua superfície externa com capacidade de evitar a adsorção da matriz proteica. Por outro lado, estes materiais apresentam em seu interior poros pequenos (diâmetro < 8 nm) dotados de grupos ligantes capazes de capturar moléculas de baixo peso molecular<sup>38</sup>. Desse modo, no momento da extração, os analitos de interesse (de baixo peso molecular) penetram nos poros e são retidos pelos grupos ligantes, enquanto que as

macromoléculas são percoladas para o descarte sem que haja retenção das mesmas na coluna RAM<sup>39</sup>.

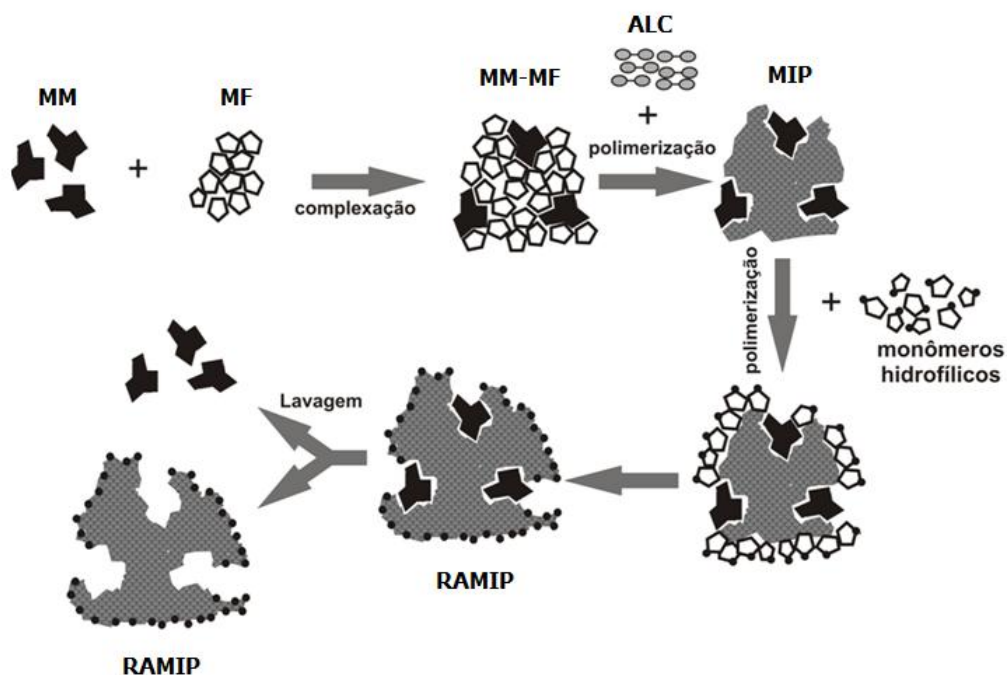
A restrição por tamanho é obtida por meio de barreiras físicas ou químicas. Uma barreira física é conseguida pela presença de grupos hidrofílicos na superfície do polímero, que impedem por diferença de afinidade, a adsorção de macromoléculas<sup>40</sup>. Por outro lado, o emprego de barreiras químicas também se apresenta como uma eficiente alternativa para a seleção molecular. Para tal, o procedimento mais comumente empregado é revestir o material adsorvente com uma rede polimérica, formando uma barreira semipermeável, que restringe o acesso de macromoléculas aos poros e permite a percolação dos analitos até os sítios de ligação do material adsorvente<sup>41</sup>.

Devido à sua alta capacidade de eliminar macromoléculas, os RAMs são frequentemente utilizados em sistema *on-line* de extração. As principais vantagens do emprego destes sistemas são: a melhoria da precisão e da exatidão, a maior recuperação do analito e o menor tempo de análise<sup>42</sup>.

#### **1.4 Polímeros de impressão molecular restritos à ligação de macromoléculas**

Os MIPs têm atraído atenção devido à sua alta seletividade. Entretanto, componentes presentes nas amostras, como proteínas e lipídeos, são fortemente adsorvidos nas superfícies poliméricas interferindo negativamente nas propriedades de reconhecimento<sup>43</sup>. Por outro lado, os RAMs apresentam uma excelente capacidade de eliminar macromoléculas, mas em contrapartida, não apresentam seletividade quando se avalia moléculas de baixo peso molecular. Neste contexto, um material que associa as vantagens de ambos os sorventes tem sido proposto. São os chamados polímeros de impressão molecular restritos à ligação de macromoléculas (RAMIPs), onde os polímeros são sintetizados pelos métodos tradicionais até um determinado tempo de reação, onde são adicionados ao sistema de síntese, monômeros hidrofílicos

para formação de uma camada externa protetora capaz de impedir a ligação de macromoléculas. A Figura 4 apresenta um esquema da síntese de um RAMIP.



**Figura 4-** Esquema genérico da síntese de um RAMIP.

Haginaga et al. foram os precursores dessa tecnologia quando propuseram, em 1999, um RAMIP seletivo ao naproxeno<sup>44</sup>. Uma mistura de glicerol monometacrilato (GMMA) e glicerol dimetacrilato (GDMA), na proporção de 1:1, foi adicionada ao polímero quatro horas após o início da síntese para formação da camada hidrofílica. Os testes demonstraram que o polímero apresentou boa seletividade e alta eficiência na eliminação de macromoléculas. Assim, o polímero obtido foi utilizado na análise direta de naproxeno em amostras de soro sanguíneo através do sistema *column switching*<sup>45</sup>. O mesmo grupo de pesquisa empregou esta metodologia na obtenção de polímeros para análise de anti-inflamatórios<sup>46</sup>, anti-epiléticos<sup>47</sup> e compostos fenólicos<sup>48</sup> em amostras de água de rio.

Outra forma de obter a camada hidrofílica externa no RAMIP é através da utilização de monômeros que se tornam hidrofílicos após um tratamento, como, por exemplo, monômeros que apresentam anel epóxi tais como o glicidil metacrilato (GMA)<sup>49</sup>. A camada hidrofílica é criada após a abertura do anel

epóxi da molécula de GMA, que geralmente é obtida utilizando uma solução de ácido perclórico. O emprego do GMA como monômero hidrofílico, foi descrito na obtenção de um RAMIP para análise de sulfonamidas em leite<sup>50</sup>.

Além disso, um RAMIP foi preparado empregando um glicomonômero para obtenção da camada hidrofílica. O glicomonômero foi previamente preparado e adicionado ao sistema durante a síntese. Após a síntese, uma solução de metóxido de sódio em metanol foi utilizada para promover a alcoólise do polímero para a formação da camada hidrofílica. O RAMIP obtido foi utilizado no preparo de amostras de soro para análise de fenobarbital<sup>51</sup>.

Por fim, a mais recente estratégia de obtenção RAMIP foi desenvolvida em nosso grupo de pesquisa e consiste no revestimento externo de um MIP com uma cápsula de albumina de soro bovino (BSA), resultando em um polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAMIP-BSA). O revestimento externo foi obtido por meio do entrecruzamento das cadeias de BSA empregando glutaraldeído. Assim, formou-se em torno do polímero uma cápsula proteica, a qual impediu a ligação de proteínas na superfície do RAMIP-BSA. O mecanismo de exclusão deve-se à repulsão eletrostática entre a capa de BSA e as proteínas da amostra que se encontram negativamente ou positivamente ionizadas quando o pH do meio é maior ou menor que o ponto isoelétrico das proteínas, respectivamente. Os analitos de baixo peso molecular conseguem se difundir por entre as cadeias de BSA e ligar-se aos sítios seletivos. O polímero obtido apresentou excelente capacidade de eliminação das macromoléculas e recuperação adequada do analito, tendo sido empregado com sucesso na extração *on-line* de clorpromazina em amostras de plasmas sanguíneo humano para análise por CLAE-UV<sup>52, 53</sup>.

Os RAMIPs têm sido utilizados na extração sequencial de diversas amostras sendo que normalmente não há modificação no desempenho da mesma<sup>54</sup>. Esse fato evidencia a possibilidade de utilização dos RAMIPs em análises automatizadas por CLAE, dispensando/minimizando o tratamento moroso das amostras.

## 1.5 Preparo de amostras

Diversas metodologias de preparo de amostras têm sido desenvolvidas a fim de possibilitar a análise de IVM em carne. O tratamento de amostras para análise de IVM em carne geralmente é mais extenso que em outras matrizes devido à complexidade da amostra. É comum a utilização de mais de um processo para promover a limpeza da amostra. A extração em fase sólida (SPE) é o método mais comumente descrito para o tratamento deste tipo de amostra<sup>55</sup>. Geralmente realiza-se a extração dos analitos da amostra com uso de solvente (ou mistura de solventes), seguido de uma extração em fase sólida empregando C8 ou C18, polímeros, dentre outros<sup>55</sup>.

A microdispersão em fase sólida (MSPE) também foi relatada para o tratamento de amostras para análise de IVM em tecidos. Iosifidou et al.<sup>56</sup> empregaram esta metodologia na extração de IVM em salmão através da agitação da amostra com o material dispersante (C18). Sequencialmente a mistura foi empacotada em um cartucho de extração em fase sólida para a eluição dos analitos.

Tway et al. extraíram IVM em carne de ovelha empregando uma mistura de acetonitrila e água seguida do particionamento empregando isoctano<sup>57</sup>. Os extratos obtidos foram posteriormente submetidos a uma etapa adicional de precipitação e particionamento antes da análise.

Vale ressaltar que quando a análise da amostra é realizada por CLAE com detector de fluorescência é necessário realizar ainda a derivatização da IVM, uma vez que a mesma não fluoresce em sua forma inalterada.

