

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

AMANDA APARECIDA MARQUES LOURÊDO

**EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA DE ACESSO
RESTRITO ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA
DETERMINAÇÃO DE ANTI-HELMÍNTICOS EM AMOSTRAS DE LEITE**

ALFENAS/MG

2023

AMANDA APARECIDA MARQUES LOURÊDO

**EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA DE ACESSO
RESTRITO ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA
DETERMINAÇÃO DE ANTI-HELMÍNTICOS EM AMOSTRAS DE LEITE**

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^ª. Dr^ª. Mariane Gonçalves Santos

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Lourêdo, Amanda Aparecida Marques.

Extração em fase sólida molecularmente impressa de acesso restrito acoplada à espectrometria de massas para determinação de anti-helmínticos em amostras de leite / Amanda Aparecida Marques Lourêdo. - Alfenas, MG, 2023.

83 f. : il. -

Orientador(a): Mariane Gonçalves Santos.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Polímeros impressos molecularmente com acesso restrito. 2. ESI-MS/MS. 3. Anti-helmínticos benzimidazóis. 4. Albendazol. 5. Mebendazol. I. Santos, Mariane Gonçalves, orient. II. Título.

AMANDA APARECIDA MARQUES LOURÉDO

EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA DE ACESSO RESTRITO ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTI-HELMÍNTICOS EM AMOSTRAS DE LEITE

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica

Aprovada em: 24 de outubro de 2023.

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Gian Paulo Giovanni Freschi
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

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



Documento assinado eletronicamente por **Mariane Gonçalves Santos, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2023, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1118413** e o código CRC **CDB25844**.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Financiamento 01.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

Gostaria de expressar minha gratidão à CAPES e à FAPEMIG pelas bolsas que me foram concedidas ao longo do meu período de dedicação ao mestrado.

Gostaria também de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho! Minha mais sincera gratidão.

RESUMO

A análise de compostos orgânicos em amostras biológicas complexas é um desafio, devido à presença de interferentes, como as proteínas. Com isso, são necessárias técnicas de preparo de amostras confiáveis e eficazes. Em técnicas convencionais, a precipitação de proteínas é realizada antes da extração propriamente dita, o que aumenta os erros analíticos. Nesse contexto, o uso de materiais multifuncionais se destaca como uma alternativa eficaz, como os polímeros de impressão molecular de acesso restrito revestidos com albumina sérica bovina (RAMIP-BSA). Esses materiais possuem a capacidade de adsorver seletivamente os analitos e, simultaneamente, excluir macromoléculas, o que resulta em uma melhora significativa na eficiência da análise. Em relação às técnicas analíticas, a espectrometria de massas ESI-MS/MS, identifica e quantifica com sucesso moléculas orgânicas polares, incluindo fármacos em baixas concentrações. Nesse contexto, foi desenvolvido um sistema integrado de extração/análise on-line que combina as vantagens do RAMIP-BSA e da espectrometria de massas para a identificação e quantificação de anti-helmínticos benzimidazólicos em amostras de leite, sem a necessidade de separação cromatográfica. Inicialmente, um RAMIP seletivo ao mebendazol (MBZ) foi sintetizado pelo método *in bulk*, usando ácido metacrílico como monômero funcional e glicidil metacrilato como co-monômero hidrofílico. Em seguida, foi realizada a abertura do anel epóxido e o polímero foi recoberto com albumina sérica bovina, gerando o RAMIP-BSA. Em um sistema on-line, uma mini coluna preenchida com esse adsorvente foi acoplada ao espectrômetro de massas ESI-MS/MS. Água Milli-Q foi usada como fase móvel de carregamento e recondicionamento, enquanto a fase de limpeza e eluição foi composta por uma solução contendo ácido fórmico 1% em água e metanol. A taxa de fluxo foi mantida constante a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. O sistema permitiu a extração, identificação e quantificação simultâneas de mebendazol (MBZ) e albendazol (ABZ) em amostras de leite. O método apresentou linearidade entre $10,0$ e $125,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (com um coeficiente de correlação superior a $0,99$). Os limites de quantificação foram $15,0$ e $10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para MBZ e ABZ, respectivamente. Os valores de precisão e exatidão foram adequados, sendo inferiores a 15% para todas as concentrações testadas. O método desenvolvido foi usado para analisar MBZ e ABZ em amostras reais de leite e provou ser uma alternativa viável às técnicas convencionais de preparo de amostras e cromatografia.

Palavras-chave: polímeros impressos molecularmente com acesso restrito; ESI-MS/MS; anti-helmínticos benzimidazóis; albendazol; mebendazol; leite.

ABSTRACT

The analysis of organic compounds in complex biological samples poses a challenge due to the presence of interferents, such as proteins. In conventional approaches, protein precipitation is a prerequisite before extraction, often resulting in increased analytical errors. In this context, multifunctional materials, particularly restricted-access molecularly imprinted polymers coated with bovine serum albumin (RAMIP-BSA), have emerged as a promising alternative. These materials can selectively adsorb analytes while excluding macromolecules, significantly enhancing analysis efficiency. Regarding analytical techniques, electrospray ionization tandem mass spectrometry ESI-MS/MS successfully identifies and quantifies polar organic molecules, including drugs at low concentrations. In this context, an integrated online extraction/analysis system was developed, combining the advantages of RAMIP-BSA and mass spectrometry for identifying and quantifying benzimidazole anthelmintics in milk samples, without the need for chromatographic separation. Initially, a selective RAMIP for mebendazole (MBZ) was synthesized using the in-bulk method, with methacrylic acid as the functional monomer and glycidyl methacrylate as the hydrophilic co-monomer. Subsequently, epoxide ring opening was performed, and the polymer was coated with bovine serum albumin, generating RAMIP-BSA. In an online system, a mini-column packed with this adsorbent was coupled to the ESI-MS/MS mass spectrometer. Milli-Q water was employed as the loading and reconditioning mobile phase, while the cleaning and elution phase consisted of a solution containing 1% formic acid in water and methanol. The flow rate was maintained at a constant 0.5 mL min^{-1} . This system enabled simultaneous extraction, identification, and quantification of mebendazole (MBZ) and albendazole (ABZ) in milk samples. The method demonstrated linearity within the range of 10.0 to $125.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (with a correlation coefficient exceeding 0.99). The quantification limits were determined to be $15.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for MBZ and $10.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for ABZ, respectively. Precision and accuracy values were suitable, with all tested concentrations yielding results below 15%. The developed method was employed for the analysis of MBZ and ABZ in real milk samples and proved to be a viable alternative to conventional sample preparation and chromatographic techniques.

Keywords: restricted access molecular imprinting polymers; ESI-MS/MS; benzimidazole anthelmintics; albendazole; mebendazole; milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura dos principais monômeros funcionais.....	17
Figura 2 –	Estrutura dos principais agentes de ligação cruzada.....	18
Figura 3 –	Esquema genérico da síntese de MIP.....	19
Figura 4 –	Esquema de mecanismo de exclusão de RAMs revestido com BSA.....	21
Figura 5 –	Esquema de síntese de um RAMIP-BSA.....	24
Figura 6 –	Principais anti-helmínticos utilizados na medicina veterinária.....	26
Figura 7 –	Ionização do núcleo imidazólico sob condições ácidas e básicas.....	27
Figura 8 –	Estrutura química do Albendazol e seus metabólitos.....	29
Figura 9 –	Estrutura química do Mebendazol.....	29
Figura 10 –	Esquema generalizado para síntese dos polímeros e revestimento com BSA.....	38
Figura 11 –	Coluna com RAMIP-BSA.....	40
Figura 12 –	Sistema cromatográfico empregado no teste de exclusão de proteínas.....	41
Figura 13 –	Espectro de varredura do padrão de MBZ na concentração de 10 mg L ⁻¹	48
Figura 14 –	Reações químicas envolvidas no revestimento do RAMIP com BSA.....	49
Figura 15 –	Espectros de infravermelho do RAMIP e RAMIP-BSA.....	50
Figura 16 –	Espectros de infravermelho do RAMIP e RANIP.....	51
Figura 17 –	Curvas de perda de massa para RAMIP (A) e RAMIP-BSA (B).....	52
Figura 18 –	Microscopia eletrônica de varredura dos materiais RAMIP e RAMIP-BSA.....	53
Figura 19 –	Cromatograma obtido quando percolada solução padrão de caseína 1,0 mg mL ⁻¹	55
Figura 20 –	Cromatograma obtido quando percolada solução padrão de BSA 44,0 mg mL ⁻¹	56
Figura 21 –	Cinéticas de adsorção do RAMIP-BSA adequadas aos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.....	57
Figura 22 –	Isotermas de adsorção do RAMIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Toth e Redlich Peterson.....	60
Figura 23 –	Sistema on-line de análise.....	64
Figura 24 –	Gráficos (TIC) obtidos para (A) amostra de leite em branco; (1B) após otimização para 10,0 µg L ⁻¹ de ABZ e (2B) 15,0 µg L ⁻¹ de MBZ; (1C) após otimização para 125,0 µg L ⁻¹ de ABZ e (2C) 125,0 µg L ⁻¹ de MBZ.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros avaliados para a otimização das condições de extração.....	44
Tabela 2 –	Área superficial específica, volume e diâmetro médio dos poros de cada material RAMIP e RAMIP-BSA.....	53
Tabela 3 –	Parâmetros cinéticos para adsorção de MBZ em RAMIP-BSA ajustado para os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.....	58
Tabela 4 –	Parâmetros das isotermas de adsorção de MBZ em RAMIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Toth e Redlich Peterson.....	59
Tabela 5 –	Parâmetros MS/MS.....	61
Tabela 6 –	Parâmetros da extração on-line aplicada no método MS/MS para a determinação de MBZ e ABZ no leite.....	65
Tabela 7 –	Comparação entre os estudos relatados na literatura e desse trabalho para determinação de albendazol e mebendazol em amostras de leite	66
Tabela 8 –	Concentração dos fármacos determinados (n=3) em amostras de leite.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A4-CA	4,4 – Azobis (4 – ácido cianoaléxico)
ABZ	Albendazol
AIBN	2,2' - Azobisisobutironitrila
ALC	Agente de Ligação Cruzada
BSA	Albumina sérica bovina
CV	Coefficiente de variação
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
EPR	Erro padrão relativo
ESI ⁺	Ionização por <i>Eletrospray</i> no modo positivo
eV	elétron-Volt
F _{error}	Função erro
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
g	grama
GDMA	Glicerol dimetacrilato
GMA	Glicidil metacrilato
IR	Iniciadora radicalar
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LD	Limite de detecção
LLE	Extração Líquido-líquido
LQ	Limite de quantificação
LRM	Limite máximo de resíduo
MMA	Ácido metacrílico
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MBZ	Mebendazol
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Monômero funcional
mg	Miligrama
µg	Micrograma
min	Minutos
MIP	Polímeros molecularmente impressos

MPA	Fase de condicionamento
MPB	Fase de eluição
MM	Molécula modelo
MS	Espectrometria de massas
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação ácida
RAM	Materiais de acesso restrito
RAMIP	Materiais de acesso restrito
SPE	Extração em fase sólida
SRM	Monitoramento de reações selecionadas
TGA	Análise termogravimétrica
UHPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplado a espectrometria de massa
UV	Ultra-violeta
UV/Vis	Ultra-violeta/visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS.....	16
3.2	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO.....	20
3.3	POLÍMEROS DE ACESSO RESTRITO MOLECULARMENTE IMPRESSO.....	22
3.4	ANTI-HELMÍNTICOS.....	24
3.4.1	Albendazol.....	27
3.4.2	Mebendazol.....	29
3.5	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	30
3.5.1	Análise direta por espectrometria de massas.....	31
3.6	DETERMINAÇÃO DE ANTI-HELMÍNTICOS EM AMOSTRAS COMPLEXAS UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	36
4.2	SÍNTESE E REVESTIMENTO DOS POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS DE ACESSO RESTRITO (RAMIP-BSA).....	37
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	38
4.3.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....	38
4.3.2	Análise Termogravimétrica.....	39
4.3.3	BET.....	39
4.3.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	39
4.3.5	Seletividade RAMIP-BSA versus RANIP-BSA.....	39
4.4	EMPACOTAMENTO DA COLUNA.....	40
4.5	ESTUDO DE ELIMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS.....	40
4.6	ESTUDOS DE CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO.....	41
4.7	PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	43
4.8	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE.....	43
4.8.1	Otimização das condições MS/MS.....	43

4.8.2	Otimização dos parâmetros de extração on-line.....	43
4.9	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	44
4.9.1	Linearidade.....	44
4.9.2	Precisão e exatidão.....	45
4.9.3	Limites de quantificação e detecção.....	45
4.9.4	Seletividade.....	46
4.10	ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	SÍNTESE DOS POLÍMEROS.....	47
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	49
5.3	ESTUDO DE ELIMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS.....	54
5.4	ESTUDO DE CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO.....	56
5.5	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS MS/MS.....	60
5.6	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO ON-LINE.....	61
5.7	SISTEMA DE ANÁLISE DIRETA SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	63
5.8	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	64
5.9	ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS.....	67
6	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é de grande importância na economia brasileira, pois principalmente no ano de 2021 representou elevado índice no PIB total da economia do Brasil, sendo mais de 27,5%¹. Atualmente, o Brasil possui o segundo maior rebanho de vacas ordenhadas no mundo e é o terceiro maior produtor de leite, o que demonstra a força dessa atividade na economia².