Neste trabalho, foi sintetizado um RAMIP-BSA para IVM o qual foi empregado na extração *on-line* em fase sólida através do sistema *column switching*. Este sistema é utilizado para permitir o acoplamento dos componentes do sistema de extração em fase sólida ao sistema cromatográfico, através do emprego de válvulas. A principal vantagem do seu emprego é a possibilidade de injeção direta da amostra no equipamento, o que diminui consideravelmente o tempo de análise por dispensar ou minimizar o tratamento moroso das amostras. Assim, o sistema *column switching* foi empregado na pré-concentração de IVM em extratos de amostras de carne bovina. As amostras foram analisadas por CLAE-UV, dispensando a etapa de



derivatização. Portanto, o preparo de amostras desenvolvido permitiu realizar análise das amostras de carne de um modo mais rápido, prático e econômico que os métodos tradicionalmente descritos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Este trabalho tem por objetivo principal o desenvolvimento de um método de extração *on-line* em fase sólida empregando um RAMIP-BSA como sorvente para a extração seletiva e pré-concentração de IVM em amostras de carne bovina seguido da análise por CLAE-UV.

### 2.2 Específicos

- Síntese do RAMIP-BSA;
- Caracterização dos polímeros;
- Desenvolvimento do método de extração *on-line* em fase sólida para analisar resíduos de IVM em extratos de carne bovina, seguido da análise por CLAE-UV;
- Otimização das condições de análise e extração de amostras;
- Validação do método desenvolvido;
- Aplicação do método desenvolvido na análise de amostras de carne bovina adquiridas no comércio de Alfenas.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Equipamentos e acessórios

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de absorção no ultravioleta/visível (Shimadzu, Japão) operando a 245 nm. Uma válvula manual de seis vias modelo 7725i (Shimadzu, Japão) e uma válvula de seis vias de acionamento eletrônico modelo 11R-0016H (Valco Instruments, EUA) foram empregadas na montagem do sistema *column switching*. A coluna analítica empregada foi uma C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) (Alltech, EUA). Uma bomba a vácuo (New Pump, EUA) e um banho de ultrassom (Unique, Brasil) foram utilizados para filtração e degaseificação da fase móvel.

Na etapa de síntese, empregou-se uma balança analítica (Shimadzu, Japão) e uma chapa aquecedora com sistema de agitação (Novatecnica, Brasil). Para realizar a limpeza e do revestimento do polímero, foi utilizado um sistema de vácuo tipo *manifold* (Supelco, EUA). A morfologia dos polímeros foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico de varredura LV-JSM 6360 (Jeol, Japão). Para obtenção dos espectros de infravermelho foi utilizado um espectrômetro por transformada de Fourier (Shimadzu, Japão) acoplado a um acessório de refletância total atenuada (Pike Technologies, EUA).

Na etapa de preparo de amostra, foram empregados um agitador de tubos (IKA, Brasil) e uma centrífuga (Novatecnica, Brasil) para realizar a extração das amostras de carne com solvente. A extração *on-line* em fase sólida foi realizada através do sistema *column switching*, o qual foi constituído por uma coluna de aço contendo o RAMIP-BSA acoplada em uma válvula de acionamento eletrônico (Valco Cheminert, EUA). Ainda para compor este sistema foram empregadas duas bombas (Shimadzu, Japão) e uma válvula manual (Shimadzu, Japão). O programa utilizado para acionar os comandos do sistema foi desenvolvido em nosso grupo de pesquisa em linguagem Visual Basic<sup>®</sup> (Microsoft, EUA).

### 3.2 Reagentes e soluções

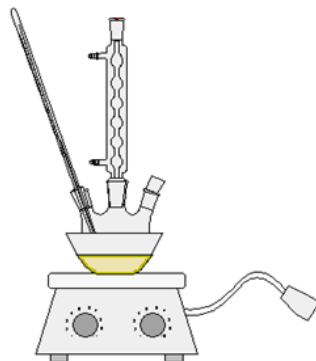
A água utilizada no preparo de amostras, soluções e fase móvel foi obtida em um sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Brasil). Acetonitrila e metanol, empregados no preparo da fase móvel e demais soluções, foram adquiridos da Vetec (Brasil), sendo todos de grau HPLC cromatográfico. Na síntese dos polímeros, o solvente empregado foi o clorofórmio (Vetec, Brasil). Os demais reagentes empregados na etapa de síntese – 4-vinilpiridina, etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), glicerol dimetacrilato (GDMA) e a IVM – foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Por fim, para formação do revestimento externo do polímero utilizou-se BSA (Sigma Aldrich, Alemanha), glutaraldeído (Rioquímica, Brasil) e borohidreto de sódio (Nuclear, Brasil).

Para a lavagem do polímero após a síntese foi empregada uma solução metanol:ácido acético (4:1, v/v). Para revestimento do polímero empregou-se uma solução de albumina bovina 1% em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH = 6,0, uma solução de glutaraldeído 25% em água e uma solução de borohidreto 1% em água. Os padrões utilizados nos testes foram preparados a partir de uma solução estoque de IVM 10 µg mL<sup>-1</sup> preparada em acetonitrila.

### 3.3 Síntese do RAMIP-BSA

A síntese do polímero ocorreu pelo método de precipitação, empregando-se, em uma primeira etapa, 35 mL de clorofórmio (solvente), 1 mmol de ivermectina (molécula modelo), 4 mmol de 4-vinilpiridina (monômero funcional), 7 mmol de EDGMA (agente de ligação cruzada), 25 mg de AIBN (iniciador radicalar). Todos os reagentes foram adicionados em um balão de fundo redondo com três bocas e a mistura foi então homogeneizada e degaseificada em atmosfera de nitrogênio por 10 min. Posteriormente o balão foi lacrado até ser acoplado no sistema de síntese, composto por uma chapa de aquecimento e agitação, um refratário de vidro contendo glicerina para proporcionar o aquecimento, um condensador para evitar a perda do solvente e

duas rolhas de silicone para vedar as outras aberturas do balão. Em uma dessas rolhas foi adaptado um termômetro para o monitoramento da temperatura do sistema. A Figura 5 ilustra o sistema de síntese.



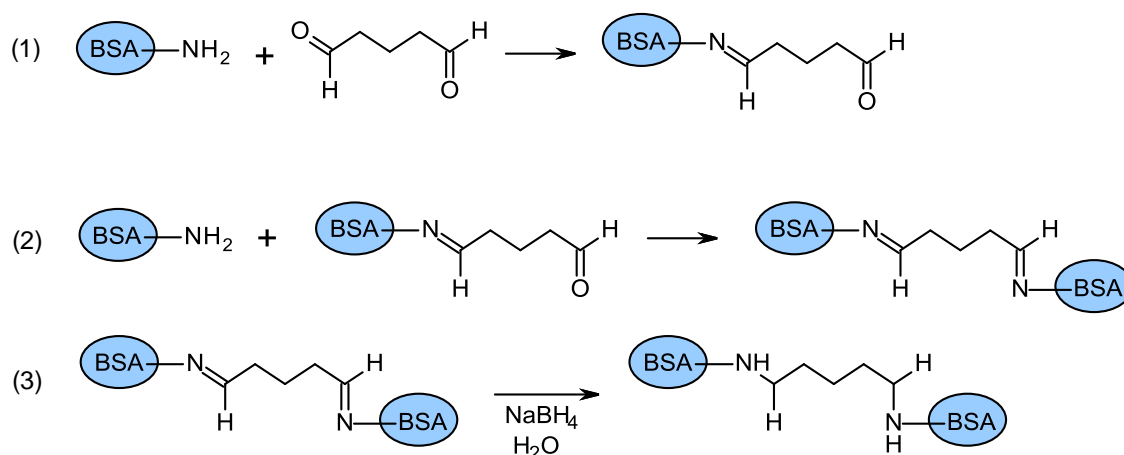
**Figura 5** - Sistema de síntese do polímero.

A primeira etapa da síntese descrita acima ocorreu a 60 °C sob agitação por exatamente 1 h. Após este tempo, adicionou-se ao sistema uma mistura, também previamente degaseificada, contendo os 7,5 mmol de HEMA, 0,5 mmol de GDMA e mais 35 mL de clorofórmio. A síntese foi então executada, sob as mesmas condições, por mais 23 h.

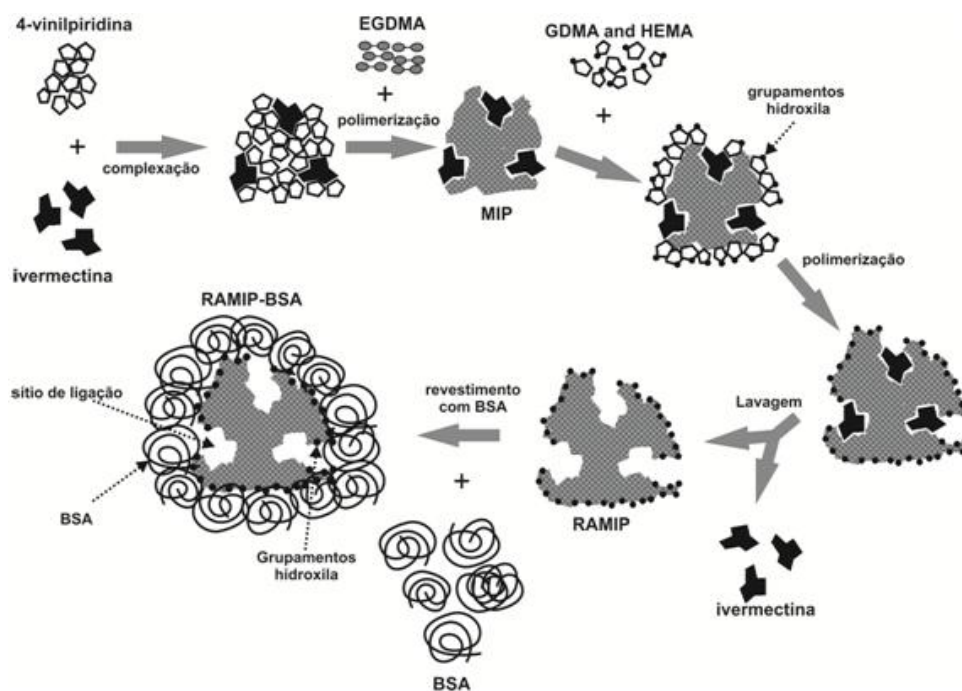
O material resultante, definido como RAMIP, foi colocado em um cartucho de SPE vedado somente na parte inferior, para ser lavado em um sistema a vácuo tipo *manifold*. Uma solução de metanol:ácido acético (4:1, v/v) foi percolada no RAMIP, em frações de 3 mL, até a total remoção da MM, a qual foi monitorada através de análise cromatográfica.

Após a limpeza do RAMIP, o mesmo foi recoberto ainda no cartucho de SPE, com uma camada de BSA, através da passagem de 20 mL de uma solução de albumina 1% (preparada em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH = 6,0) pelo polímero. Na sequência, 25 mL de uma solução de glutaraldeído 25% foi colocado em contato com o polímero durante 5 h, para possibilitar a ligação entre as moléculas de albumina resultando assim na formação de uma capa de BSA entrecruzada ao redor do polímero. No entanto, a reação entre o glutaraldeído e a albumina resulta na formação de iminas, que são compostos pouco estáveis. Assim, 5 mL de uma solução de borohidreto 1% foi empregada para reduzir as iminas em aminas que são compostos estáveis. As reações

químicas envolvidas na formação do revestimento com BSA estão representadas abaixo. Na etapa 1 está representado a reação que ocorre entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído. Em 2 está representado a reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula de albumina, permitindo assim a formação da rede de BSA em volta do RAMIP. Por fim, em 3 está representado a conversão das iminas em aminas com a adição do borohidreto.



Após o revestimento, o polímero obtido foi então denominado RAMIP-BSA. Para garantir a homogeneidade do revestimento, o polímero foi agitado durante esta etapa pela extremidade superior do cartucho de SPE, com o auxílio de um bastão de vidro. A Figura 6 apresenta o esquema de síntese do RAMIP-BSA.



**Figura 6** – Esquema de síntese do RAMIP-BSA

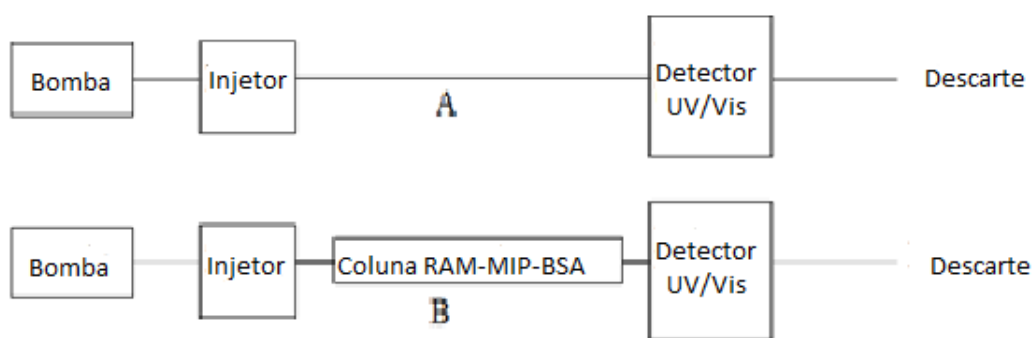
### 3.4 Caracterização dos Polímeros

O polímero sintetizado foi caracterizado antes e após o revestimento com BSA, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) após metalização com uma camada de 10 nm de ouro. As análises foram executadas em voltagem de 15 keV.

A espectroscopia de absorção do infravermelho com transformada de Fourier foi empregada para comparar os grupos funcionais presentes nos polímeros. Esta determinação foi possível devido à presença de ligações covalentes que absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho no espectro eletromagnético.

Para avaliar o RAMIP-BSA quanto à capacidade de eliminação de macromoléculas, uma massa de 0,15 g do polímero foi introduzida com o auxílio de uma espátula em uma coluna de aço (10 x 4 mm). Primeiramente, foram analisados 25  $\mu\text{L}$  de um padrão aquoso contendo 44  $\text{mg mL}^{-1}$  de BSA em um cromatógrafo sem a presença de nenhuma coluna, operando com detector UV a 254 nm e utilizando água deionizada como fase móvel. Assim, a

área obtida corresponde a 100 % de recuperação de BSA, pois toda BSA injetada atingiu o detector. Em seguida, a coluna RAMIP-BSA foi colocada no percurso analítico e novamente 25  $\mu\text{L}$  do mesmo padrão de BSA foram analisados utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente. A BSA fluiu através do polímero e a área obtida foi empregada para avaliar o percentual de BSA não retido no RAMIP-BSA, por meio de comparação com a área correspondente a 100 % de BSA. A Figura 7 mostra os sistemas de análise descritos.



**Figura 7** - Esquema dos sistemas utilizados no teste de eliminação de macromoléculas sem (A) e com (B) a presença da coluna de RAMIP-BSA.

### 3.5 Amostras

As amostras de carne utilizadas nas análises foram adquiridas no comércio de Alfenas-MG. O tecido escolhido para análise foi o músculo conhecido popularmente como “patinho”, devido ao seu teor intermediário de gordura. As amostras foram moídas duas vezes em máquina própria para este fim ainda no açougue. Uma solução de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de IVM em acetonitrila foi utilizada para fortificar as amostras. Após a adição do padrão, a amostra foi vigorosamente agitada empregando-se um bastão de vidro, e deixada em repouso por 30 min, antes do procedimento de extração.

A IVM foi inicialmente extraída de 2 g da carne empregando-se 5 mL de uma mistura metanol:água (7:3, v/v) através de agitação em um agitador de tubos, a 2000 rpm por 30 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas

por 10 min a 490 g, e o sobrenadante foi analisado pelo sistema *column switching* descrito a seguir.

### 3.6 Sistema *column switching*

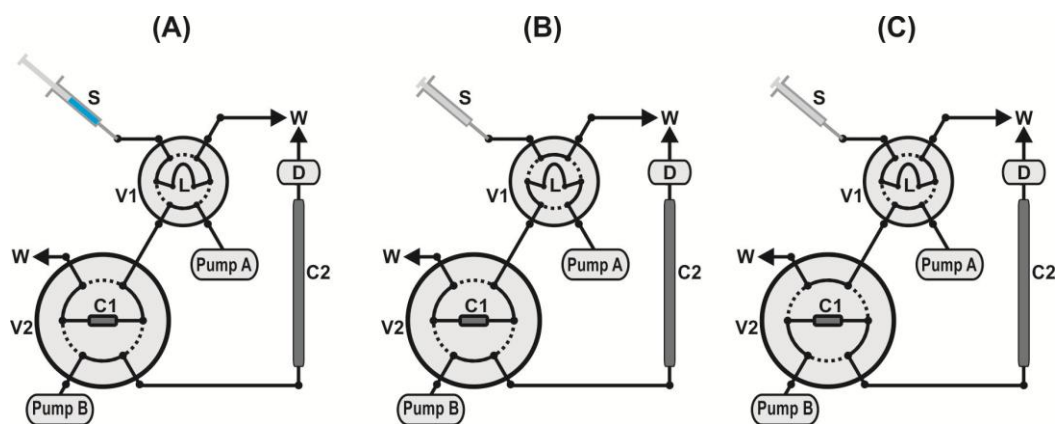
O sistema *column switching* foi utilizado para permitir o acoplamento do sistema de SPE ao sistema cromatográfico. Assim, foi possível realizar o preparo das amostras de carne diretamente no cromatógrafo após o processo de extração com solvente.

Primeiramente, foram definidas as condições da análise cromatográfica da IVM com base na literatura<sup>58</sup>. Algumas adaptações foram realizadas e ao final dos testes, as melhores condições de análise foram obtidas com uma coluna analítica C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel acetoneitrila:metanol:água (60:30:10, v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda do detector fixado em 245 nm.

O sistema de extração, mostrado em detalhes na Figura 8, foi constituído de duas bombas de CLAE impulsionando água Milli-Q (bomba A) e fase móvel de separação (acetoneitrila:metanol:água 60:30:10, v/v) (bomba B). A bomba A foi conectada a uma válvula de injeção manual (V1) onde foi também conectada a alça de amostragem. V1 foi conectada a outra válvula (V2) (acionada eletronicamente), onde estava acoplada à coluna RAMIP-BSA. A bomba B impulsionava a fase móvel de separação pela válvula V2 e sequencialmente pela coluna analítica e detector (245 nm). Cada análise foi dividida em 3 estágios, como mostrado na Figura 8. Primeiramente, a amostra foi injetada em V1 por meio de uma seringa, até o completo preenchimento da alça de amostragem (Figura 8A). V1 foi então acionada manualmente (Figura 8B), e o volume contido na alça de amostragem fluiu através da coluna RAMIP-BSA a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, durante 354 s. Ao mesmo tempo, um sinal elétrico foi enviado ao computador, iniciando a aquisição dos sinais. Sequencialmente, a válvula V2 foi acionada (Figura 8C), e a fase móvel (acetoneitrila:metanol:água 60:30:10, v/v) eluiu os compostos retido na coluna RAMIP-BSA a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, conduzindo-os para a coluna analítica e detector. Após 100 s, a válvula V2 foi novamente acionada recolocando o



sistema na posição da Figura 8B. A corrida cromatográfica foi conduzida até 25 min.



**Figura 8** - Sistema *column switching* nas posições de amostragem (A), extração (B) e eluição e separação (C).

### 3.7 Validação analítica

Com a finalidade de demonstrar que o método desenvolvido é adequado para a análise proposta, foi realizada a validação analítica. Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez e limites de detecção e quantificação. Os testes foram realizados utilizando amostras de carne fortificadas, preparadas como descrito no item 3.5.

A curva de calibração foi construída no intervalo de 50 a 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a fim de analisar concentrações próximas ao LMR de IVM em carne que é de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A linearidade foi avaliada com base no coeficiente de correlação obtido.

A precisão foi determinada por meio da análise da repetitividade, expressa através da concordância dos resultados de análise realizadas em um único dia, pelo mesmo instrumentador e da precisão intermediária ou reprodutibilidade que analisa os resultados obtidos em dias diferentes e analisadores diferentes. Foram analisadas amostras fortificadas (n=6) com 50, 200 e 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de IVM. A precisão foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (DPR) obtido pela seguinte equação:

$$DPR = \frac{sd}{\bar{x}} \times 100$$

onde  $sd$  é o desvio padrão das leituras e  $\bar{x}$  é a média.