Devido à grande demanda pela produção de leite e de outras atividades agrícolas, como também a exportação de carne bovina, o uso de anti-helmínticos sintéticos para controle de parasitas gastrointestinais em ruminantes é uma alternativa usada pela medicina veterinária desde décadas passadas^{3,4}. Contudo, nos últimos anos observa-se a redução da eficácia e a resistência de vários grupos de parasitas a esses fármacos, o que faz com que, muitas vezes, doses maiores desses medicamentos em intervalos curtos de tempo sejam requeridas para se obter a mesma efetividade⁵.

A negligência ao se ter um controle antiparasitário nos bovinos e a falta de programas para monitorar seu uso, faz com que cada vez mais sejam encontrados resíduos desses fármacos no ambiente e em alimentos de origem animal destinados ao consumo. Em concentrações acima do permitido, constituem risco para a saúde humana, principalmente para indivíduos hipersensíveis^{6,7,8}.

Nesse contexto, se faz necessário a existência de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos métodos analíticos para a identificação e quantificação de resíduos de anti-helmínticos em alimentos de origem animal, como forma de assegurar a saúde e integridade do consumidor, bem como garantir a segurança dos alimentos. Os métodos tradicionais de análise de moléculas de baixo peso molecular em amostras complexas envolvem duas etapas: a primeira, o preparo da amostra, visa extrair o analito da matriz e pré concentrá-lo, eliminando interferentes, a segunda, consiste na análise de fato, que normalmente é feita por técnicas cromatográficas^{9,10}.

A etapa de preparo de amostras em matrizes complexas é uma tarefa dispendiosa e demorada, pois visa a eliminação de grande parte dos interferentes da matriz da amostra, o isolamento seletivo dos analitos, além de concentrá-los, por quase sempre estarem em baixas concentrações, afetando diretamente a confiabilidade das análises¹¹. Os métodos tradicionais empregados, como a extração líquido-líquido (do inglês – *liquid-liquid extraction* - LLE) e a extração em fase sólida convencional (do inglês- *solid phase extraction* - SPE) cumprem bem o seu propósito, no entanto, apresentam pouca seletividade e requerem um processo de eliminação de macromoléculas anteriores ao preparo da amostra propriamente dito¹².

Como alternativa ao preparo de amostra, têm-se os sorventes que podem ser utilizados em análises diretas. Os polímeros molecularmente impressos (MIP) se tornam atrativos, pois eles são capazes de extrair o analito de interesse por meio de cavidades seletivas e os materiais de acesso restrito (do inglês *Restricted Access Materials* – RAM) são capazes de reter diversos analitos de baixo peso molecular e eliminar macromoléculas como proteínas e polipeptídios¹³.

Os MIPs apresentam alta seletividade a uma molécula ou classe de moléculas, maior estabilidade química em relação aos adsorventes de natureza biológica, boa capacidade de adsorção, preparação rápida, boa resistência térmica e melhores condições de estocagem, sendo muito eficientes para o estudo de amostras que não apresentam macromoléculas em sua constituição, ou que passaram por uma etapa prévia de eliminação dessas substâncias¹⁴. Já os RAM, embora eficientes na eliminação de macromoléculas, não apresentam reconhecimento molecular e por isso são pobres em seletividade. Assim, a junção desses sorventes em um material híbrido, denominado RAMIP, une as vantagens advindas de ambos, visto que esses materiais apresentam sítios seletivos de reconhecimento, bem como grupos hidrofílicos externos que impedem a adsorção de proteínas. Tal fato permite que o preparo de amostras seja feito de forma seletiva e em uma única etapa e ainda possibilita a utilização de métodos de análise on-line, em sistemas multidimensionais¹⁵.

A espectrometria de massas (MS) tem se destacado como uma ferramenta bem-sucedida na análise de compostos orgânicos em amostras complexas, devido à alta sensibilidade e seletividade. Nesta técnica, a ionização por *electrospray* (ESI) é amplamente utilizada na análise de medicamentos. Contudo, antes da análise por MS, é comum a necessidade de uma etapa de separação cromatográfica para minimizar a influência da matriz e, conseqüentemente, a supressão iônica. Uma alternativa para minimizar esse efeito é o uso de RAMIP na etapa de preparação da amostra, pois esses materiais têm a capacidade de reduzir a presença de interferentes em concentrações elevadas, o que resulta na melhoria da eficácia da análise, mesmo na ausência de uma coluna analítica¹⁶.

Neste estudo, aproveitando as vantagens tanto dos RAMIP quanto da análise por MS, foi proposto um novo método analítico para a análise de mebendazol e albendazol em leite de vaca. Este método permite a análise simultânea desses compostos em um único sistema, eliminando a necessidade de extração off-line e separação cromatográfica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo principal desenvolver e validar um novo método analítico on-line para a determinação de resíduos de albendazol e mebendazol em amostras de leite bovino empregando a extração em fase sólida molecularmente impressa de acesso restrito on-line e ESI-MS/MS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho se propõe a:

- a) sintetizar o polímero de impressão molecular de acesso restrito (RAMIP) seletivo a anti-helmínticos benzimidazólicos e recobri-lo com albumina sérica bovina, originando o RAMIP-BSA;
- b) caracterizar os materiais obtidos por meio de técnicas espectroscópicas, de imagem e térmicas;
- c) estudar o perfil de adsorção de anti-helmínticos benzimidazólicos pelo RAMIP-BSA;
- d) desenvolver o método de extração on-line, seguido da análise por ESI-MS/MS;
- e) otimizar as condições de extração e análise;
- f) validar o método desenvolvido;
- g) aplicar o método desenvolvido na análise de amostras de leite adquiridas no comércio local.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção é abordada uma breve revisão de literatura sobre MIPs, RAMs, RAMIPs, anti-helmínticos e análise direta por espectrometria de massas.

3.1 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPs)

Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) foram alvo de dedicação para o desenvolvimento de sistemas com reconhecimento biomimético semelhantes aos sistemas específicos enzima-substrato ou antígeno-anticorpo¹³. Assim, surgiu a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular¹⁷.

As observações em relação aos materiais seletivos se deram no início da década de 1930, quando foi observado por Polyakov que era possível obter seletividade molecular em sílica gel por pré-tratamento do ácido silícico com adsorbatos orgânicos antes de sua policondensação¹⁸. Também foi observado por Dickey, nas décadas de 40 e 50, que a precipitação do ácido silícico na presença de corantes alquilo gerava um xerogel com uma capacidade de adsorção grandemente aumentada para os corantes em questão¹⁹.

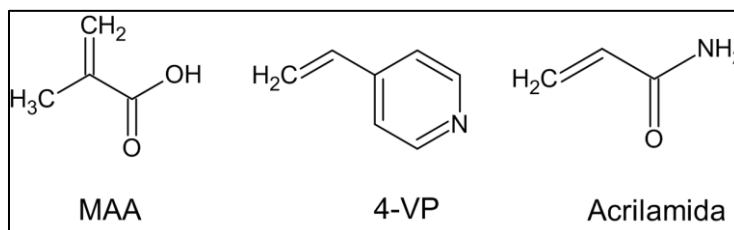
Em 1972 Wulff e Sarhan também contribuíram para o desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos. Eles foram pioneiros ao publicar um trabalho que descrevia a preparação de polímeros utilizando moléculas orgânicas como molde para a separação enantiomérica de racematos de açúcares. Desde então, os MIPs tomaram espaço em diversos trabalhos e exibiram inúmeras vantagens em seu uso¹⁸.

Os MIPs são materiais rígidos e tridimensionais sintetizados ao redor de uma molécula molde (molécula chave, alvo, impressa, analito ou *template*, do inglês), sendo esta o próprio analito ou um composto da mesma classe química. A escolha dessa molécula é de grande importância pois deve apresentar condições estáveis (temperatura ou irradiação de UV) durante a síntese, ser solúvel no solvente utilizado, não deve conter grupos envolvidos na polimerização e apresentar grupos funcionais bem adaptados para a ligação com o monômero funcional, resultando em sítios seletivos^{20,21}.

O processo de obtenção desses materiais é conduzido de maneira que, inicialmente, sítios de reconhecimento sejam obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais (MF) polimerizáveis ao redor da molécula molde (MM). Posteriormente a MM é removida, resultando em cavidades cuja forma, funcionalidade, tamanho e arranjo espacial são complementares à molécula impressa, o que torna o polímero seletivo a essa molécula²².

A interação entre MM e MF é a base do reconhecimento molecular. Quando a MM é aceptora de próton (caráter básico) utiliza-se um MF doador de próton (caráter ácido) ou vice-versa, como forma de maximizar a formação dos complexos e a moldagem molecular. Os monômeros funcionais mais empregados estão listados na Figura 1, sendo eles o ácido metacrílico (MAA), que interage mais facilmente com analitos que possuem grupos básicos, a 4-vinilpiridina (4-VP) que interage preferencialmente com analitos ácidos e a acrilamida que faz apenas ligações de hidrogênio com a molécula molde²³.

Figura 1 — Estrutura dos principais monômeros funcionais



Fonte: Do autor, 2023.

De acordo com a natureza da interação entre o analito e o MF, três tipos de síntese são relatadas: covalente, não covalente ou semi-covalente. A primeira abordagem, envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre a molécula molde e o monômero funcional na etapa de síntese. Após a polimerização, a molécula molde é retirada do polímero pela clivagem das ligações correspondentes. A forte ligação entre a molécula molde e o monômero funcional é a principal vantagem desta forma de síntese, o que garante uma maior seletividade do polímero impresso. Em contrapartida, isso dificulta o processo de eluição dos analitos, sendo necessário, em muitos casos, procedimentos drásticos de hidrólise²⁴.

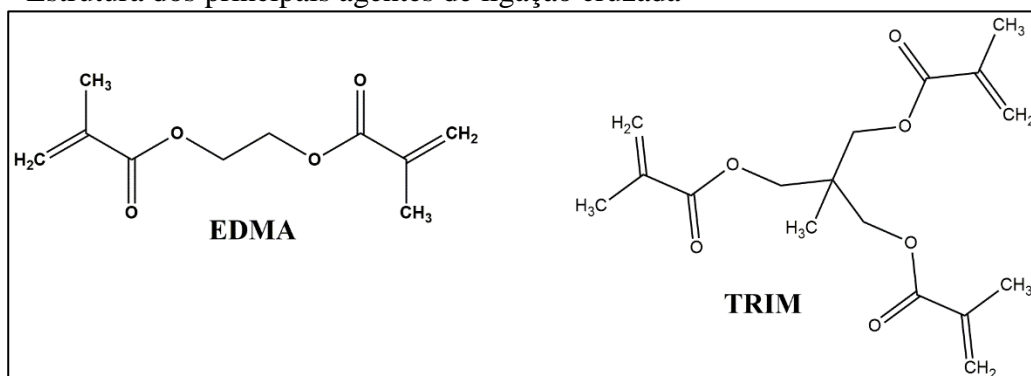
A síntese não covalente é baseada na formação de interações mais fracas entre a MM e o MF, como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. A possibilidade de aplicação para analitos que pertençam a uma mesma classe e à facilidade de remoção do *template* faz com que esta estratégia seja a mais utilizada para obtenção de MIPs. No entanto, é observada menor seletividade nesses polímeros, uma vez que as interações entre moléculas são mais fracas quando comparadas com a ligação covalente²⁴.

Na abordagem semi-covalente o processo de polimerização é mediado por ligações covalentes, que garante a maior seletividade ao MIP; enquanto as demais interações, durante a utilização do material, são estabelecidas por ligações não-covalentes²⁵.

Após as interações entre analito e monômero funcional ocorrerem, estas são fixadas através de reações de entrecruzamento de polímeros, por meio de um agente de ligação cruzada (ALC). Este deve apresentar grupos que possam interagir de maneira estável com os grupos polimerizáveis do MF para a formação do polímero²⁶. Além disso, desempenha a função de controle da morfologia da matriz polimérica, estabilização dos sítios de ligação impressos e confere resistência mecânica à matriz do polímero, favorecendo o aumento do número de cavidades efetivas²⁷.

O etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e trimetacrilato (TRIM) são os principais agentes de ligação cruzada, representados na Figura 2. O EGDMA, promove a formação de polímeros estáveis (térmica e mecanicamente) quando comparados aos obtidos com TRIM, que por sua vez, gera polímeros cujo processo de transferência de massa durante a extração é mais rápido, gerando maior capacidade de carregamento²⁷.

Figura 2 — Estrutura dos principais agentes de ligação cruzada



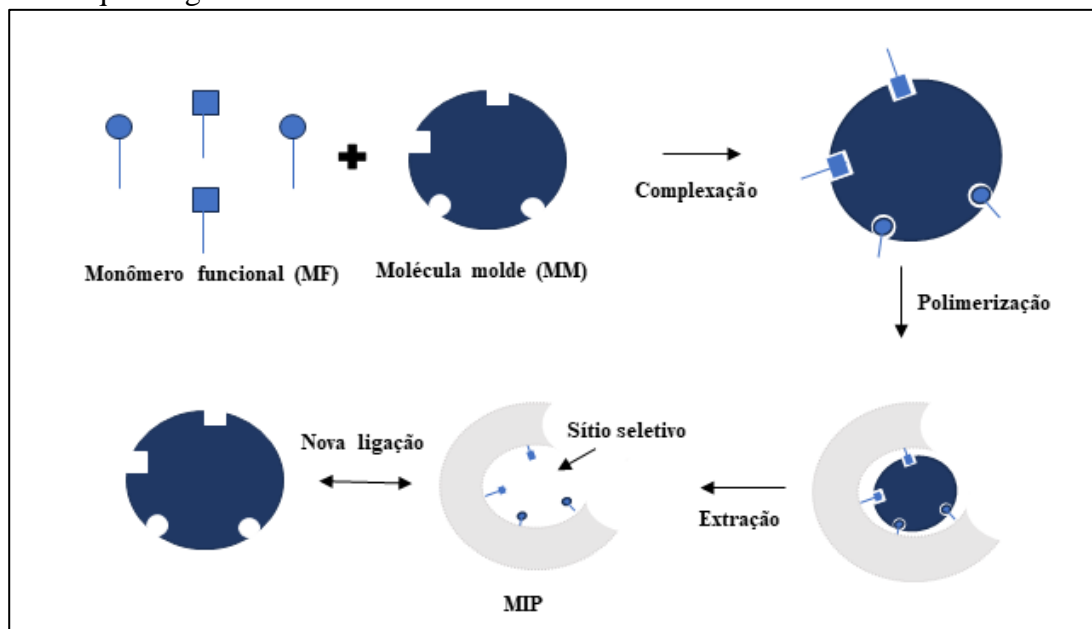
Fonte: Do autor, 2023.