A exatidão intradia e interdia foi avaliada por meio do cálculo erro relativo (E), conforme a equação abaixo:

$$E = \frac{CA - CN}{CN} \times 100$$

onde CA é a concentração analisada e CN é a concentração nominal obtida através da equação da curva de calibração.

A seletividade do método foi demonstrada através da comparação da análise de amostras sem fortificação e de amostras fortificadas para avaliar a presença de interferentes no tempo de retenção (TR) da IVM.

A robustez foi avaliada com o objetivo de verificar a capacidade do método em resistir a pequenas variações. Assim, avaliou-se a influência da variação do volume de solvente empregado na extração das amostras de carne, o tempo de agitação de amostras e o comprimento de onda do detector. As amostras de carne analisadas foram todas fortificadas com  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  de IVM. A variação dos parâmetros foi de 5 % e os testes foram realizados através de planejamento fatorial descrito na Tabela 1.

**Tabela 1-** Planejamento fatorial para análise da robustez.

Parâmetros analíticos	Nominal (+)	Variação (-)	combinação fatorial dos ensaios			
			1	2	3	4
Comprimento de onda/ nm	245	233	-	+	-	+
Volume de extração/ mL	5,00	4,75	-	-	+	+
Tempo de agitação/ min	30,0	28,5	+	+	-	+

O limite de quantificação foi determinado experimentalmente como sendo a menor concentração analisada com precisão e exatidão. O limite de detecção foi considerado como sendo a concentração que gera um sinal 3 vezes maior que o ruído da linha base.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

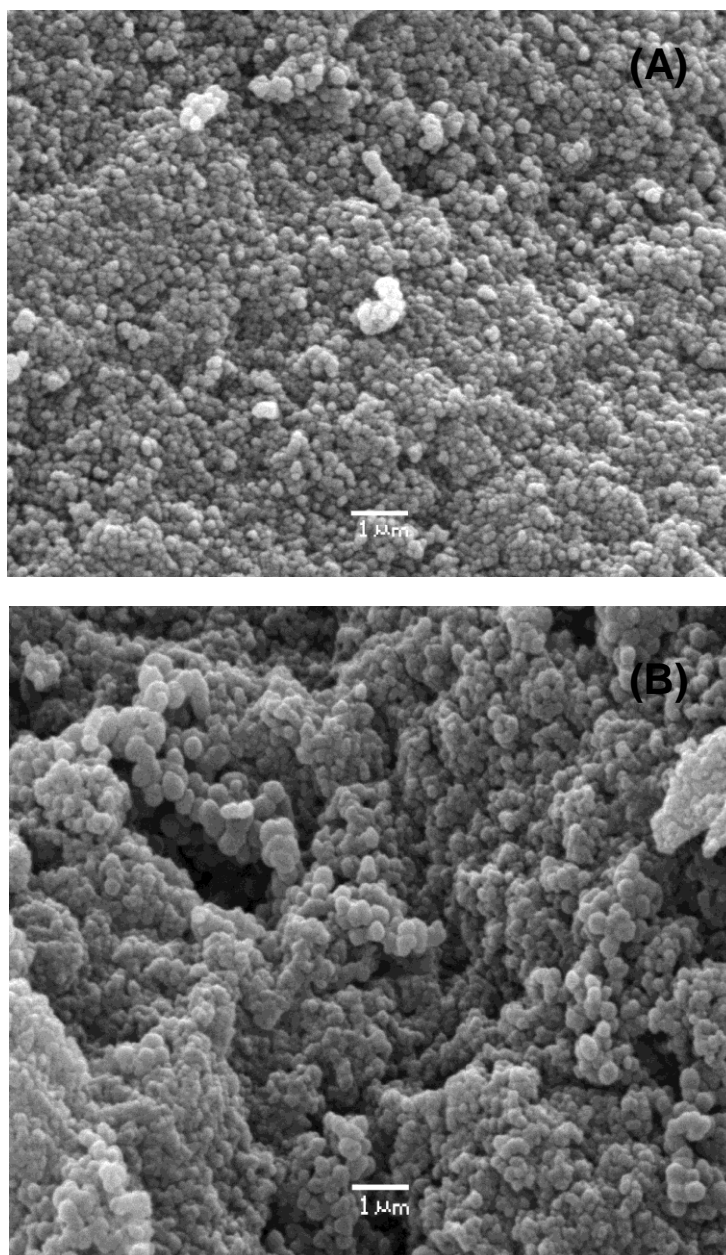
### 4.1 Síntese do RAMIP-BSA

O método de síntese, bem como a proporção dos reagentes utilizados foram selecionados com base nos resultados obtidos em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, o qual empregou um RAMIP-BSA na extração *on-line* de clorpromazina em amostras de plasma<sup>52, 53</sup>.

Como o principal objetivo deste trabalho foi a obtenção de um polímero possível de ser empregado na extração *on-line* de amostras de carne, uma das principais preocupações era a capacidade do polímero obtido em eliminar as proteínas presentes nestas amostras. Assim, o HEMA e o GDMA foram empregados como co-monômeros por apresentarem o grupamento vinil, capaz de se integrar à rede polimérica, bem como terminações hidrofílicas representadas pelo grupamento OH, capazes de conferir uma proteção externa de natureza hidrofílica na superfície do polímero evitando a ligação das proteínas. Os monômeros hidrofílicos foram adicionados somente uma hora após o início da síntese a fim de evitar a interferência na formação dos sítios seletivos bem como melhorar o desempenho de formação da camada externa protetora. Além disso, o RAMIP foi também recoberto com BSA, pois foi demonstrado que o revestimento com proteína melhora sua performance na eliminação de macromoléculas.<sup>52,53</sup>

## 4.2 Caracterização dos polímeros

A caracterização dos materiais obtidos foi feita inicialmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 9 apresenta as imagens do RAMIP (A) e do RAMIP-BSA (obtido após o revestimento com BSA) (B). É visível o aumento do tamanho das partículas, o que pode ser explicado pela formação de uma cápsula proteica ao redor das partículas do polímero.



**Figura 9** - Micrografia eletrônica de varredura do RAMIP (A) e do RAMIP-BSA (B).

A Figura 10 mostra os espectros de infravermelho do RAMIP-BSA e do RAM-MIP. Como pode ser observado, os espectros foram muito semelhantes, o que demonstra que não houve diferença significativa no polímero antes e após o revestimento com BSA. No entanto, os picos correspondentes às vibrações de estiramento das ligações C-O ( $1145\text{ cm}^{-1}$ ) e C=O ( $1720\text{ cm}^{-1}$ ) foram menores no RAMIP-BSA, em relação aos demais picos. Isto se deve provavelmente à obstrução dos grupos hidroxila e carbonila, presentes principalmente no HEMA e no GDMA, causada pelo revestimento com BSA.

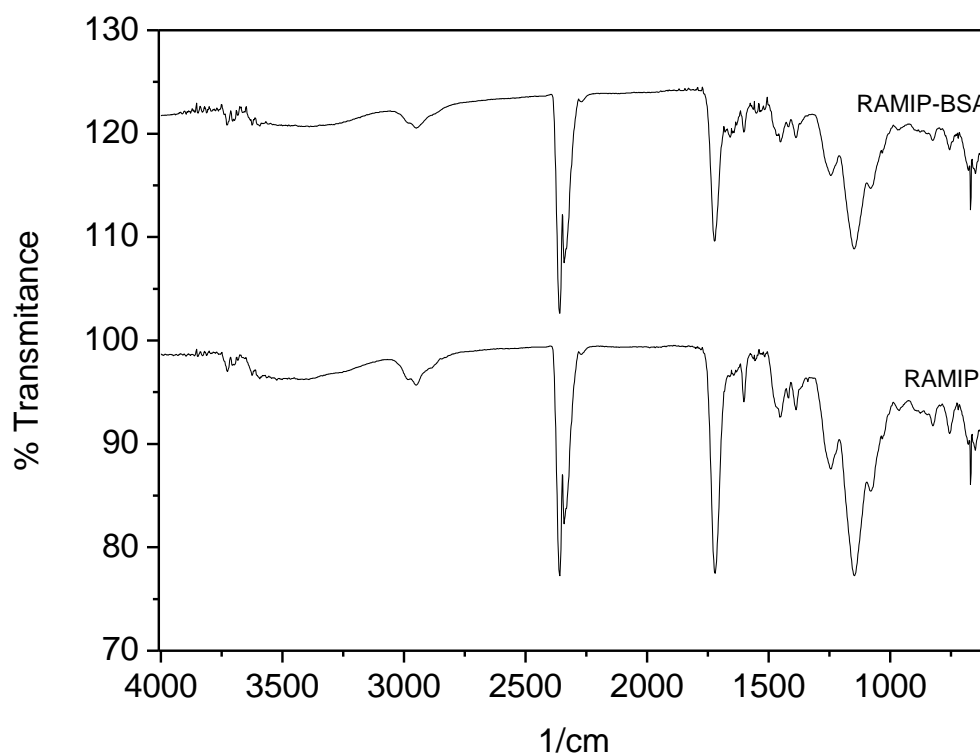
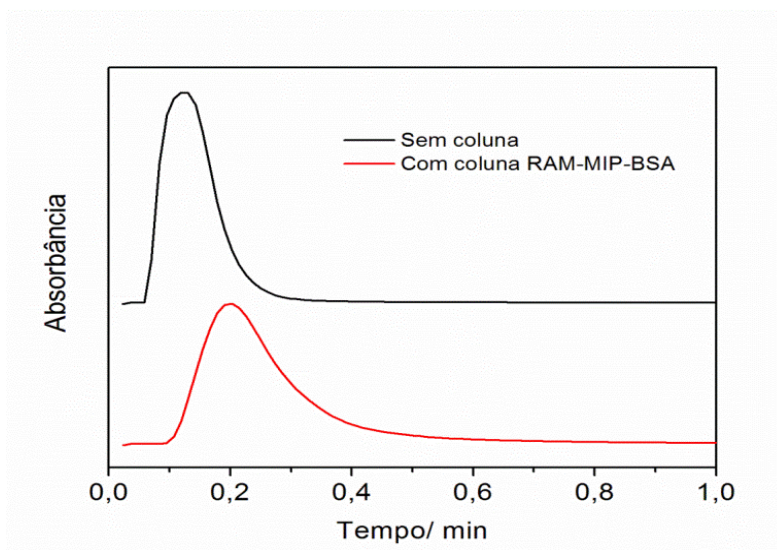


Figura 10 - Espectros de infravermelho do RAMIP e do RAMIP-BSA.