Outro componente utilizado na síntese é o iniciador radicalar (IR), que é responsável pela formação de radicais livres que inicia a polimerização. Para a formação desses radicais é necessário que o IR sofra clivagem em sua estrutura através de incidência de radiação UV ou aquecimento. 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, sendo o iniciador mais usado representado pelo 2,2'- azobisisobutironitrila (AIBN)²⁸.

Ao final do processo de síntese, a remoção da molécula molde da matriz polimérica forma lacunas (sítios de reconhecimento) que irão exibir afinidade pelo analito^{29,30}. Os sítios

seletivos que são formados se completam ao analito em forma, tamanho e funcionalidade^{31,32}. A Figura 3 a seguir demonstra como é realizado o processo de síntese de um MIP de forma genérica.

Figura 3 — Esquema genérico da síntese de MIP



Fonte: Adaptado de FIGUEIREDO *et al.*, 2008¹³.

O processo de polimerização pode ocorrer em *bulk*, suspensão, precipitação e enxerto. A primeira é a mais simples e rápida, onde todos os reagentes como a MM, o MF, o ALC e o IR são dissolvidos em um solvente apropriado e colocados em uma ampola de síntese. Em seguida, o oxigênio é retirado utilizando argônio, nitrogênio ou mesmo ultrassom. A ampola é submetida a aquecimento ou radiação UV para formação de radicais livres que dão início à síntese. Essa técnica resulta em polímeros de consistência rígida. As desvantagens desse método são que ao se triturar os monólitos cerca de 70% dos sítios de ligação formados são perdidos e ademais as partículas obtidas são heterogêneas²⁵.

Na polimerização por precipitação, um excesso de solvente é adicionado para dissolução dos reagentes, impedindo a formação de um monólito polimérico. A precipitação ocorre quando o polímero adquire densidade maior que a solução e a formação do polímero ocorre sob agitação e aquecimento durante um período de 24 hrs a 60 °C, o que favorece a formação de partículas mais homogêneas em relação à síntese *in bulk*³³.

Outra metodologia empregada para a obtenção de partículas mais uniformes é a síntese por suspensão. Nesse método os reagentes da síntese são dissolvidos em solvente orgânico

apolar sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, uma emulsão é formada e estabilizada pela adição de um tensoativo. Para o início da polimerização a temperatura do sistema é aumentada. Nesta etapa as partículas do MIP se formam dentro do agente dispersante³⁴.

A polimerização por enxerto, utiliza-se de um suporte polimérico de trimetilolpropano com poros esféricos para síntese do MIP. Os reagentes são dissolvidos e adicionados nos poros deste suporte. Após este processo, a mistura é degaseificada e a síntese é realizada à temperatura de 60 °C por 4 hrs. Ao término, adiciona-se água e em seguida é necessária uma forte agitação para que as microesferas do MIP sejam suspensas³⁴.

Os MIPs têm chamado atenção devido a suas vantagens em relação aos sorventes convencionais, tais como a facilidade de síntese, o baixo custo dos reagentes empregados, a estabilidade química, física e térmica do material, a possibilidade de reutilização e elevada seletividade^{35,36}. Apesar de apresentem inúmeras aplicações, os MIPs retêm macromoléculas quando empregados no preparo de amostras complexas. A retenção de proteínas na superfície do sorvente, por exemplo, pode bloquear os sítios de reconhecimento afetando a eficiência da extração^{37,38}.

3.2 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAMs)

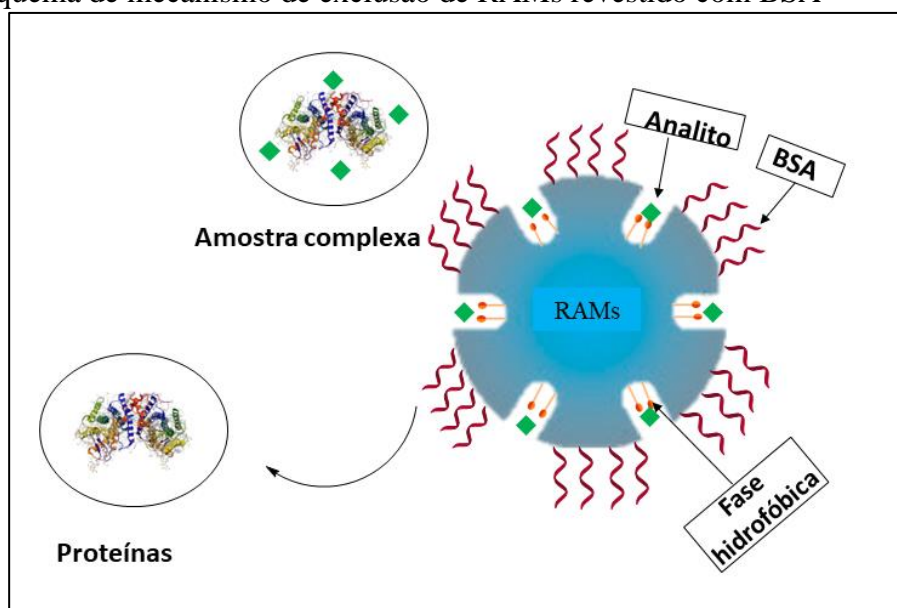
No ano de 1991, Desilets *et al*, introduziram o conceito de materiais de acesso restrito (RAM)³⁹. Esses materiais, também conhecidos como sorventes de acesso restrito, foram desenvolvidos para otimizar a análise de compostos orgânicos em matrizes complexas, pelas características da superfície hidrofílica e a restrição pelo tamanho do poro. Essas características impedem a adsorção de macromoléculas e o acesso delas aos sítios de ligação internos. Esses sítios internos são onde ocorre a sorção dos analitos de interesse, como moléculas de baixo peso molecular ou íons, por meio de diversos mecanismos. Como resultado, a preparação das amostras pode ser realizada em uma única etapa, eliminando a necessidade de pré-tratamento⁴⁰⁻⁴².

Basicamente, o mecanismo de eliminação de macromoléculas se deve à presença de poros dotados de grupos ligantes (no interior do RAM) capazes de capturar moléculas de baixo peso molecular (barreira física)⁴³. Por outro lado, a superfície externa dos RAM pode ser revestida com grupos hidrofílicos (barreira química), evitando assim a adsorção da matriz proteica. Desse modo, no momento da extração, os analitos de interesse (de baixo peso

molecular) penetram nos poros e são retidos pelos grupos ligantes, enquanto as macromoléculas são percoladas para o descarte sem que haja retenção das mesmas no RAM⁴⁴.

Atualmente o revestimento nos materiais de acesso restrito com albumina sérica bovina (BSA) tem se mostrado muito eficiente para a produção de um RAM. A BSA é imobilizada sobre um suporte (núcleo onde ocorrerá a sorção do analito) por meio de reações de entrecruzamento, utilizando glutaraldeído. É devido a esse revestimento que o acesso das macromoléculas hidrofílicas fica restrito⁴⁵. A Figura 4 demonstra o mecanismo de exclusão de um RAM revestido com BSA.

Figura 4 — Esquema de mecanismo de exclusão de RAMs revestido com BSA



Fonte: Do autor, 2023.

As fases RAM têm diversas aplicações analíticas por terem a capacidade de suportar repetidas injeções com grandes volumes de amostras, sem que suas propriedades sejam alteradas e por serem utilizadas tanto no modo *offline* de análise como no modo *on-line*. No primeiro caso o processo de preparo da amostra ocorre de forma independente, antes da determinação. A amostra, rica em macromoléculas, é diretamente percolada em cartuchos, por exemplo, sem a necessidade do pré-tratamento e as extrações decorrem como na SPE tradicional. Após os processos de lavagem e eluição, o extrato é recolhido e pode ser analisado^{46,47}. Já no segundo caso uma coluna RAM é usada como pré-coluna e, após a eliminação das macromoléculas, os analitos são eluídos para uma coluna analítica, utilizando-se uma válvula de comutação, onde são separados e analisados⁴⁷.

Uma grande vantagem desses materiais é que eles apresentam alta resistência física com um bom desempenho em termos de capacidade de retenção, eficiência e reprodutibilidade. Além disso, somente as moléculas de baixo peso molecular ficam retidas no material, possibilitando uma quantificação com melhores exatidão e precisão⁴⁸.

3.3 POLÍMEROS DE ACESSO RESTRITO MOLECULARMENTE IMPRESSOS (RAMIPs)

Como relatado anteriormente, a utilidade dos MIPs é relevante devido a elevada seletividade à MM ou uma classe de moléculas, entretanto, macromoléculas presentes nas amostras, como proteínas e lipídeos, são fortemente adsorvidas nas superfícies poliméricas afetando as propriedades de reconhecimento. Já os RAM, tem excelente capacidade de eliminar macromoléculas, mas não apresentam seletividade quando se avalia analitos de baixo peso molecular^{36,41}.

Em 1999, Haginaka e colaboradores publicaram o primeiro trabalho que abordava o desenvolvimento de um material que unia as vantagens dos MIPs e dos RAMs. Este material foi denominado de polímero de impressão molecular de acesso restrito, sendo capaz de reter seletivamente o analito de interesse e eliminar as macromoléculas. Os autores utilizaram este sorvente para a determinação de (S)-naproxeno, (S) ibuprofeno e propranolol. A síntese foi baseada em uma modificação da superfície externa do MIP⁴⁹.

Os autores empregaram o 4-vinilpiridina como MF e etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) como ALC. Após quatro horas do início da síntese, adicionou-se uma mistura de dimetacrilato de glicerol (GDMA) e monometacrilato de glicerol (GMMA). Uma camada hidrofílica foi formada em torno dos polímeros, que resultou em um RAMIP com boa capacidade para eliminar macromoléculas, boa seletividade e sensibilidade, sendo utilizado na análise direta de naproxeno em amostras de soro sanguíneo através do sistema *column switching*. Além disso, os polímeros também foram utilizados para análise de anti-inflamatórios, antiepilépticos e compostos fenólicos em amostras biológicas⁴⁹.

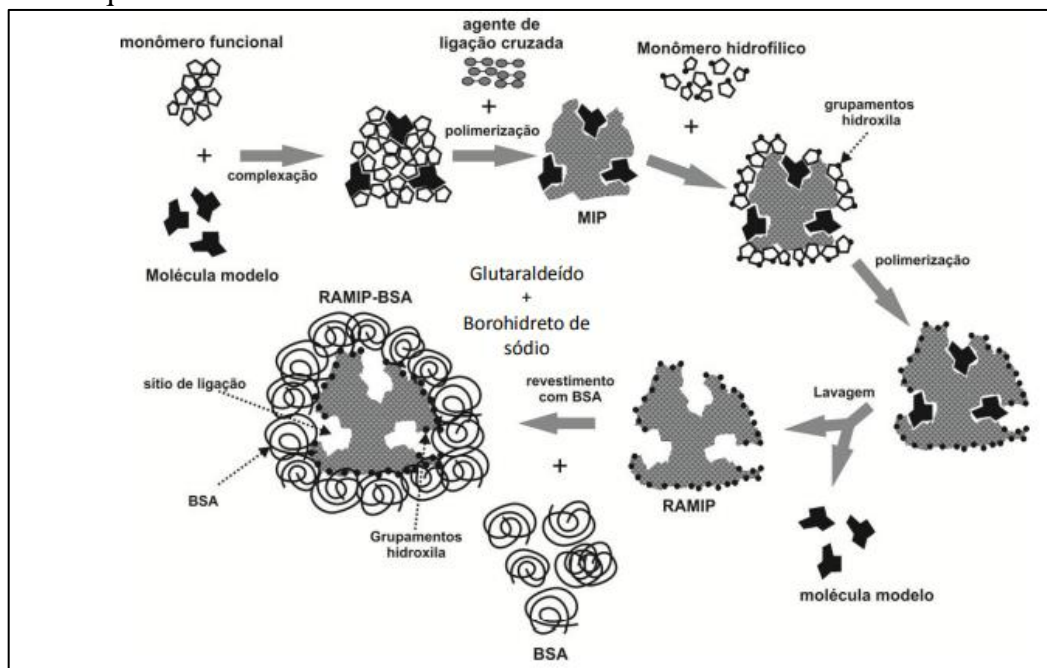
Os RAMIPs têm sido utilizados com sucesso para a determinação de diferentes analitos em diversos tipos de amostras complexas^{50,51,52,53,54}. Em relação à análise de contaminantes em alimentos, Souza *et al.* (2016), desenvolveram um RAMIP sintetizado em um capilar de sílica, sendo usado para a extração parabenos presentes em amostras de leite materno. A análise foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas. Os parâmetros de validação analítica atestaram que a SPME/UHPLC-MS/MS foi um método

apropriado e eficaz para determinar os parabenos e avaliar a exposição humana a esses compostos⁵².