O RAMIP-BSA foi também submetido ao experimento para avaliar sua capacidade em eliminar macromoléculas e os cromatogramas obtidos para a injeção do padrão de BSA em um sistema sem coluna e no sistema com coluna RAMIP-BSA estão representados na Figura 11. O pico obtido com o emprego da coluna RAMIP-BSA apresentou um formato mais alargado devido à resistência criada pelo polímero e o consequente alargamento da zona de amostra, o que resultou em um ligeiro aumento do tempo de retenção. Contudo, como pode ser visto as áreas são equivalentes, o que indica que a eliminação das proteínas foi praticamente total, atestando a possibilidade do

uso desse material na extração *on-line* de extratos proteicos de amostras de carne.



**Figura 11** - Cromatogramas obtidos pela análise de 25 µL de um padrão de BSA (44 mg mL<sup>-1</sup>) sem o emprego de coluna (área=2391) e com utilização da coluna RAMIP-BSA (área=2543).

### 4.3 Otimização do método

As variáveis do método foram otimizadas de forma univariada. Primeiramente, as amostras foram extraídas com solvente. Após esta etapa, os extratos obtidos foram injetados diretamente no cromatógrafo onde ocorreu a extração *on-line* em fase sólida através do sistema *column switching*.

A extração com solvente inicialmente foi realizada utilizando uma massa de 2 g de carne moída. O volume de solvente empregado foi 5 mL e a extração ocorreu através da agitação em um agitador de tubos por 30 min a 2000 rpm. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min a 490 g e o sobrenadante foi analisado no sistema de extração *on-line*.

Na etapa de extração em fase sólida *on-line*, os primeiros testes foram realizados utilizando um alça de amostragem de 2,4 mL. A fase móvel acetonitrila:metanol:água (60:30:10-v/v) foi empregada, a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, para eluir os analitos da coluna RAMIP-BSA e ao mesmo tempo separar os compostos na coluna analítica. Todos os testes foram realizados através da análise de amostras fortificadas. Os tempos de extração e eluição

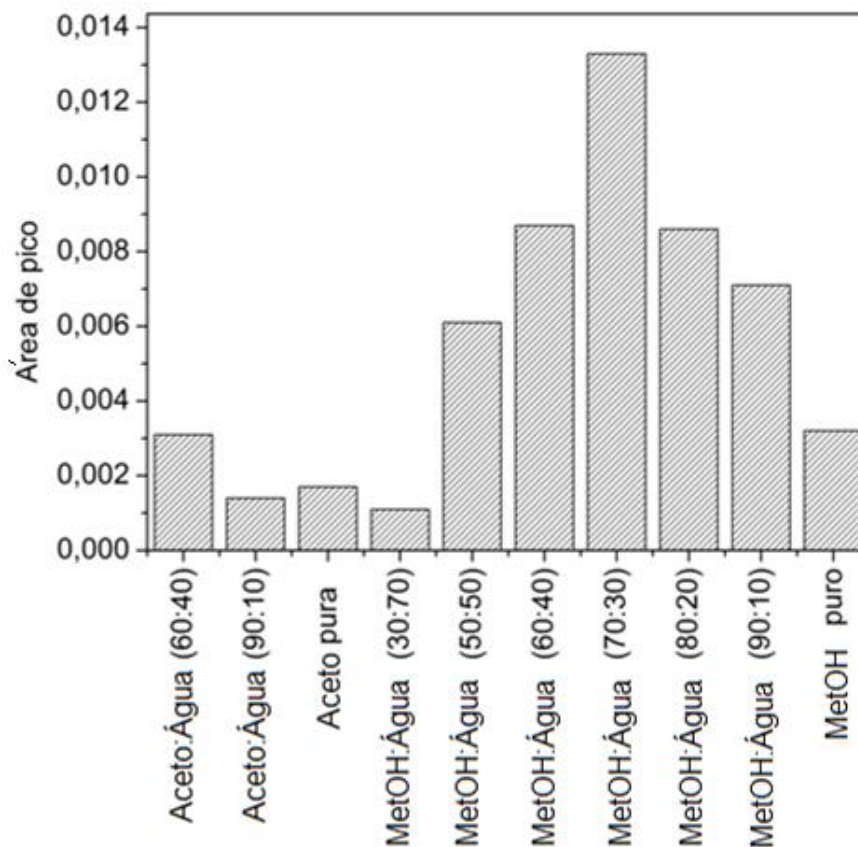
da amostra, controlados através dos comandos de aquisição de dados, foram 528 e 100 s, respectivamente.

#### **4.3.1 Otimização da etapa de extração com solvente**

Com a finalidade de melhorar a recuperação do analito e a sensibilidade do método algumas variáveis do processo de preparo de amostras foram estudadas como descrito abaixo.

Para otimização das condições de extração de IVM em amostras de carne empregou-se uma massa de 2 g de carne moída fortificada com 50  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de IVM na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , resultando em uma concentração final de 2500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Embora os níveis finais de IVM fossem superiores ao LMR estabelecido, este valor foi empregado na otimização a fim de permitir uma melhor visualização dos resultados. A área do pico de IVM foi empregada como resposta analítica durante toda a otimização.

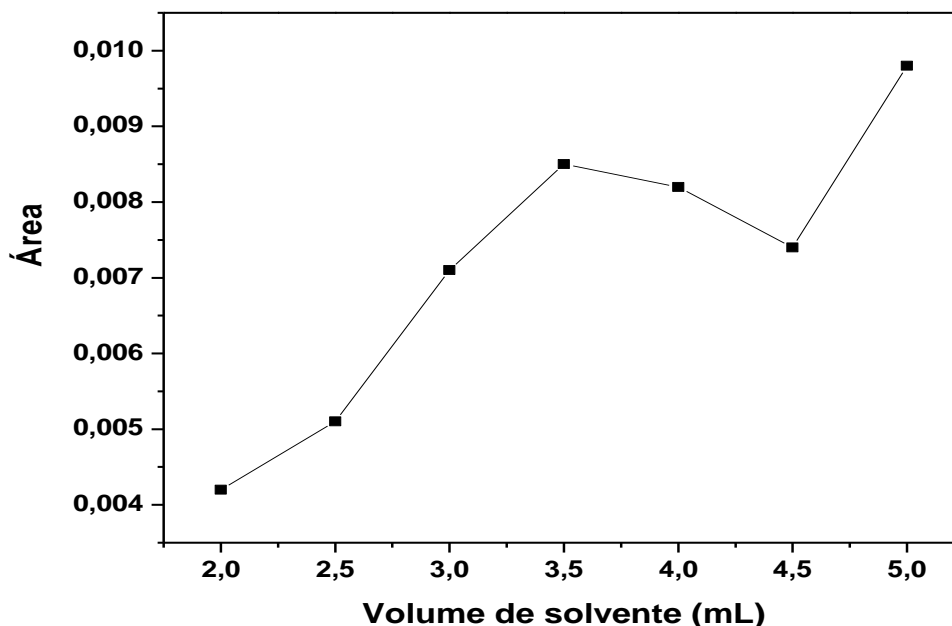
Para selecionar o melhor solvente de extração, foram testados alguns solventes relatados na extração de IVM em alimentos. O volume empregado na extração e o volume de amostra analisado foram os mesmos para todos os testes. Os solventes testados bem como a área resultante de cada extração estão apresentados na Figura 12. Como podemos observar, a seleção do solvente de extração foi importante para melhorar a sensibilidade do método. O melhor resultado em termos de magnitude de sinal analítico foi obtido com a mistura metanol:água (7:3, v/v).



**Figura 12** – Influência das diferentes soluções testadas para a extração de IVM em carne na resposta analítica. (Aceto = acetonitrila, MetOH = metanol).

Ainda buscando um aumento na resposta analítica, as amostras foram preparadas utilizando volumes menores de metanol:água (7:3, v/v), na etapa de extração com solvente, afim de aumentar a concentração do analito na amostra. Os volumes testados e as respostas obtidas estão representados na Figura 13. No entanto, ao contrário do que era esperado, a diminuição do volume do solvente não provocou aumento no sinal obtido. Isto ocorreu devido à diminuição do coeficiente de distribuição provocada pela diminuição do volume de solvente empregado na extração das amostras.





**Figura 13-** Gráfico dos diferentes volumes de metanol:água testados para extração de IVM em carne e suas respectivas áreas.

É importante enfatizar que o metanol é um agente precipitante de proteínas<sup>59</sup>. No entanto, a precipitação ocorre apenas quando este se encontra em uma porcentagem maior que 60 % na amostra. Neste caso, quando 5 mL de metanol:água (7:3, v/v) é empregado para extrair a IVM em 2 g de carne, o metanol representa aproximadamente 50 % (em volume) e provavelmente não é capaz de precipitar toda proteína presente na amostra nesta concentração. Assim, o RAMIP-BSA foi também empregado na eliminação destas macromoléculas.

As condições otimizadas da etapa de extração com solvente foram: extração de 2 g de carne com 5 mL de metanol:água (7:3, v/v) durante 30 min e com agitação a 2000 rpm. Centrifugação por 10 min, e coleta do sobrenadante para injeção no sistema cromatográfico.

### 4.3.2 Otimização das variáveis do sistema *column switching*

Definidas as condições de extração com solvente, nossos esforços foram voltados para modificações nas condições do sistema de extração *on-line* com o objetivo de aumentar a resposta analítica e consequentemente a sensibilidade do método.

O primeiro parâmetro investigado foi a influência do tempo da extração em fase sólida *on-line*, que é o tempo em que a amostra passa pela coluna RAMIP-BSA para extração dos analitos. Inicialmente, a vazão do solvente (água Milli-Q) utilizado para impulsionar a amostra pela coluna RAMIP-BSA foi de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Assim, quanto maior o tempo de extração, maior é o volume de água a ser percolada pelo polímero sequencialmente após a extração da amostra. Este parâmetro deve ser controlado pois volumes excessivos de água podem causar a eluição gradual do analito retido ao passo que pequenos volumes podem não ser suficientes para a completa eliminação dos interferentes contidos na amostra, principalmente as proteínas. Assim, com a passagem da amostra, a IVM deve permanecer retida na coluna, e as proteínas devem ser gradativamente eluidas pela contínua passagem de água. Os tempos de extração testados foram 5,8; 6,8; 7,8; 8,8; 10,8 e 12,8 min. O que permitiu passar respectivamente pelo polímero 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 mL de água após a passagem dos 2,4 mL de amostra. Os testes permitiram visualizar que volumes crescentes de água de 0,5 a 2,0 mL possibilitaram uma maior eliminação de contaminantes e melhor visualização do pico do analito. Contudo, nenhuma mudança significativa no perfil cromatográfico foi observada com a passagem de volumes maiores que 2 mL. Sendo assim, o volume de 2 mL foi selecionado como condição de trabalho, o que correspondeu a um tempo de extração *on-line* de 8,8 min.

O aumento do tempo de extração resultou, consequentemente, no aumento do tempo de análise. Assim, a influência da vazão do solvente de extração foi investigada, com a finalidade de tornar o processo de análise menos demorado. As vazões testadas foram 0,5; 1,0 e  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ . A área (0,0112) resultante da análise em um fluxo de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  foi semelhante a área (0,0105) obtida quando um fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  foi utilizado. Além disso, o aumento do fluxo de 1,0 para  $2 \text{ mL min}^{-1}$  resultou em um decréscimo de

cerca de 30% na área do pico da IVM. Portanto, a vazão do solvente de extração foi fixada em  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , o que reduziu o consideravelmente o tempo total de extração (de 8,8 para 4,4 min), e conseqüentemente o tempo total de análise.

No sentido de aumentar a retenção da IVM na coluna RAMIP-BSA, outros solventes foram avaliados como fase móvel de extração (fase móvel A) em substituição à água. Os solventes testados foram metanol:água (1:9 v/v) e metanol:água (3:7 v/v). Contudo, em ambos os casos, observou-se que a presença de metanol resultou na diminuição da quantidade de analito retido no polímero. Assim, optou-se por manter somente a água Milli-Q como solvente carregador (fase móvel A).

Após serem extraídos pela coluna RAMIP-BSA os analitos eram então eluídos pela fase móvel B (acetonitrila:metanol:água 60:30:10-v/v), e direcionados para a coluna cromatográfica. Nesta etapa, o parâmetro avaliado foi o tempo de eluição, que é o tempo em que a fase móvel B passa pela coluna RAMIP-BSA para eluir o analito retido. Inicialmente, as amostras eram eluídas durante 100 s. Os novos testes foram realizados empregando os tempos de eluição de 50 e 200 s. A diminuição do tempo provocou uma diminuição da área do analito, provavelmente porque não houve a eluição completa de todo o analito retido na coluna RAMIP-BSA. No entanto, quando o tempo de eluição foi aumentado para 200 s, nenhuma mudança significativa do sinal analítico foi observada. Dessa forma, o tempo eluição de 100 s foi definido como condição de trabalho.

A alça de amostragem, que determina o volume de amostra analisada, foi também estudada com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método. Uma alça de 3,9 mL foi então acoplada ao sistema em substituição à alça de 2,4 mL, possibilitando a passagem de um volume maior da amostra pela coluna RAMIP-BSA. O aumento da resposta (da ordem de 1,6 vezes) foi proporcional ao aumento do volume de amostra analisada. Assim, a alça de 3,9 foi selecionada como melhor condição e o tempo de extração passou de 4,4 para 5,9 min, para permitir a passagem do mesmo volume de água (2,0 mL) após a amostra na etapa de extração *on-line*.

O último parâmetro avaliado foi a influência da massa de polímero utilizado nas extrações. O teste foi feito com colunas de 0,15 (coluna atual) e

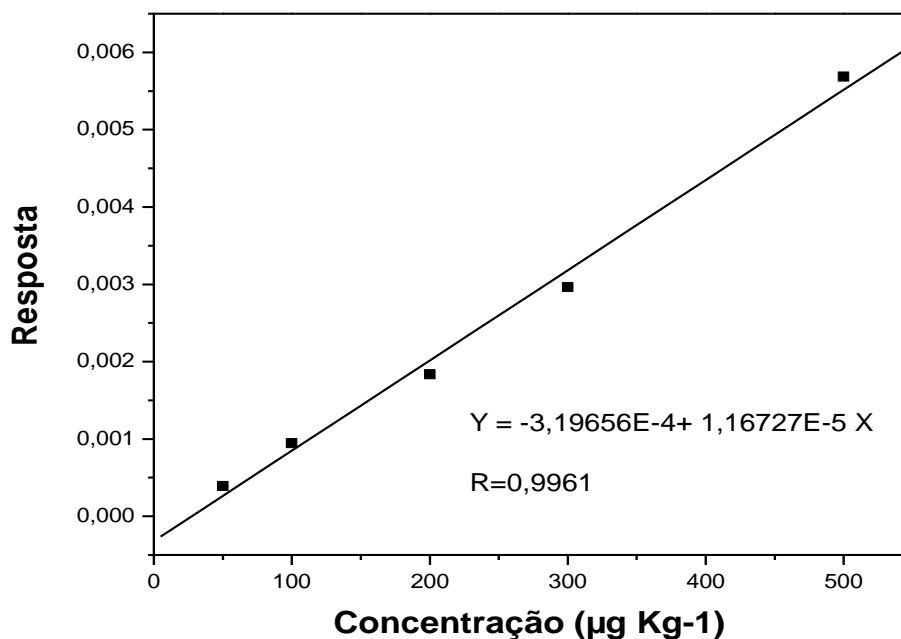
0,50 g de RAMIP-BSA, e os resultados mostraram que o aumento da massa de polímero não resultou no aumento significativo da resposta analítica (aumento menor que 15 %). Isto ocorreu provavelmente porque a quantidade de sítios de ligação presentes em 0,15 g do polímero foram suficientes para extrair todo analito presente na amostra, na concentração analisada. Além disso, houve um aumento na pressão do sistema quando massas maiores de polímero foram utilizadas.

As condições otimizadas do sistema *column switching* foram: água Milli Q a  $1 \text{ mL min}^{-1}$  como fase móvel A, acetonitrila:metanol:água (60:30:10-v/v) na vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  como fase móvel B. O tempo de extração e eluição de 354 e 100 s respectivamente. Volume injetado de 3,9 mL.

#### 4.4 Validação Analítica

Os parâmetros analisados na etapa de validação analítica foram linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

A linearidade foi verificada através da análise de cinco diferentes níveis de fortificação de IVM em amostras de carne no intervalo de 50 a  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $n = 6$ ). A curva de calibração foi construída considerando o valor médio de área obtida. O método apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,9961 sendo, portanto considerado linear no intervalo testado. A Figura 14 mostra a curva de calibração obtida.



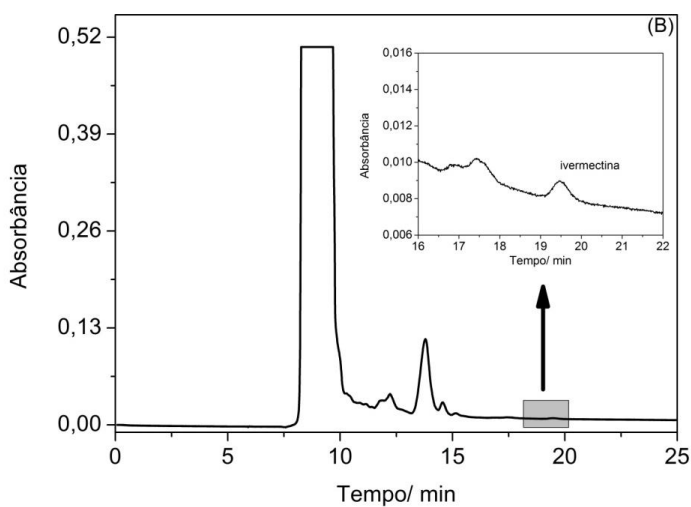
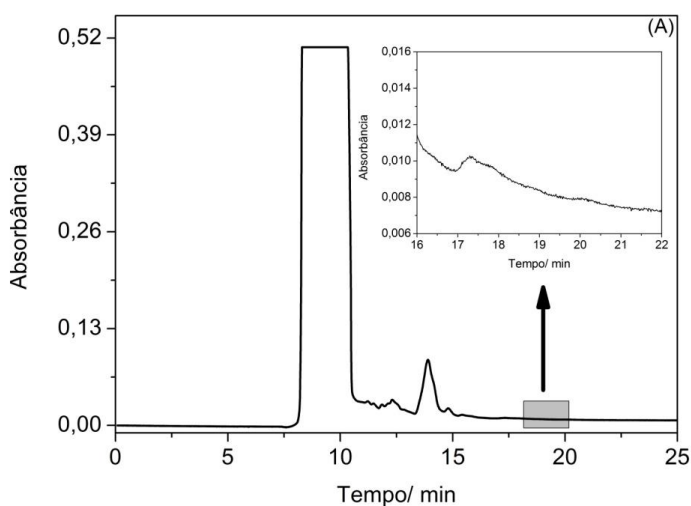
**Figura 14** – Curva de calibração obtida pela análise de IVM em carne no intervalo de concentrações de 50 a 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$

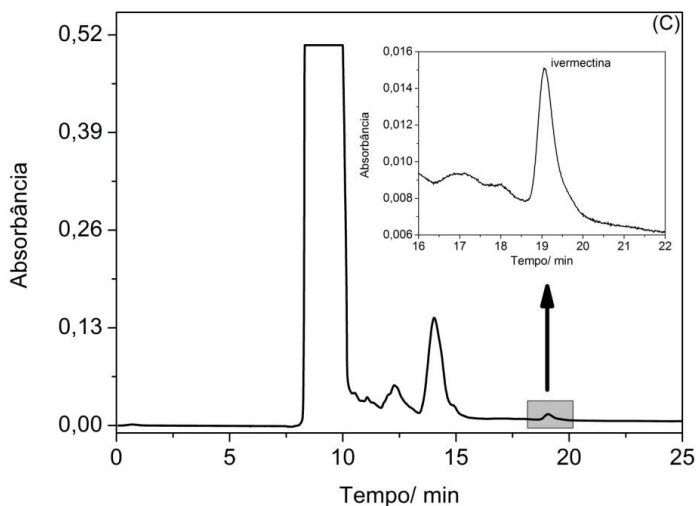
Os testes de precisão e exatidão intradias e interdias foram realizados em três dias diferentes. A precisão foi demonstrada através do cálculo do DPR e a exatidão pelo erro relativo. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Resultados de precisão e exatidão obtidos da análise de IVM em carne através do método proposto.