Em outro trabalho realizado por Sun *et al.* (2019), um polímero molecularmente impresso de acesso restrito com BSA foi preparado na superfície da estrutura metal-orgânica mesoporosa UiO-66-NH₂ (MOF) para determinar seletivamente os antibióticos ofloxacina e enrofloxacina do soro bovino. A morfologia da superfície, o comportamento de impressão e as propriedades de exclusão proteica da UiO-66-NH₂@RAMIP@BSA foram investigados. De acordo com os autores, a capacidade máxima de adsorção foi de 50,55 mg g⁻¹ para ofloxacina, com uma taxa de exclusão proteica de 99,4%. O equilíbrio de adsorção foi atingido em 9 min. A faixa linear e o limite de detecção foram de 0,1–100 µg mL⁻¹ e 15,6 ng mL⁻¹, respectivamente. Os resultados sugeriram que o material é um adsorvente adequado para análise de amostras biológicas⁵⁵.

Em 2013, Moraes *et al.* propuseram um novo polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAMIP-BSA) que foi empregado na extração direta de compostos fenotiazínicos em plasma humano. Após a síntese, revestiu-se o polímero com uma camada de BSA empregando glutaraldeído como agente de ligação cruzada. Quando a extração de uma amostra proteica foi realizada nesse material em um pH diferente do ponto isoelétrico das proteínas (da amostra e do RAMIP-BSA), a repulsão eletrostática impediu a aproximação das proteínas da amostra no RAMIP-BSA, promovendo assim a exclusão dessas proteínas. De acordo com os autores, a capacidade de eliminação das proteínas do material foi de 99,7%, vida útil de 90 injeções e o material também apresentou seletividade para fármacos da classe dos fenotiazínicos⁵⁶. A Figura 5 demonstra o esquema geral da síntese realizada pelos autores.

Figura 5 — Esquema de síntese de um RAMIP-BSA



Fonte: MORAES *et al.*, 2013⁵³.

Neste contexto, as fases extratoras do tipo RAMIP-BSA têm se destacado quanto à capacidade de exclusão das proteínas de matrizes complexas e de retenção de uma série de fármacos ácidos, básicos e neutros. A BSA é suficientemente hidrofílica e, através de interações repulsivas, exclui com eficiência as proteínas de matrizes biológicas, como o leite, sem perda dos analitos de interesse.

3.4 ANTI-HELMÍNTICOS

O aumento da demanda de alimentos no mundo e conseqüentemente o expressivo aumento da necessidade de produção tiveram influência direta no uso de medicamentos veterinários. O uso de medicamentos com amplo espectro de ação é a forma mais utilizada para controlar as parasitoses, porém na maioria das vezes são administrados de forma rotineira. Com isso, o uso crescente e inadequado de antimicrobianos e antiparasitários apresenta risco para o desenvolvimento da resistência desses organismos, gerando redução da eficiência destas substâncias nos animais^{57,58}.

O controle ou prevenção de infecções por vermes depende quase exclusivamente de drogas anti-helmínticas, sendo a maioria do gado dos países industrializados tratados frequentemente por esses fármacos. Assim, a evolução da resistência anti-helmíntica em vários

parasitas de gado e animais domésticos se deu em resposta ao uso generalizado desses medicamentos⁵⁹.

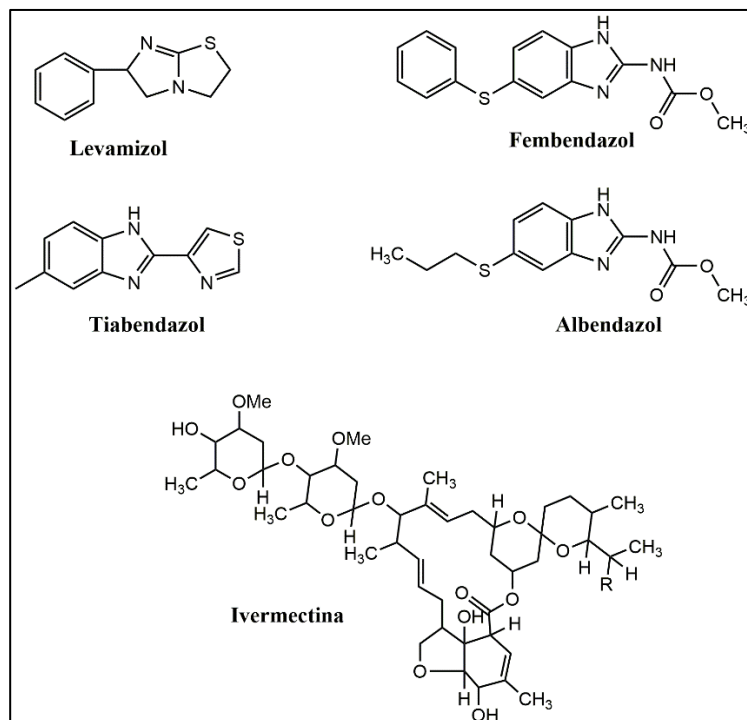
O primeiro relato desse fenômeno foi em 1964, quando observou-se a resistência de *Haemonchus contortus*, um parasita nematoide que afeta ruminantes. Nos dez anos seguintes, observou-se repetidamente a ocorrência de resistência em parasitas de ovinos. Posteriormente, essa resistência também foi identificada em nematoides que afetam bovinos e cavalos. Após mais de cinco décadas desde o primeiro relato de resistência anti-helmíntica em parasitas de gado, a prevalência desse fenômeno aumentou globalmente, adquirindo uma importância cada vez maior na indústria pecuária^{60,61}.

O termo anti-helmínticos aplica-se a substâncias que atuam para eliminar os vermes do trato gastrintestinal ou espécies e formas de helmintos em desenvolvimento, que invadem órgãos ou tecidos. Podem atuar no metabolismo do verme, esgotando suas reservas energéticas, ou atuar lesionando a cutícula do verme resultando em digestão parcial ou rejeição pelo mecanismo imunológico⁶².

Sabe-se que a uso de anti-helmínticos de forma racional tem trazido benefícios à pecuária, tanto para gado de corte quanto para a pecuária leiteira no quesito de ganho de peso e no aumento na quantidade de leite produzido. Entretanto, o prazo para eliminação desses compostos deve ser respeitado para evitar problemas com relação a resíduos nos alimentos⁶³.

As principais classes de anti-helmínticos utilizadas na pecuária pertencem às ivermectinas, aos imidazotiazóis, salicilanilídeos e benzimidazóis que são os mais amplamente utilizados na medicina veterinária devido ao amplo espectro anti-helmíntico⁶⁴. A Figura 6 demonstra a estrutura química dos principais anti-helmínticos utilizados na medicina veterinária.

Figura 6 — Principais anti-helmínticos utilizados na medicina veterinária



Fonte: Do autor, 2023.

De acordo com o espectro de ação os anti-helmínticos podem ser classificados e divididos em dois grupos: um grupo de amplo espectro e outro de curto espectro. O primeiro age sobre muitas espécies de nematódeos, cestódeos e trematódeos e o segundo grupo que tem pouco poder nematicida, sendo, portanto, de curto espectro. Os dois grupos podem ser divididos em várias famílias, com diferentes mecanismos de ação como os benzimidazóis, imidazotiazóis, lactonas macrocíclicas e derivados da aminoacetonitrila (amplo espectro) e salicilanídeos (curto espectro)^{62,65}.

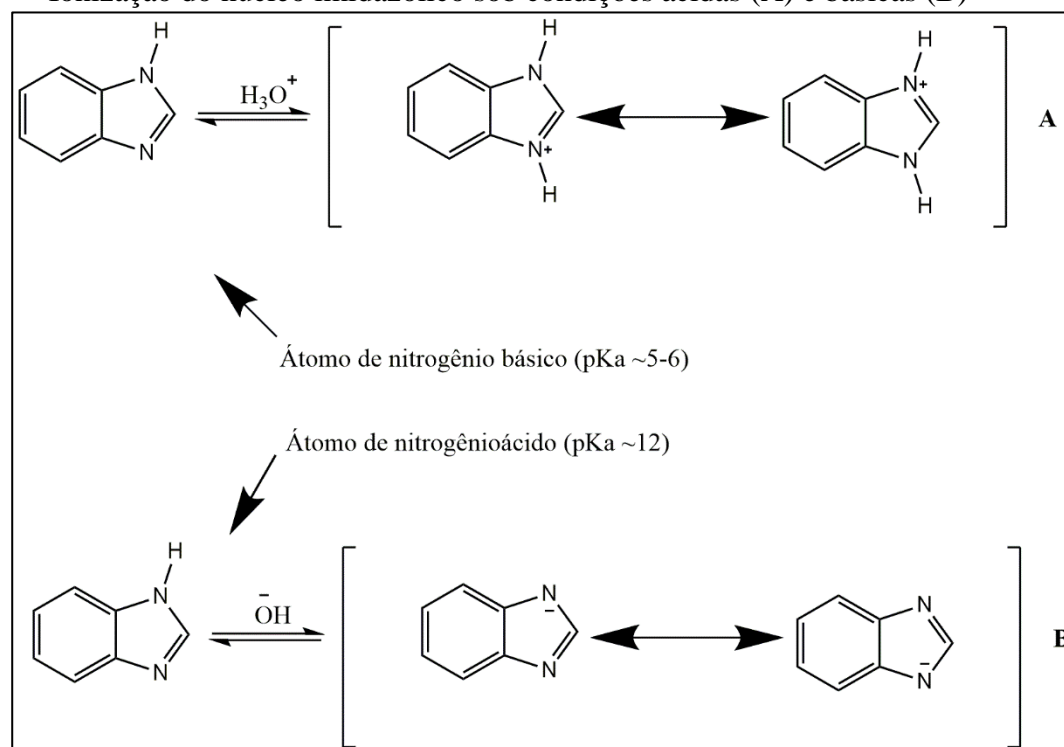
Os benzimidazóis e pró-benzimidazóis atuam em nematódeos, cestódeos e trematódeos inibindo a síntese de tubulina, que é a proteína responsável pela formação de microtúbulos no citoesqueleto do parasita⁶⁶. Essas estruturas são fundamentais à divisão celular e ao transporte de nutrientes e metabólitos e sua ausência impede a absorção de nutrientes, principalmente glicose (fonte de energia dos vermes), resultando na utilização dos estoques de glicogênio. Assim, várias funções dos parasitas são comprometidas, o que leva à morte desde larvas até vermes adultos, além disso, compromete o embrionamento dos ovos⁶³.

O tiabendazol foi o primeiro anti-helmíntico benzimidazólico comercializado, há mais de 40 anos. Desde a sua descoberta, vários anti-helmínticos da classe dos benzimidazóis tem se tornado disponíveis para o tratamento de uma grande gama de helmintos. O amplo espectro de atividade desses medicamentos, a alta eficiência, o baixo custo e a facilidade da administração

tornam os benzimidazólicos amplamente utilizados no tratamento, em larga escala, de infecções parasitárias na medicina veterinária⁶⁷.

A classe dos benzimidazóis apresenta em sua estrutura um anel imidazólico contendo um átomo de nitrogênio ácido e um básico que, sob condições ideais pode estar protonado ($pK_a \sim 5-6$) ou desprotonado ($pK_a \sim 12$), respectivamente. A Figura 7 demonstra a ionização do núcleo imidazólico sob condições ácidas e básicas.

Figura 7 — Ionização do núcleo imidazólico sob condições ácidas (A) e básicas (B)



Fonte: Do autor, 2023.

Dentre os benzimidazóis mais utilizados na medicina veterinária é possível destacar o albendazol e o mebendazol^{68,69}.

3.4.1 Albendazol

O albendazol (ABZ) é um composto anti-helmíntico pertencente à classe dos benzimidazóis. Também chamado de metil-[(5-propil-tio)-1H-benzimidazol-2-il]carbamato, consiste em um agente de largo espectro que é extremamente importante e comercializado em países da América Latina, Ásia e África para tratamentos veterinários e humanos contra diferentes tipos classes e estágios de vermes parasitas. É relativamente insolúvel em água e na

maioria dos solventes orgânicos. Apresenta um dos pKa acima de 10, propriedade esta que influencia sua absorção e comportamento no organismo⁷⁰.

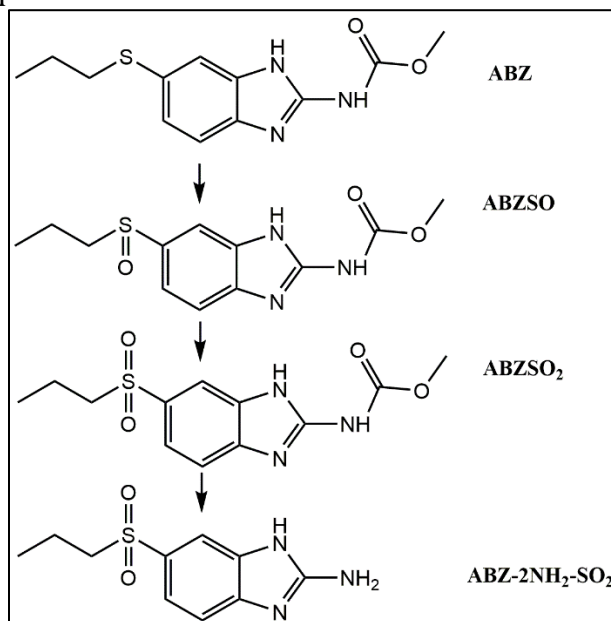
De acordo com Dayan (2003), a absorção oral de ABZ em camundongos e ratos é aproximadamente de 20-30% e em gado alcança valores de 50%, comparado com aproximadamente 1-5% em humanos. A absorção em humanos é intensificada pela presença de alimentos gordurosos, podendo ser aumentada a toxicidade em até cinco vezes⁷¹.