	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Concentração analisada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Erro Relativo (%)	DPR (%)
Intradias	50	61	22,0	10,3
	200	185	-7,5	10,6
	500	515	3,0	3,8
Interdias	50	57	14,0	17,0
	200	163	-18,5	13,7
	500	453	-9,4	12,7

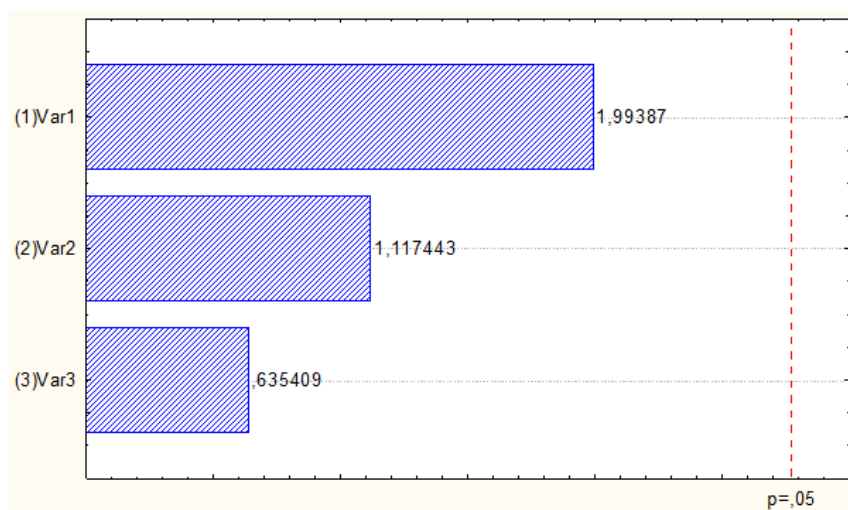
A seletividade foi avaliada através da comparação das análises de amostras de carne sem fortificação e de amostras fortificadas para avaliar a presença de interferentes no tempo de retenção (TR) da IVM. A Figura 15 (A) mostra o cromatograma obtido de uma amostra de carne não fortificada (branco). Como podemos observar por comparação com as Figuras 15 (B) e 15 (C), não houve coeluição de nenhum componente da amostra do TR da IVM o que demonstra a seletividade do método. Salienta-se que o pico inicial de 6 a 11 min corresponde ao pico de injeção do sistema *column switching*. Os picos decorrentes da presença de pigmentos da carne também podem ser visualizados, pois estes compostos podem ter sido extraídos concomitantemente a IVM. No entanto, nenhum sinal foi observado no TR da IVM (19 min) o que demonstra a seletividade do método.





**Figura 15** – Cromatogramas obtidos pela análise de uma amostra carne sem fortificação (A) de uma amostra de carne fortificada com IVM na concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (B) e uma amostra de carne fortificada com IVM na concentração  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  (C) (TR da IVM = 19 min.).

A robustez do método foi estudada com o objetivo de verificar a capacidade do método em resistir a pequenas variações. Assim, avaliou-se a influência da variação do volume de solvente empregado na extração das amostras de carne, o tempo de agitação das amostras e o comprimento de onda do detector. A significância dos fatores foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%. O resultado da análise foi demonstrado através do diagrama de Pareto (Figura 16) que demonstrou não haver efeito significativo ( $p = 0,05$ ) para os parâmetros avaliados. Assim, o método foi considerado robusto.



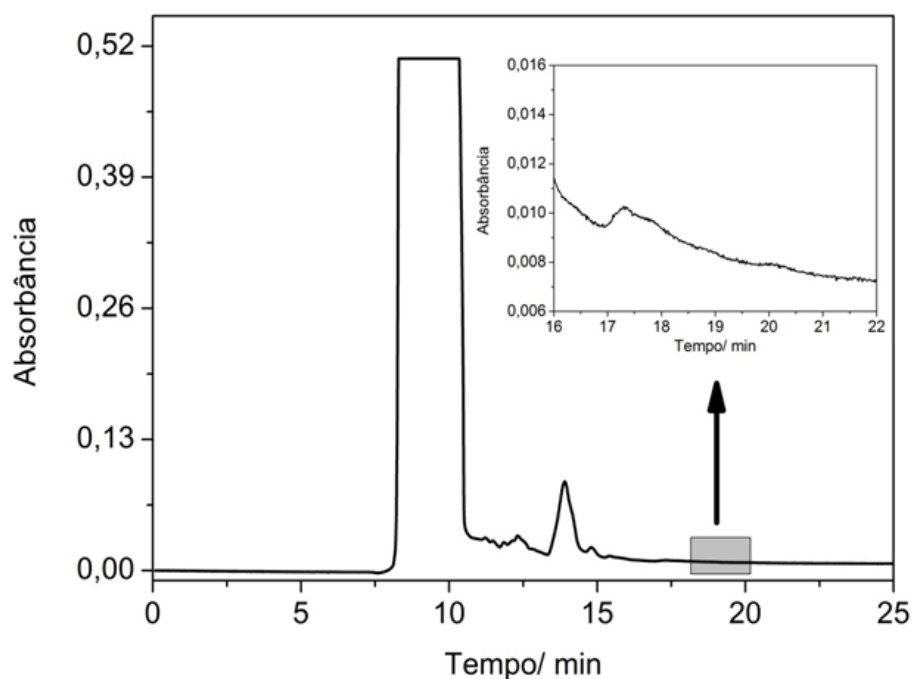
**Figura 16** – Diagrama de Pareto para análise da robustez. Var 1 = volume de solvente de extração, Var 2 = tempo de agitação e Var 3 = comprimento de onda do detector.

O método apresentou limites de detecção e quantificação de 30 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. O limite de quantificação foi definido como a menor concentração quantificada com precisão e exatidão. Já o limite de detecção foi definido como a concentração capaz de gerar um sinal correspondente a 3 vezes o ruído da linha base.



## 5 ANÁLISE DE AMOSTRAS

Definidas as condições de preparo de amostras e análise o método foi então aplicado na análise de amostras de carne bovina (n=10). As amostras analisadas foram adquiridas no comércio de Alfenas-MG. Em nenhuma delas foi observado sinal no tempo de retenção da IVM. A Figura 17 mostra o cromatograma de uma amostra analisada empregando o método desenvolvido.



**Figura 17** – Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de carne.

## 6 CONCLUSÕES

O emprego de um RAMIP-BSA na extração de IVM em amostras de carne possibilitou realizar o preparo destas amostras de um modo mais simples e rápido que os métodos tradicionalmente descritos.

O revestimento externo do RAMIP-BSA com albumina bovina foi eficiente na eliminação de proteínas possibilitando realizar a extração em fase sólida *on-line* através do sistema *column switching*, após realizar somente uma extração empregando uma mistura de solventes.

Devido à alta capacidade de pre-concentração do procedimento de extração, foi possível executar as análises utilizando um detector UV, que é notadamente pouco sensível para a IVM. Salienta-se que até então as análises de IVM por cromatografia líquida têm empregado detector de fluorescência após uma etapa de derivatização da IVM. A derivatização é um procedimento crítico e moroso, além de ser uma grande fonte de erros nas análises.

O método desenvolvido mostrou-se adequado para análise de IVM na carne bovina já que os limites de detecção e quantificação foram inferiores ao LMR estabelecido pela legislação. Além disso, todos os demais parâmetros de validação foram satisfatoriamente atendidos.

Finalmente, vale ressaltar que após algumas modificações, este método poderá ser empregado também na análise de IVM em outras matrizes apresentando uma alternativa valiosa para análises que utilizam preparações de amostra convencionais.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> L. Giannetti, A. Giorgi, F. Necci, G. Ferretti, F. Buiarelli, B. Neri, Validation study on avermectine residues in foodstuffs. **Anal. Chim. Acta.**, **700** (2011) 11.
- <sup>2</sup> Disponível em: [www.agricultura.gov.br/animal/exportacao](http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao). Acesso em: 16/09/2013.
- <sup>3</sup> Disponível em: [www.painelpolitico.com/Editorias/Noticias/EUA-barram-carregamento-de-carne-bovina-exportada-pela-JBS.html](http://www.painelpolitico.com/Editorias/Noticias/EUA-barram-carregamento-de-carne-bovina-exportada-pela-JBS.html). Acesso em: 26/10/2011.
- <sup>4</sup> M. Danaher, L. C. Howells, S. R.H.Crooks, V.Cerkvenik-Flajs, M. O’Keeffe, Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **J. Chromatogr. B**, 844 (2006) 175.
- <sup>5</sup> H. Wang, Z. Wang, S .Liu, Z. Liu, Rapid Method for Multi-residue Determination of avermectins in bovine liver using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 82 (2009) 395.
- <sup>6</sup> S. Ōmura, A. Crump, The life and times of ivermectin – a success story microbiology. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2 (2004) 984.
- <sup>7</sup> L. W. Shoop, H. Mrozik, M.H. Fisher, Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Vet. Parasitol.**, 59 (1995) 139.
- <sup>8</sup> M. Li, Z. Chen, X. Lin, X. Zhang, Y. Song, Y. Wen, J. Li, Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Bioorgan. Med. Chem.**, 18 (2008) 5359.
- <sup>9</sup> T.G. Geary, Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends Parasitol.**, 21 (2005) 530.