O ABZ é um anti-helmíntico polivalente, que exerce diferentes atividades como: ovicida, vermícida e larvícida sobre os cestóides, nematóides e acantocéfalos. Age de forma a inibir a formação dos microtúbulos através do bloqueio da captação da glicose, com isso resulta na depleção de glicogênio dos parasitas e, por sua vez, na formação reduzida de trifosfato de adenosina (ATP), necessário para a sobrevivência e reprodução destes. Consequentemente ocorrem paralisia e morte dos vermes, que são eliminados do organismo⁷².

O tratamento por ABZ é administrado por via oral. Após a ingestão é absorvido no intestino e convertido em seus metabólitos, albendazol sulfóxido (ABZ-SO), albendazol sulfona (ABZ-SO₂) e albendazol 2-aminosulfona (ABZ-NH₂-SO₂). Quando utilizado no tratamento de animais produtores de alimentos, os metabólitos e os compostos de origem, podem ser encontrados nos tecidos dos animais^{73,74}.

Ao ser administrado, o ABZ é rapidamente oxidado em seu metabólito ABZ-SO que é considerado responsável diretamente ou indiretamente pela eficácia e toxicidade do albendazol. O ABZ-SO é oxidado em ABZ-SO₂ e após a remoção do grupo carbamato por hidrólise, forma o ABZ-NH₂-SO₂, sendo esses dois últimos metabólitos sem atividade farmacológica⁷⁴. A Figura 8 traz a representação da estrutura química do albendazol e de seus metabólitos.

Figura 8 — Estrutura química do Albendazol e seus metabólitos



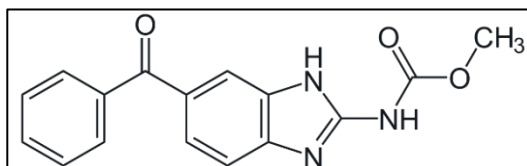
Fonte: Do autor, 2023.

Devido ao potencial uso de anti-helmínticos no tratamento de vermes parasitas, o albendazol está na lista de medicamentos essenciais da organização mundial de saúde, além do amplo espectro de atividade, o pró-fármaco também é de baixo custo, alta eficiência e apresenta facilidade de administração⁷⁵.

3.4.2 Mebendazol

O mebendazol (MBZ) ou éster metílico do ácido (5-benzoil-1 H-2-benzimidazolil) carbâmico, representado na Figura 9, é um anti-helmíntico que faz parte dos benzimidazólicos, sendo altamente eficaz no tratamento das principais infecções causadas por ascaridíase, enterobíase, tricuriase e ancilostomíase, como também nas infecções humanas causadas por nematódeos menos comuns⁷⁶.

Figura 9 — Estrutura química do Mebendazol



Fonte: Do autor, 2023.

Este fármaco é um benzimidazol de amplo espectro, farmacologicamente classificado no grupo dos antiparasitários, usado por mais de 30 anos na medicina veterinária para tratar uma variedade de infestações parasitárias⁷⁷.

A imobilização e a morte dos parasitas gastrointestinais por esse fármaco ocorrem lentamente, podendo não ter a eliminação completa no trato gastrointestinal até vários dias após o tratamento. O mecanismo de ação contra esses vermes consiste em inibir a capacidade de captar glicose produzindo redução na formação de adenosina trifosfato necessária para a sobrevivência e reprodução. Entre os efeitos colaterais pode-se destacar: convulsões, anorexia, náuseas, diarreia, vômito, dor abdominal, alucinações, embriotoxicidade e teratogenicidade⁷⁸.

O MBZ é descrito como um pó branco ou amarelado, que deve ser armazenado protegido da luz, inodoro, praticamente insolúvel em água, álcool, éter, diclorometano e em ácidos minerais diluídos, sua solubilidade ocorre em ácido fórmico e clorofórmio e a temperatura de ponto de fusão é aproximadamente 290 °C^{76,79,80}.

Apesar dos benefícios oriundos da administração de anti-helmínticos na bovinocultura, o uso indiscriminado desses medicamentos e a dificuldade no controle dos nematódeos acarretou a queda da eficácia e sinais do aparecimento da resistência anti-helmíntica. Juntamente, enfrenta-se o problema decorrente da ausência de novas classes químicas para se ter um revezamento entre os fármacos utilizados para controle desses parasitas⁸¹. Devido a esse fato, há registros de resistência de anti-helmínticos em várias partes do mundo como Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido e no Brasil^{81,82}.

Em virtude disso, muitos produtores utilizam doses maiores que o recomendado em seus rebanhos e muitas vezes não respeitam os períodos de carência para a comercialização dos produtos de origem animal. Segundo o ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), o limite máximo de resíduo (LMR) em leite de albendazol é de 100 µg L⁻¹ e para mebendazol não há tolerância de resíduos desse fármaco, não sendo permitido o uso em animais produtores de leite para consumo humano⁸³. Portanto, é imprescindível o controle e uso racional desses medicamentos, bem como o monitoramento da sua presença em alimentos como o leite.

3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A Espectrometria de Massas (MS) tem sido amplamente utilizada para detectar compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas. Essa técnica permite aumentar a sensibilidade de detecção, reduzir as interferências espectrais de compostos presentes na matriz e também proporcionar uma maior quantidade de informações estruturais

disponíveis⁸⁴. Os avanços nessa técnica têm sido fundamentais para pesquisas e análises em várias áreas, como a análise de resíduos de pesticidas em alimentos, identificação de compostos farmacêuticos em amostras biológicas e a detecção de poluentes em amostras ambientais, proporcionando resultados mais precisos e confiáveis^{85,86,87}.

O princípio básico da espectrometria de massas consiste em três componentes essenciais, uma fonte de íons, analisador de massas e detector. A fonte de íons converte moléculas ou átomos do analito por meio de um método apropriado em espécies iônicas em fase gasosa, através da remoção ou adição de elétron(s) ou próton(s). Durante o processo de ionização, o excesso de energia transferida pode quebrar a molécula em fragmentos característicos. O analisador de massa que separa e analisa os íons das moléculas e seus fragmentos carregados com base em seus sinais de m/z , e o detector, é onde a corrente iônica gerada pelos íons separados por massa é medida, amplificada e exibida na forma de um espectro de massas. Essa configuração permite a análise precisa e seletiva de íons em uma amostra, fornecendo informações importantes sobre sua identificação e quantificação^{88,89}.

A fonte de ionização mais comumente utilizada na LC-MS é a *electrospray*. Nesse método, um líquido passa por um tubo capilar com baixo fluxo e é submetido a um forte campo elétrico sob pressão atmosférica. Esse campo elétrico faz com que o líquido acumule carga na superfície do capilar, gerando um "*spray*" de pequenas gotículas altamente carregadas. Essas gotículas, contendo os íons dos compostos de interesse, atravessam uma "cortina" de gás inerte aquecido, geralmente nitrogênio, ou um capilar aquecido, onde as moléculas do solvente são removidas, deixando apenas os íons livres. Em seguida, esses íons são introduzidos no analisador de massas, onde são separados de acordo com sua razão massa-carga (m/z) e detectados, possibilitando a análise e identificação dos compostos presentes na amostra^{90,91}.

Para alcançar maior seletividade e sensibilidade, é possível realizar a fragmentação do íon, seja dentro de uma célula de colisão ou mesmo no próprio analisador. Essa abordagem é denominada espectrometria de massas em tandem (MS/MS), a qual consiste em duas etapas sequenciais de análise de espectrometria de massas. Na primeira etapa, o íon precursor é selecionado e na segunda etapa, ocorre a relação entre o íon de interesse e outros íons que surgem a partir de sua fragmentação, com base na razão m/z . O monitoramento de diversas transições é referido como monitoramento de reações múltiplas (MRM) ou monitoramento de reações selecionadas (do inglês- *selected reaction monitoring* -SRM)⁹².

3.5.1 Análise direta por espectrometria de massas

Para assegurar análises eficientes, é fundamental dispor de métodos capazes de quantificar os analitos em baixas concentrações. Optar por um único método para analisar diversos fármacos oferece várias vantagens, como redução do tempo de análise e diminuição geral dos custos com solventes e energia elétrica. Contudo, para realizar a análise simultânea dos compostos, é crucial comprometer-se com a seleção cuidadosa das condições experimentais e das técnicas, a fim de garantir a determinação precisa e exata de todos os analitos^{93,94}.

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma ferramenta analítica altamente eficaz e essencial na detecção de resíduos e contaminantes em uma variedade de campos. A utilização da cromatografia em fase líquida é especialmente apropriada para analitos menos voláteis ou suscetíveis a degradação sob altas temperaturas. Nessa técnica, os solventes líquidos são empregados como fase móvel para transportar os analitos através de uma coluna cromatográfica, onde ocorre a separação baseada nas diferentes afinidades dos analitos com a fase estacionária. Quando combinado com a espectrometria de massas confere seletividade, sensibilidade e especificidade ainda maiores, possibilitando a análise de amostras complexas e a identificação de compostos de origem desconhecida. A LC-MS encontra aplicação em diversos setores, desempenhando um papel fundamental na garantia da segurança e qualidade de produtos e na preservação do meio ambiente^{95,96}.

Entretanto já são relatados na literatura o uso da espectrometria de massas por ionização por electrospray (ESI-MS) para determinação de fármacos sem a necessidade da separação dos analitos por uma coluna cromatográfica⁹⁷. Nesses casos, a técnica de ESI-MS em si é utilizada como ferramenta poderosa para a análise direta das substâncias presentes em uma amostra. Ao contrário dos métodos tradicionais que envolvem cromatografia, nos quais uma coluna cromatográfica é usada para separar diferentes componentes de uma amostra antes da análise de espectrometria de massas, esses métodos diretos permitem a identificação dos analitos com base em suas massas e cargas sem a necessidade de separação prévia por coluna cromatográfica⁹⁸.

Em relação a abordagem direta há vantagens em termos de velocidade e simplicidade, eliminando a etapa de separação cromatográfica, o que pode economizar tempo e recursos. Apesar disso, deve-se considerar a complexidade da matriz da amostra, uma vez que a presença de outras substâncias pode interferir na análise e detecção dos analitos de interesse e dependendo da sensibilidade da espectrometria de massas e da quantidade de interferentes presentes, a seletividade da técnica direta pode ser um desafio⁹⁹.

Como alternativa recente os MIPs emergem como solução para se realizar a análise direta sem preparo de amostra e/ou a necessidade de colunas cromatográficas, oferecendo

confiabilidade na obtenção de resultados. Em virtude de sua natureza seletiva, esses materiais têm a capacidade de selecionar os analitos de interesse mesmo em matrizes complexas, Devido à alta seletividade da extração pelo MIP, a supressão iônica durante a ESI é minimizada; portanto, não é necessária nenhuma separação prévia antes do ESI-MS, o que aumenta consideravelmente a velocidade analítica¹⁰⁰.

Ao realizar a determinação direta de analitos utilizando os MIPs em vez das tradicionais colunas cromatográficas, surgem vantagens relacionadas às preocupações como custo e sustentabilidade. As colunas cromatográficas podem ser caras tanto em termos de aquisição quanto de manutenção, incluindo substituição periódica, enquanto, o uso dos MIPs elimina a necessidade de investir em colunas cromatográficas, reduzindo os custos associados ao equipamento e podem ser produzidos de forma econômica, contribuindo para uma abordagem mais acessível e sustentável^{36,101}.

Além disso, o desenvolvimento de métodos cromatográficos pode ser complexo e demorado devido à otimização dos parâmetros relacionados à coluna cromatográfica, fase móvel e detecção. Os MIPs, por outro lado, são projetados para seletivamente interagir com um analito específico ou a uma classe química, podendo oferecer maior especificidade e seletividade, o que simplifica e acelera o processo de otimização em comparação como uso de colunas cromatográficas, que podem enfrentar interferência de outros compostos presentes na amostra^{35,102}.

Em relação ao preparo de amostra com os MIPs, a etapa de extração e pré-concentração pode ser mais simples e direta, reduzindo a complexidade do processo analítico. Os MIPs podem ser desenvolvidos para uma ampla variedade de analitos e aplicações, proporcionando uma abordagem mais flexível e versátil para a determinação direta, sendo benéfico quando se trabalha com amostras complexas ou quando a disponibilidade de colunas específicas é limitada¹⁰³.

A utilização de MIPs na preparação de amostras para a determinação direta por espectrometria de massas é uma estratégia interessante que combina sua seletividade com a sensibilidade e a capacidade de identificação da espectrometria de massas, permitindo análises mais eficientes e direcionadas de analitos específicos⁹⁸.

Figueiredo *et al.* (2011) desenvolveram um trabalho para quantificação de benzodiazepínicos em plasma humano através da extração em fase sólida com polímeros molecularmente impressos e espectrometria de massas por ionização por *electrospray*, sem necessidade de separação prévia. O método desenvolvido MIP-ESI-MS, apresentou boas figuras de mérito para os analitos estudados (medazepam, nitrazepam, diazepam,

clordiazepóxido e midazolam), curvas de calibração analítica variando de 10 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r > 0,98$), com limite de quantificação $<10 \mu\text{g L}^{-1}$, precisão e exatidão aceitáveis⁹⁸.

3.6 DETERMINAÇÃO DE ANTI-HELMÍNTICOS EM AMOSTRAS COMPLEXAS UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O controle de qualidade dos alimentos de origem animal quanto à presença de resíduo de medicamentos veterinários é crucial na questão da segurança toxicológica alimentar. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento e avaliação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para identificar e quantificar eventuais resíduos dessas substâncias que possa estar presentes nos alimentos destinados ao consumo humano. A análise desses compostos demanda cuidados para que os resultados obtidos sejam de fato confiáveis. Uma das maiores causas de erros e problemas nesta etapa analítica é a presença de macromoléculas, (proteínas, por exemplo) que podem causar problemas nas análises e até mesmo nos equipamentos. Inclusive as colunas analíticas utilizadas nas análises por HPLC podem ser afetadas ao longo do tempo¹⁰⁴.

Usualmente, o preparo de amostras complexas, ricas em proteínas, pelas técnicas tradicionais como a SPE e a LLE, requerem prévia precipitação destas. Ademais, tais técnicas são pouco seletivas, o que muitas vezes faz com que os limites de detecção e quantificação requeridos para os analitos de interesse não sejam alcançados¹⁰⁴.

Em relação à determinação de anti-helmínticos benzimidazólicos em matrizes complexas como o leite, alguns métodos são relatados na literatura. Na SPE, cartuchos de polipropileno preenchidos com C18 (sílica quimicamente modificada com adição de grupamentos octadecila) ou C8 (sílica quimicamente modificada com adição de grupamentos octila) são utilizados. A etapa de eluição, costuma ser realizada empregando-se uma alta quantidade de solvente orgânico, devido ao caráter hidrofóbico dos analitos. Para a análise desses compostos em alimentos, o método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) também vem sendo empregado¹⁰⁵.

Porto e coautores (2019), determinaram a presença de anti-helmínticos em leite de cabras tratadas à base de ivermectina, moxidectina, levamisol e albendazol durante alguns dias. Os resíduos de anti-helmínticos foram extraídos utilizando o método QuEChERS e a determinação foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Boas figuras de mérito foram alcançadas, como ampla faixa linear, precisão e exatidão

adequadas. Todos os anti-helmínticos pesquisados encontravam-se em níveis abaixo do limite máximo recomendado¹⁰⁶.

Lourenco e coautores (2020), tiveram como objetivo determinar a constituição microbiológica e resíduos de anti-helmínticos em leite cru e em queijos produzidos no sul da Irlanda. Os anti-helmínticos avaliados foram benzimidazóis, flucidas, lactona macrocíclica (avermectina e milbemicinas), levamisol e morantel. Para isso, os possíveis resíduos foram isolados em acetonitrila usando sulfato de magnésio e cloreto de sódio como agentes secantes, seguido por centrifugação. O extrato obtido após algumas etapas foi concentrado em dimetilsulfóxido para garantir que os analitos estivessem na solução e foi posteriormente injetado em UHPLC-MS/MS. Porém resíduos desses medicamentos não foram detectados nas amostras¹⁰⁷.

Para a determinação de dezenove anti-helmínticos em águas ambientais, Yimen e coautores (2020), utilizaram extração líquida pressurizada (PLE) e extração em fase sólida (SPE) juntamente com cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa em tandem (UHPLC-MS/MS). Para determinar as condições ótimas de extração foram avaliados pH, onze cartuchos de SPE e diferentes solventes de eluição. Os autores foram os primeiros a determinar 19 anti-helmínticos e encontraram concentrações da ordem de ng L^{-1} , abaixo dos limites permitidos¹⁰⁸.

Outro trabalho encontrado recentemente na literatura, para determinação de anti-helmínticos em amostras complexas, foi realizado por Bustamante- Rangel e co-autores (2022). Eles desenvolveram um método de extração QuEChERS para a análise de drogas anti-helmínticas em leite de vaca integral, semidesnatado e desnatado e leite de cabra. A determinação foi feita por Espectrometria de massa em tandem acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS). O método proposto, em comparação com outros métodos, apresentou alta sensibilidade para a determinação de anti-helmínticos em amostras de leite, em níveis de concentração bem abaixo dos valores do limite máximo de resíduos (LMRs) estabelecidos¹⁰⁹.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes e equipamentos utilizados na parte experimental deste trabalho estão detalhados a seguir.

4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

As sínteses dos polímeros foram realizadas empregando os reagentes MAA 99%, EGDMA 98%, A4-CA, MBZ e GMA (97%) - todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para selecionar partículas de 75 a 106 μm tamises de várias malhas foram usados.

Clorofórmio grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usado como solvente na síntese. Metanol e ácido acético (ambos da Merck, Darmstadt, Alemanha) foram usados durante as etapas de lavagem do polímero. Para a limpeza dos polímeros utilizou-se o sistema de vácuo Manifold, bomba à vácuo (Millipore, Bedford, EUA), banho de ultrassom (Unique, Indaiatuba, Brasil), centrífuga NT-811 (Nova Técnica, Piracicaba, Brasil), estufa 310/1 (Fanem, Bangalore, Índia) e espectrofotômetro digital UV-VIS (Prolab, São Paulo, Brasil).

Para o recobrimento do RAMIP utilizou-se BSA adquirida da Sigma-Aldrich (Sant Louis, EUA), bem como glutaraldeído 25% e borohidreto de sódio 98%, ambos adquiridos da Vetec (Sant Louis, EUA). Todas as soluções foram preparadas empregando-se água ultrapura, proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore®, Bedford, EUA), com resistividade de 18,2 M Ωcm .

Soluções estoque de albendazol (ABZ) e mebendazol (MBZ) foram preparadas na concentração de 100,0 mg L⁻¹ em metanol de grau HPLC e armazenadas em frascos âmbar. Soluções de trabalho variando de 10,0 a 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas diariamente pela diluição das soluções estoque em metanol. Metanol e ácido fórmico (Biotec, Londrina, Brasil) foram usados para preparar as fases móveis para análise on-line. Amostras de leite foram coletadas em mercados locais em Alfenas-MG, Brasil, e foram refrigeradas a -20 °C para armazenamento.

Para a construção das isotermas de adsorção utilizou-se agitador de tubos (Fanem, Bangalore, Índia), tubos de ensaio, solução estoque de mebendazol de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, metanol grau HPLC e filtros de 0,45 μm .

Os testes de exclusão de proteínas e o estudo de cinética e isoterma de adsorção foram realizados utilizando um sistema de cromatografia líquida da Agilent Technologies composto por uma bomba quaternária (G1311B/C), uma coluna analítica LiChrospher® 60 RP-select B

LiChroCART® (250x 4 mm x 5 µm) e detector UV acoplado a um detector de arranjo de diodos (G4212B).

As análises diretas foram realizadas em um equipamento LC-MS 8030 da Shimadzu® (Kyoto, Japão). O sistema foi acoplado a um analisador triplo quadrupolo usando uma fonte de ionização por electrospray.

4.2 SÍNTESE E REVESTIMENTO DOS POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS DE ACESSO RESTRITO (RAMIP-BSA)

A síntese do RAMIP foi realizada pelo método *in bulk*^{50,16}. Ácido metacrílico (MAA), solução de mebendazol, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 4,4 - Azobis (4- ácido cianoaléxico) (A4-CA) foram usados, respectivamente, como monômero funcional (MF), *template*, agente de ligação cruzada (ALC) e iniciador radicalar (IR). O clorofórmio foi usado como solvente e o glicidil metacrilato (GMA) como co-monômero hidrofílico. Inicialmente, adicionou-se em uma ampola de síntese, o *template* (1 mmol), MF (4 mmol) e o solvente (10 mL) que foram levados ao ultrassom por 5 min. Posteriormente, a solução foi borbulhada com N₂ durante 10 min. Decorrido esse tempo, adicionou-se o ALC (16 mmol), IR (50 mg) e o GMA (8,0 mmol) e foram repetidos o processo do ultrassom e borbulhamento com N₂. Após a remoção do O₂ do meio reacional, o recipiente foi lacrado e levado ao banho de óleo a 80°C por 24 hrs. A síntese do RANIP (polímero molecularmente não impresso de acesso restrito) foi realizada de maneira análoga, mas sem a presença do mebendazol (*template*), para fins de estudos futuros de seletividade. Decorrido o tempo de síntese, houve a formação do monólito que foi triturado em gral, tamisado e selecionou-se partículas de 75 a 106 µm. O material foi lavado com solução de metanol:ácido acético glacial (9:1) até remoção completa do *template*, processo que foi monitorado por espectrofotometria e posteriormente, seco em estufa – 70 °C - por 12 hrs.

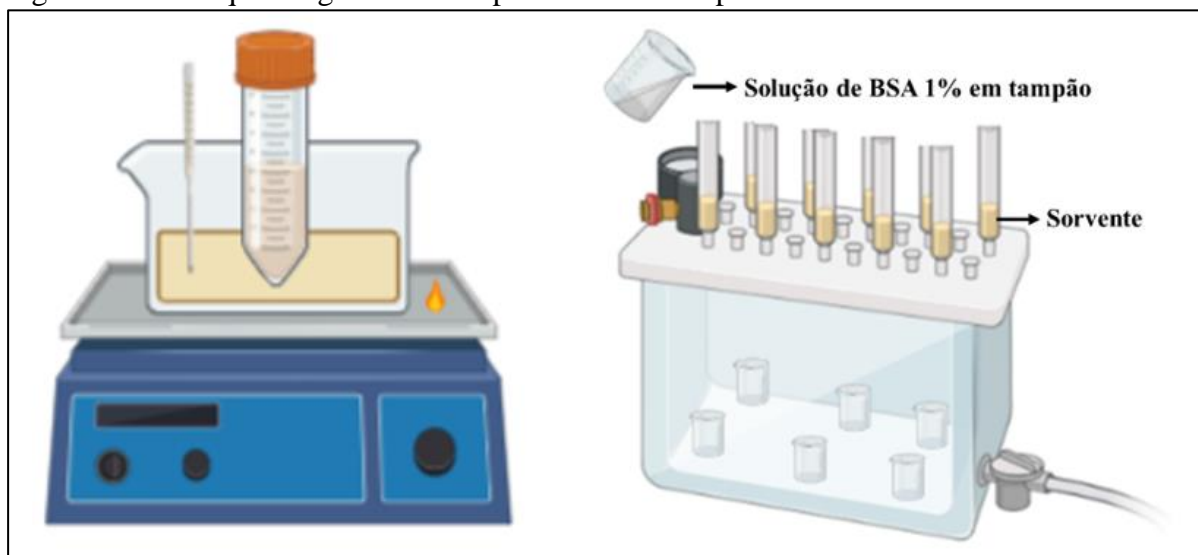
Para que houvesse a formação da barreira hidrofílica, foi necessária a abertura do anel epóxido do GMA⁵². Para isso, foram pesados 500 mg de material lavado e à essa massa adicionou-se 25 mL de uma solução de ácido perclórico 10% v/v. As suspensões foram colocadas em tubos de vidros e deixadas em agitação – 200 rpm – por 24 hrs. Após esse período, o material foi lavado até pH neutro e levado à estufa – 70 °C - por 12 hrs.

Os polímeros foram recobertos com BSA de acordo com a metodologia proposta por Moraes *et al.* (2013)⁹⁵. Usou-se 500 mg de RAMIP e RANIP e ambos foram colocados, separadamente, em cartuchos de polipropileno e acoplados ao manifold. Foram percolados 20

mL de BSA 1% em tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,5). O processo de revestimento é representado na Figura 10. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de uma solução de glutaraldeído 25% (v/v) que foram deixados em contato com o material durante 5 hrs, a fim de promover o entrecruzamento das moléculas de albumina. Após esse tempo, adicionou-se 10 mL de uma solução de borohidreto de sódio 1% (m/v) com o objetivo de estabilizar a rede proteica. Os polímeros foram lavados com água para remoção completa de reagentes e, por fim, eles foram deixados na estufa a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 hrs.

Um polímero não impresso restrito à ligação de macromoléculas, de superfície recoberta com albumina (RANIP-BSA), também foi obtido da mesma forma, mas com a ausência da MM.

Figura 10 — Esquema generalizado para síntese dos polímeros e revestimento com a BSA



Fonte: Do autor, 2023.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

4.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

As análises no infravermelho para os materiais sintetizados (RAMIP-BSA, RAMIP e RANIP) foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier-FT-IR (modelo Affinity-1S, Shimadzu®) em modo ATR (Reflexão Total Atenuada), com resolução espectral de 4 cm^{-1} , localizado no Núcleo de controle de qualidade (NCQ), UNIFAL-MG. Os espectros monitoraram a faixa de $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ (32 scans).

4.3.2 Análise Termogravimétrica

Para as análises termogravimétricas utilizou-se um analisador termogravimétrico modelo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, EUA), localizado no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabiQ). A massa das amostras foi de aproximadamente 10 a 15 mg (colocadas em cadinho aberto), que foram submetidas a uma variação de temperatura de 25 a 1100 °C, sob fluxo de nitrogênio de 100 mL min⁻¹. A massa das amostras foi continuamente mensurada em função da taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Com os resultados obtidos, curvas de decaimento de massa e curvas da primeira derivada (DTG) (μg min⁻¹) em função da temperatura puderam ser construídas.

4.3.3 BET

As áreas superficiais foram determinadas utilizando a equação BET (Brunauer-Emmett-Teller) e as distribuições de tamanho dos poros foram obtidas de acordo com o método Barret-Joyner-Halenda (BJH) aplicada aos dados de adsorção. A análise adsortiva de N₂ utilizou uma massa de aproximadamente 0,0110 g e o tempo registrado foi de 75 min, utilizando o equipamento Micromeritics, modelo ASAP 2020 (Norcross, GA, EUA).

4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), utilizando um Microscópio Philips XL-30, MEV-FEG (Field Emission Gun). O equipamento foi configurado para operar a 10 a 25 keV, spot 4 e distância de 5 mm. Para a preparação das amostras, uma pequena quantidade de pó foi adicionada em um tubo de eppendorf contendo 2 mL de isopropanol. Essas amostras foram então colocadas em um banho de ultrassom por 10 minutos para desagregar as partículas. Posteriormente, utilizando uma micropipeta, uma gota da suspensão foi depositada sobre um substrato de silício com área de 5 mm x 5 mm, previamente colado no suporte utilizando fita dupla face de carbono. Antes da análise, as amostras foram secas em uma estufa a 40 °C por 12 horas.