- <sup>10</sup> G. Molinari, S. Soloneski, A.M. Reigosa, L.M. Larramendy, In vitro genotoxic and citotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec. **J. Hazard. Mater.**, 165 (2009) 1074.
- <sup>11</sup> S. Ōmura, Ivermectin: 25 years and still going strong. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, 31(2008) 91.
- <sup>12</sup> A.G. Canga, A.M.S. Prieto, J.D. Liébana, N.F. Martínez, M.S. Vega, J.G. Vieitez, The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **Vet. J.**, 179 (2009) 25.
- <sup>13</sup> F. J. Schenck, L. H . Lagman, Multiresidue Determination of Abamectin, Doramectin, Ivermectin and Moxidectin in Milk Using Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. **J. AOAC Int.**, 82 (1999) 1340.
- <sup>14</sup> M.F. Bassissi, M. Alvinerie, A. Lespine, Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. **Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.**, 138 (2004) 437.
- <sup>15</sup> Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 8 de 29 de Abril de 2010.
- <sup>16</sup> Disponível em: [www.ipfsaph.org](http://www.ipfsaph.org). Acesso em 21/09/2013.
- <sup>17</sup> E. C. Figueiredo, A. C. B. Dias, M. A. Z. Arruda, Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Braz. J. Pharma. Sci.**, 44 (2008) 361.
- <sup>18</sup> N. Lavignac, C. J. Allender, K. R. Brain, Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. **Anal. Chim. Acta.**, 510 (2004) 139.
- <sup>19</sup> P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **J. Chromatogr. B**, 804 (2004) 173.

- <sup>20</sup> L. Chen, S. Xu and J. Li, Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. **Chem Soc. Rev.** 40 (2011) 2922.
- <sup>21</sup> T. Jing, X. Gao, P. Wang, Y. Wang, Y. Lin, X. Hu, Q. Hao, Y. Zhou, S. Mei, Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction. **Anal. Bioanal. Chem.**, 393 (2009) 2009.
- <sup>22</sup> N. M. Bergmann, N. A. Peppas, Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. **Prog. Polym. Sci.** 33 (2008) 271.
- <sup>23</sup> M. Guoa, Z. Zhaoa, Y. Fana, C. Wanga, L. Shia, J. Xiaa, Y. Longa, H. Mia, Protein-imprinted polymer with immobilized assistant recognition polymer chains. **Biomaterials**, 27 (2006) 438.
- <sup>24</sup> A. Rachkov, N. Minoura, Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. **Biochim. Biophys. Acta**, 1544 (2001) 255.
- <sup>25</sup> A. Beltran, F. Borrull, P.A.G. Cormack, R.M. Marce, Molecularly imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **Trends Anal. Chem.**, 29 (2010) 1363.
- <sup>26</sup> K. Kitahara<sup>a</sup>, I. Yoshihamab, T. Hanada<sup>a</sup>, H. Kokubab, S. Araia, Synthesis of monodispersed molecularly imprinted polymer particles for high-performance liquid chromatographic separation of cholesterol using templating polymerization in porous silica gel bound with cholesterol molecules on its surface. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 7249.
- <sup>27</sup> E. Turiel, A. Martín-Esteban, Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. **Anal. Chim. Acta**, 668 (2010) 87.

- <sup>28</sup> C. Hu, T. Chou, Albumin molecularly imprinted polymer with high template affinity - prepared by systematic optimization in mixed organic/aqueous media. **Microchem. J.**, 91 (2009) 53.
- <sup>29</sup> A. V. Navarroa, M. G. Romeroa, J. F. F. Sánchez, P. A.G. Cormack, A. S. Carretero, A. F. Gutiérrez, Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 7289.
- <sup>30</sup> C. A. Lorenzo, A. Concheiro, Molecularly imprinted polymers for drugs delivery. **J. Chromatogr. B**, 804 (2004) 231.
- <sup>31</sup> R. N. Rao, P. K. Maurya, S. Khalid, Development of a molecularly imprinted polymer for selective extraction followed by liquid chromatographic determination of sitagliptin in rat plasma and urine. **Talanta**, 85 (2011) 950.
- <sup>32</sup> R. V. Vitor, M. C. G. Martins, E. C. Figueiredo, I. Martins, Application of molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for salivary cotinine. **Anal. Bioanal. Chem.**, 400 (2011) 2109.
- <sup>33</sup> E. C. Figueiredo; G. B. Sanvido; M. A. Z. Arruda, Molecularly imprinted polymers as analyte sequesters and selective surfaces for easy ambient sonic-spray ionization. **Analyst**, 135 (2010) 726.
- <sup>34</sup> L. A. Barros, I. Martins, S. Rath, A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. **Anal. Bioanal. Chem.**, 397 (2010) 1355.
- <sup>35</sup> Z. Sun, W. Schussler, M. Sengl, R. Niessner, D. Knopp, Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer. **Anal. Chim. Acta.**, 620 (2008) 73.
- <sup>36</sup> C. P. Desilets, M. A. Rounds, F. E. Regnier, Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 544 (1991) 25.

- <sup>37</sup> E. R. Gonzalo, D. García-Gómez, R. C. Martínez, A confirmatory method for the determination of phenolic endocrine disruptors in honey using restricted-access material–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, 398 (2010)1239.
- <sup>38</sup> E. Machtejevas, R. Denoyel, J.M. Meneses, V. Kudirkait, B.A. Grimes, D. Lubda, K.K. Unger, Sulphonic acid strong cation-exchange restricted access columns in sample cleanup for profiling of endogeneous peptides in multidimensional liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1123 (2006) 38.
- <sup>39</sup> H. Wang, P. Jiang, M. Zhang, X. Dong, Synthesis of a novel restricted access chiral stationary phase based on atom transfer radical polymerization and click chemistry for the analysis of chiral drugs in biological matrices. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 1310.
- <sup>40</sup> S. Souverain, S. Rudaz, J. Veuthey, Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **J. Chromatogr. B**, 801 (2004) 141.
- <sup>41</sup> S. M. R. Wille, W. E. E. Lambert, Recent developments in extraction procedures relevant to analytical toxicology. **Anal. Bioanal. Chem.**, 388 (2007) 1381.
- <sup>42</sup> A. R. Chaves, B. J. G. Silva, F. M. Lanças, M. E. C. Queiroz, Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon  $\alpha$  in plasma samples. **J. Chromatogr. A**, 1218 (2011) 3376.
- <sup>43</sup> R. Koeber, C. Fleischer, F. Lanza, K. S. Boos, B. Sellergren, D. Barcelo, Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecularly imprinted polymers. **Anal. Chem.**, 73 (2001) 2437.

- <sup>44</sup> J. Haginaka, H. Takehira, K. Hosoya, N. Tanaka, Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. **J. Chromatogr. A**, 849 (1999) 331.
- <sup>45</sup> J. Haginaka, H. Sanbe, Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. **Anal. Chem.**, 72 (2000) 5206.
- <sup>46</sup> K. Hoshina, S. Horiyama, H. Matsunaga, J. Haginaka, Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column. **J. Pharmaceut. Biomed.**, 55 (2011) 916.
- <sup>47</sup> K. Hoshina, S. Horiyama, H. Matsunaga, J. Haginaka, Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 4957.
- <sup>48</sup> H. Sambe, K. Hoshina, K. Hosoya, J. Haginaka, Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1134 (2006) 16.
- <sup>49</sup> O. I. Parisi, G. Cirillo, M. Curcio, F. Puoci, F. Iemma, U. G. Spizzirri and N. Picci, New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **Eur. Polym. J.**, 45 (2009) 1634.



- <sup>50</sup> W. Xu, S. Su, P. Jiang, H. Wang, X. Dong and M. Zhang, Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 7198.
- <sup>51</sup> K. Hua, L. Zhang, Z. Zhang, Y. Guo, T. Guo, Surface hydrophilic modification with a sugar moiety for a uniform-sized polymer molecularly imprinted for phenobarbital in serum. **Acta Biomater.**, 7 (2011) 3086.
- <sup>52</sup> G. O. I. Moraes, L. M. R. Silva, A. J. Santos Neto, F. H. Florenzano, E. C. Figueiredo, Polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina (RAM-MIP-BSA). Patente depositada, BR 10 2012 015339-4.
- <sup>53</sup> G. O. I. Moraes, L. M. R. Silva, A. J. Santos Neto, F. H. Florenzano, E. C. Figueiredo, A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Anal. Bioanal. Chem.**, 405 (2013) 7687.
- <sup>54</sup> R. Koeber, C. Fleischer, F. Lanza, K. S. Boos, B. Sellergren, D. Barcelo, Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecularly imprinted polymers. **Anal. Chem.**, 73 (2001) 2437.
- <sup>55</sup> I. Norlander, H. Johnsson, Determination of ivermectin residues in swine tissues: an improved clean-up procedure using solid-phase extraction. **Food Add. Contam.**, 7 (1990) 79.
- <sup>56</sup> E. Iosifidou, P. Shearan, M. O'Keeffe, Application of the matrix solid phase dispersion technique for the determination of ivermectin residues in fish muscle tissue. **Analyst**, 119 (1994) 2227.

<sup>57</sup> P.C. Tway, J.S. Wood, G.V. Downing, Determination of ivermectin in cattle and sheep tissues using HPLC. **J. Agric. Food Chem.**, 29 (1981) 1059.

<sup>58</sup> J. Vuik, Rapid determination of abamectin in lettuce and cucumber using high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, 39 (1991) 303.

<sup>59</sup> Flanagan, R.J.; Morgan, P.E.; Spencer, E.P.; Whelpton, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomed. Chromatogr.**, 20 (2006) 530.