4.3.5 Seletividade do RAMIP-BSA *versus* RANIP-BSA

A avaliação da seletividade baseou-se na capacidade de retenção da molécula molde (MBZ) por RAMIP-BSA e RANIP-BSA. O sistema de análise direta sob condições otimizadas foi utilizado para a extração online de soluções de leite enriquecida com MBZ nas concentrações de 10,0, 75,0 e 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram avaliados em relação a intensidade dos sinais analíticos obtidos, sendo assim, uma maior intensidade indicava maior capacidade do material em reter o mebendazol.

4.4 EMPACOTAMENTO DA COLUNA

Aproximadamente 25 mg do polímero a ser avaliado foram acondicionados em uma pré-coluna de HPLC (10×4,6 mm de diâmetro interno) entre 2 filtros para evitar perda de material. As colunas foram usadas para avaliar a capacidade do material sintetizado em eliminar macromoléculas, na avaliação da seletividade e no sistema de análise direta de MBZ e ABZ. A Figura 11 mostra a pré-coluna preenchida com RAMIP-BSA.

Figura 11 — Coluna com RAMIP-BSA



Fonte: Do autor, 2023.

4.5 ESTUDO DE ELIMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

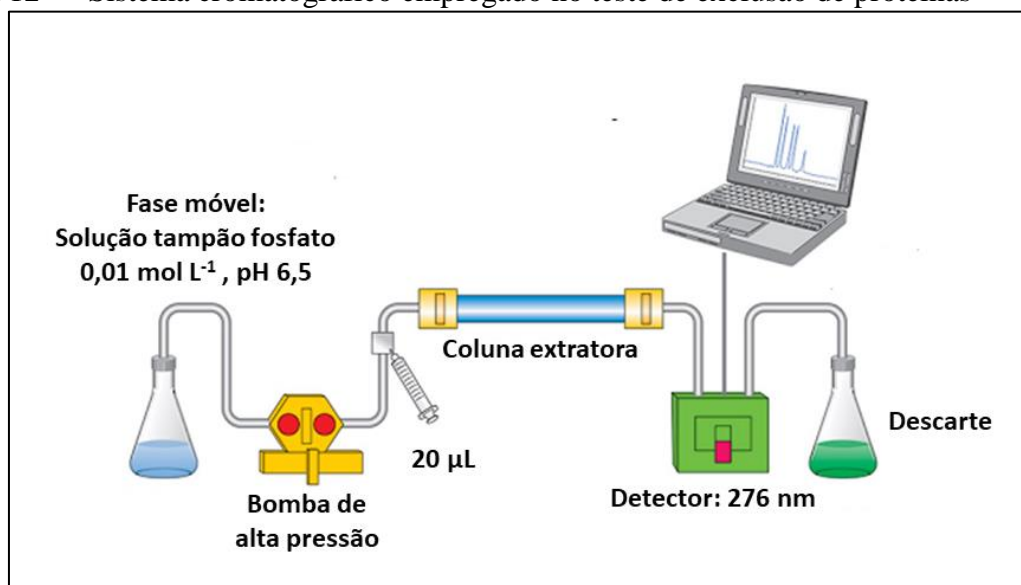
Para avaliar a capacidade de eliminação de macromoléculas (proteínas), inicialmente, 20 μL de solução padrão de caseína de 1 mg mL^{-1} , preparada em tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} , pH 6,5, foram injetados em um HPLC sem a presença de qualquer coluna, tendo como fase móvel a solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} , pH 6,5, na vazão de 1,0 mL min^{-1} . O sinal analítico foi monitorado por um detector UV-Vis em 276 nm (comprimento de onda de

absorção máxima da caseína)¹¹⁰. Sendo assim, pode-se considerar que a área do pico obtido correspondia a 100% de caseína que chegou ao detector.

Em seguida, 25 mg de cada material (RAMIP-BSA e RAMIP) foram colocados, individualmente, em uma pré coluna de HPLC e esta foi colocada no percurso analítico. Novamente foram injetados 20 μL do padrão de caseína, sob as mesmas condições descritas anteriormente. A área do pico obtido nestas condições, usando como material de empacotamento o RAMIP-BSA, foi empregado para avaliar o percentual de caseína eluido do RAMIP-BSA por meio de comparação com o pico correspondente a 100% de caseína, sem a presença da coluna. A mesma comparação foi feita quando a coluna foi preenchida com RAMIP.

De forma semelhante ao teste de exclusão de macromoléculas com a caseína, realizou-se o mesmo procedimento para se avaliar a exclusão de BSA. Neste sentido, soluções de BSA preparadas em uma concentração de 44,0 mg mL^{-1} em tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} , pH 7,5 foram analisadas, utilizando como fase móvel a solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} , pH 7,5, vazão de 1,0 mL min^{-1} , enquanto o sinal analítico foi monitorado em 254 nm ¹¹¹. A Figura 12 demonstra um esquema do sistema utilizado para a realização do teste.

Figura 12 — Sistema cromatográfico empregado no teste de exclusão de proteínas



Fonte: Do autor, 2023.

4.6 ESTUDOS DE CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO

Para o estudo de cinética de adsorção, adicionou-se em 10 mg de RAMIP-BSA e 1 mL de solução de mebendazol na concentração de 2,0 mg L^{-1} , preparada em metanol grau HPLC, a

diferentes tubos de ensaio, individualmente. Cada tubo foi agitado por tempos distintos, sendo eles 1, 5, 10, 15, 30 e 45 min. Posteriormente, eles foram centrifugados à 900 rpm por 1 min e o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 μm e 20 μL dessa solução foram injetados em HPLC, equipado com uma coluna analítica LiChrospher® 60 RP-select B LiChroCART® (250x 4 mm x 5 μm) e detector UV em 249 nm, utilizando metanol e água Milli-Q (60:40) como fase móvel, em modo isocrático e 1 mL min⁻¹ de vazão. A massa de mebendazol adsorvida nos 10 mg de material foi calculada pela Equação 1: C_o e C_f (mg L⁻¹) são as concentrações iniciais e de equilíbrio, respectivamente, V (L) o volume da solução, e m (mg) é a massa do sorvente. Todos os tempos foram avaliados em triplicata.

Equação (1):

$$qe = \frac{(C_o - C_f) \cdot V}{m}$$

Em relação às isotermas de adsorção, adicionou-se em 10 mg de material e 1 mL das soluções de mebendazol, preparadas em metanol grau HPLC, nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; e 50,0 mg L⁻¹ em diferentes tubos de ensaio, individualmente. Os tubos foram agitados por 5 min. Posteriormente, eles foram centrifugados à 900 rpm por 1 min e o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 μm e 20 μL foram injetados em HPLC, com coluna analítica LiChrospher® 60 RP-select B LiChroCART® (250x 4 mm x 5 μm) e detector UV em 249 nm, utilizando metanol e água Milli-Q (60:40) como fase móvel e 1 mL min⁻¹. A massa de mebendazol adsorvida nos 10 mg de material foi calculada pela equação 1. Todas as concentrações foram feitas em triplicata. Os dados obtidos nos estudos de cinética e isoterma de adsorção foram avaliados segundo os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, ordem fracionária e quimissorção (Elovich) para os estudos de cinética e os modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Toth e Redlich-Peterson para as isotermas. Os critérios de avaliação se basearam nos valores de R^2 e função erro (F_{error}), calculada pela Equação 2, sendo n é o número de experimentos, p é o número de parâmetros do modelo, $q_{i,\text{exp}}$ é o valor de q medido experimentalmente e $q_{i,\text{teórico}}$ é o valor de q previsto pelo modelo.

Equação (2):

$$F_{\text{error}} = \sqrt{\left(\frac{1}{n-p}\right) \sum_i^n (q_{i,\text{exp}} - q_{i,\text{teórico}})^2}$$

4.7 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Amostras de leite UHT foram adquiridas em mercados na cidade de Alfenas-MG. Para as análises, foram utilizadas 10 mL de leite que foram introduzidos em um tubo de centrífuga de 15 mL e em seguida foram adicionados 200,0 μL de solução de ácido fórmico 85% (m/m), resultando em pH da amostra de 3,0. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 4000 rpm e o sobrenadante foi coletado, filtrado e analisado pelo sistema de análise direta. Para confirmar a ausência de MBZ e ABZ nas amostras de branco, elas foram inicialmente submetidas a testes usando o método desenvolvido.

4.8 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE

Inicialmente, foram otimizados os parâmetros de espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) para a detecção dos íons dos analitos e em seguida, procedeu-se à otimização dos parâmetros de extração on-line.

4.8.1 Otimização das condições MS/MS

As análises foram conduzidas em um espectrômetro de massas em *tandem* equipado com um analisador do tipo triplo quadrupolo e uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A otimização dos parâmetros MS/MS foi realizada por meio da injeção direta de soluções padrão dos analitos, na concentração de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A fase móvel utilizada foi uma solução de MeOH com 1% de ácido fórmico. A taxa de fluxo foi de 0,3 mL min^{-1} durante a análise. O volume de injeção foi 1 μL . Todas as análises foram realizadas na ausência de uma coluna cromatográfica.

Os parâmetros específicos de cada analito, como as transições *m/z*, a voltagem do cone e a energia de colisão, foram ajustados manualmente para aumentar a intensidade do sinal analítico. Os demais parâmetros de operação também foram ajustados como as temperaturas da interface e do bloco de aquecimento e as taxas de fluxo dos gases de nebulização e secagem. Os arquivos de dados foram adquiridos utilizando o programa de software LabSolutions®.

4.8.2 Otimização dos parâmetros de extração on-line

A otimização dos parâmetros de extração on-line, apresentados na Tabela 1, foi conduzida utilizando um *pool* de amostras de leite com adição de MBZ e ABZ na concentração de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Os objetivos dessa etapa foram determinar as melhores condições de extração que proporcionassem maior sinal analítico, expresso como a área do pico gerado e menor tempo de análise.

As variáveis analisadas, de forma univariada, foram: pH padrão/amostra, tempo de extração, taxa de fluxo da fase móvel, composições das fases de condicionamento (MPA) e eluição (MPB), diluição da amostra e volume de injeção. As condições iniciais adotadas foram as seguintes: pH padrão/amostra sem ajuste, tempo de extração de 3.5 minutos, taxa de fluxo da fase móvel de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, água e metanol como MPA e MPB, respectivamente, sem diluição da amostra e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$.

Tabela 1 — Parâmetros avaliados para a otimização das condições de extração

Parâmetros	Condições estudadas
pH	3; 7 e 9
Tempo de extração	3,5; 4,0; 4,5 e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$
Fluxo da fase móvel	$0,1 - 0,5 \text{ mL min}^{-1}$
Composição MPA	Água: Tampão fosfato
Composição MPB	Metanol
Diluição	Metanol: Ácido fórmico 1%
Volume de injeção	1:1; 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 (v:v)
	10 - $100 \mu\text{L}$

Fonte: Do autor, 2023.

4.9 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados: linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e seletividade. Para tal um *pool* de amostras de leite (livres dos analitos) enriquecidas com padrões de MBZ em diferentes níveis de concentração sendo $15,0, 30,0, 45,0, 60,0, 75,0$ e $125,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e ABZ nas concentrações de $10,0, 30,0, 45,0, 60,0, 75,0$ e $125,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foram utilizados.

4.9.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas em sextuplicata, representando os valores das áreas em função das concentrações nominais dos analitos.

Para cada fármaco, utilizou-se a curva de calibração para confirmar a relação entre os valores plotados nos eixos x e y. Por meio da regressão linear, determinou-se a equação linear e o coeficiente de correlação (r). A linearidade do método foi considerada adequada quando o valor de r obtido a partir das curvas admitidas fosse maior ou igual a 0,99, indicando uma forte correlação entre as concentrações dos analitos e as áreas como resposta do sinal analítico. Isso demonstra a capacidade do método de produzir resultados precisos e confiáveis em uma ampla faixa de concentrações dos fármacos analisados.

4.9.2 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método intra-ensaio (no mesmo dia) e inter-ensaio (em dias consecutivos) foram avaliadas em sextuplicata (n=6), utilizando amostras de leite enriquecidas com os anti-helmínticos em concentrações de 10,0; 60,0 e 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o ABZ e 15,0; 60,0 e 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o MBZ. Essas análises foram realizadas para verificar a consistência e a confiabilidade do método ao longo do tempo e em diferentes execuções.

A precisão do método foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação (CV) (Equação 3), enquanto a exatidão foi determinada utilizando o Erro Padrão Relativo (EPR, Equação 4). O método foi considerado preciso e exato quando os valores de CV e EPR foram inferiores ou iguais a 20% para o limite de detecção (LQ) e menores que 15% para as demais concentrações avaliadas. Esses critérios rigorosos asseguram que as medições realizadas são confiáveis e estão dentro de faixas aceitáveis de erro, garantindo a precisão e a exatidão das análises¹¹².

Equação (3):

$$CV = \left(\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \right) * 100\%$$

Equação (4):

$$EPR = \left(\frac{\text{Concentração média experimental} - \text{valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \right) * 100\%$$

4.9.3 Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) é uma medida que representa a menor concentração de analito que pode ser medida com exatidão e precisão aceitáveis pelo método analítico. Normalmente, o LQ é determinado a partir do padrão de calibração com a menor concentração

e é utilizado para determinar a menor quantidade de analito que o método é capaz de quantificar com confiabilidade, garantindo resultados precisos e confiáveis. Nesse trabalho, o LQ foi determinado como a menor concentração quantificada com precisão e exatidão adequadas.

Por outro lado, o limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada com precisão. O LD representa o nível de concentração em que o sinal analítico é distinguível do ruído de fundo, porém, não é suficientemente preciso para ser quantificado com a mesma confiabilidade do LQ. Nesse trabalho, o LD foi calculado a partir da relação sinal/ruído, sendo estipulado como três vezes o valor dessa relação.

Ambos, LQ e LD, são parâmetros importantes na validação de métodos analíticos, pois definem a capacidade do método de detectar e quantificar baixas concentrações de analitos.

4.9.4 Seletividade

Nesse trabalho também foi estudado a capacidade do método de identificar de maneira precisa e inequívoca os analitos, mesmo na presença de outros componentes presentes na amostra que possam interferir na sua determinação. A seletividade foi avaliada observando a presença ou ausência de picos nos mesmos tempos de retenção dos analitos quando uma amostra de branco foi analisada.

4.10 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

O método otimizado e validado foi aplicado na análise de 5 amostras de leite provenientes de diferentes supermercados e laticínios da cidade de Alfenas, Minas Gerais. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 100 mL e mantidas refrigeradas até o momento da extração. Esse procedimento permite a preservação das propriedades das amostras e a integridade dos analitos durante o período de armazenamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nessa sessão serão expostos todos os resultados obtidos até o momento com as devidas discussões.

5.1 SÍNTESE DOS POLÍMEROS

Os polímeros foram obtidos pelo método *in bulk*^{53,54}. A escolha do método se deve principalmente pela simplicidade da realização da síntese e por se tratar de sistemas de extração em, não havendo necessidade de partículas extremamente uniformes.

Durante o processo de religação entre um MIP e os analitos alvo, interações intermoleculares como interação eletrostática, ligação de hidrogênio, dentre outras, ocorrem entre o MF e a MM. Assim, a escolha do MF se baseia nas propriedades dos analitos. Considerando que o MBZ (MM) e o ABZ, analitos de interesse, são bases fracas (compostos heterocíclicos aromáticos que consistem na fusão do anel benzênico e do imidazol) a interação eletrostática entre eles e o ácido metacrílico (MF) pode ser favorecida com o controle do pH do meio, o que justifica a escolha do monômero²³.

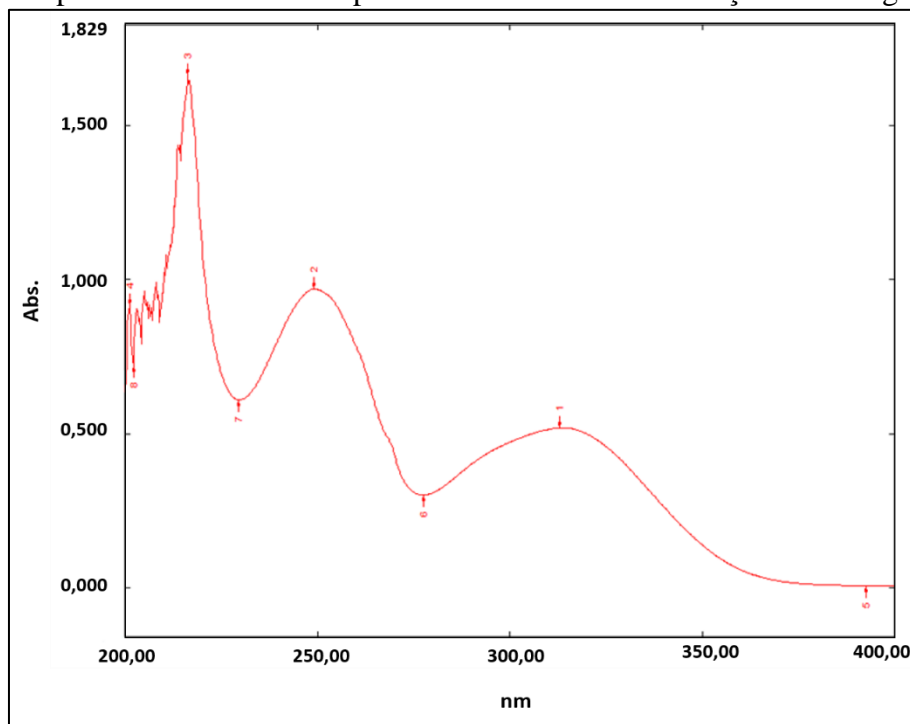
A adição do agente de ligação cruzada (EGDMA) apresenta funções como: controle da morfologia da matriz, estabilidade do sítio de ligação impresso, estabilidade mecânica à matriz do polímero, fornece o aumento do número de cavidades efetivas e minimiza o número de cavidades com configuração não complementar à MM. Neste sentido o EGDMA ganha destaque, pois proporciona a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e permite a rápida transferência de massa¹¹³.

O iniciador radicalar (A4-CA) sofre quebra homolítica em sua estrutura por meio do aquecimento, e gera radicais que são responsáveis por iniciar a polimerização. O clorofórmio utilizado como solvente, não interfere na formação do complexo MF-MM. Ele também é responsável pela morfologia, porosidade e a área da superfície do polímero¹¹³.

Finalmente, para realizar a modificação química da superfície do MIP e obter um material de acesso restrito chamado RAMIP, optou-se por incorporar o co-monômero hidrofílico GMA. Essa abordagem já foi previamente relatada na literatura e foi eficaz para esse propósito¹¹⁴. Após a polimerização, o mebendazol foi retirado da matriz polimérica através de lavagem com uma solução de metanol:ácido acético numa proporção de 9:1. Durante esse processo, a remoção do mebendazol foi acompanhada por meio de espectrofotometria, com leituras realizadas em comprimento de onda específico de 249 nm, o qual corresponde à

máxima absorção do mebendazol nessa faixa, conforme apresentado na Figura 13. Como resultado da etapa de lavagem, foram revelados sítios de ligação seletivos que possuem tamanho e forma complementares à molécula-alvo (MM).

Figura 13— Espectro de varredura do padrão de MBZ na concentração de 10 mg L⁻¹

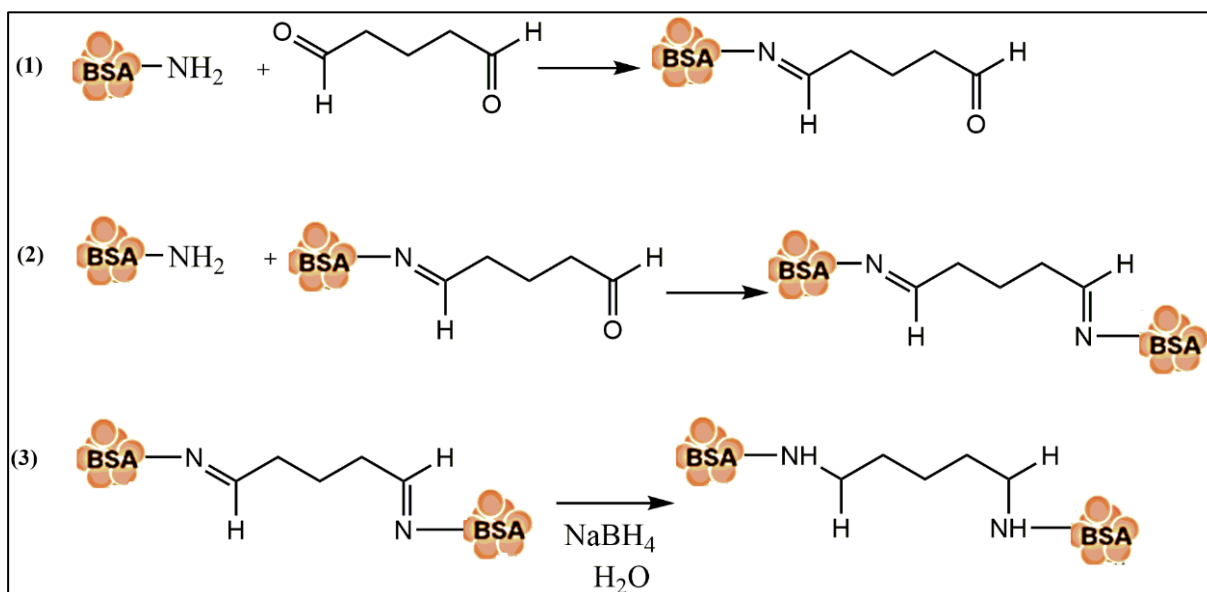


Fonte: Do autor, 2023.

A próxima etapa foi a abertura do anel epóxido do GMA com o auxílio do ácido perclórico, sendo essa abertura responsável pela criação de uma camada hidrofílica e obtenção do RAMIP. Como relatado em SANTOS *et al.* (2015), a adição de co-mônômeros hidrofílicos garante uma proteção contra a adsorção de proteínas, mas essa proteção é somente cerca de 87%¹¹⁵. Sendo assim, para garantir taxas próximas a 100% de eliminação de proteínas, foi feita a adição de mais uma camada hidrofílica, por meio do recobrimento com BSA.

Nesta etapa, após a adsorção da BSA na superfície do polímero, o glutaraldeído é usado para entrecruzar as moléculas da proteína, fazendo com que seus grupos aldeídos se liguem aos grupos aminas da BSA (ligação de BSA com BSA) e formem uma cápsula/película sobre o material. Na figura 14 estão representadas as reações que ocorrem entre a BSA e o glutaraldeído. Como a interação entre a BSA e o glutaraldeído resulta na formação de iminas, compostos pouco estáveis, utiliza-se uma solução de borohidreto 1% para reduzi-las a aminas, que são compostos estáveis.

Figura 14 — Reações químicas envolvidas no revestimento do RAMIP com BSA



Fonte: Do autor, 2023.

A etapa 1 representa a reação que ocorre entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído. Na etapa 2 é representada a reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula de albumina, o que permite a formação da rede de BSA em volta do RAMIP. Por fim, a etapa 3 representa a conversão das iminas em aminas com a adição do borohidreto.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

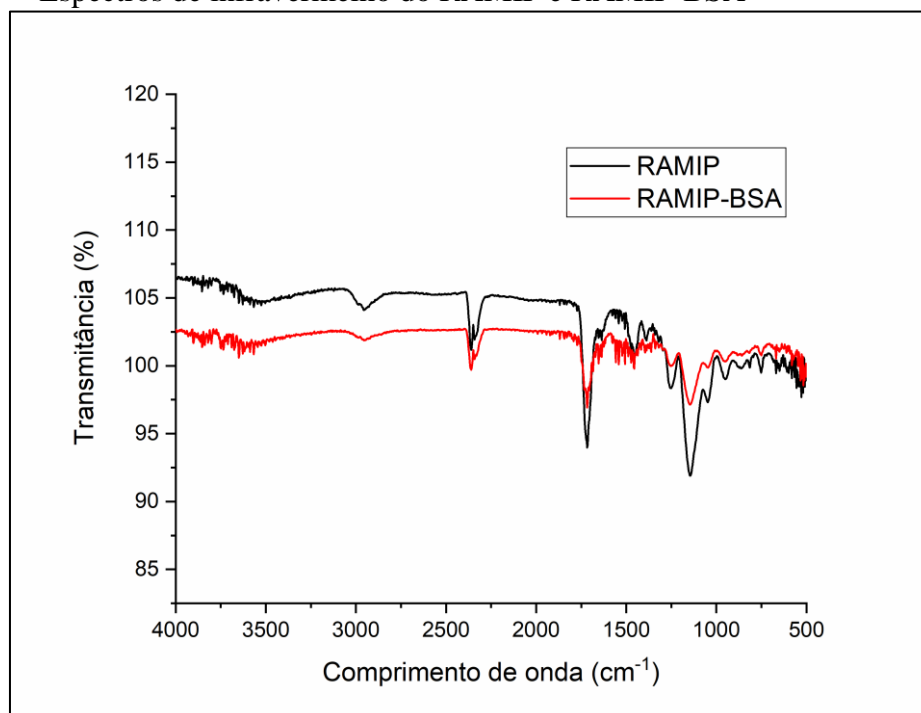
A caracterização dos materiais obtidos foi feita inicialmente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A Figura 15 apresenta os espectros de infravermelho do RAMIP e RAMIP-BSA. A semelhança entre os espectros na região do infravermelho se deve a sobreposição de bandas devido à grande variedade de ligações químicas em ambos os materiais que absorvem na mesma região. Entretanto, pode-se observar algumas diferenças sutis, discutidas abaixo.

Em ambos os espectros (RAMIP e RAMIP-BSA), observa-se uma banda larga em torno de 3500 a 3000 cm^{-1} , característica de estiramento de O-H de ácido carboxílico, não muito intensa devido a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, proveniente do MAA. Pode-se também observar uma banda na região de 1700 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de C=O referente a carboxila (COOH) e uma banda entre 1670 a 1640 cm^{-1} proveniente do estiramento de grupos vinila C=C, presentes no MF e no EGDMA. Além disso, uma banda

característica de estiramento de C-O de ácido carboxílico de 1300 a 1200 cm^{-1} e uma banda característica de deformação angular de O-H de ácido carboxílico a 940 cm^{-1} .

No processo de revestimento do RAMIP com a proteína há a formação de uma rede de BSA no material que correspondem às bandas de vibrações de estiramento das ligações C-N. No entanto, no espectro de FT-IR do RAMIP-BSA, as bandas correspondentes às vibrações de estiramento das ligações C-O (1300 a 1200 cm^{-1}) e C=O (1700 cm^{-1}) foram menores, em relação as demais bandas, provavelmente à obstrução dos grupos hidroxila e carbonila, presentes principalmente no GMA e no EGDMA, causada pelo revestimento com a BSA. Além disso, a maior intensidade da banda em torno de 1670 a 1640 cm^{-1} pode ser devido a um estiramento C=N da BSA que se sobrepõe ao estiramento C=C vinílico do RAMIP, sugerindo novamente a presença da BSA.

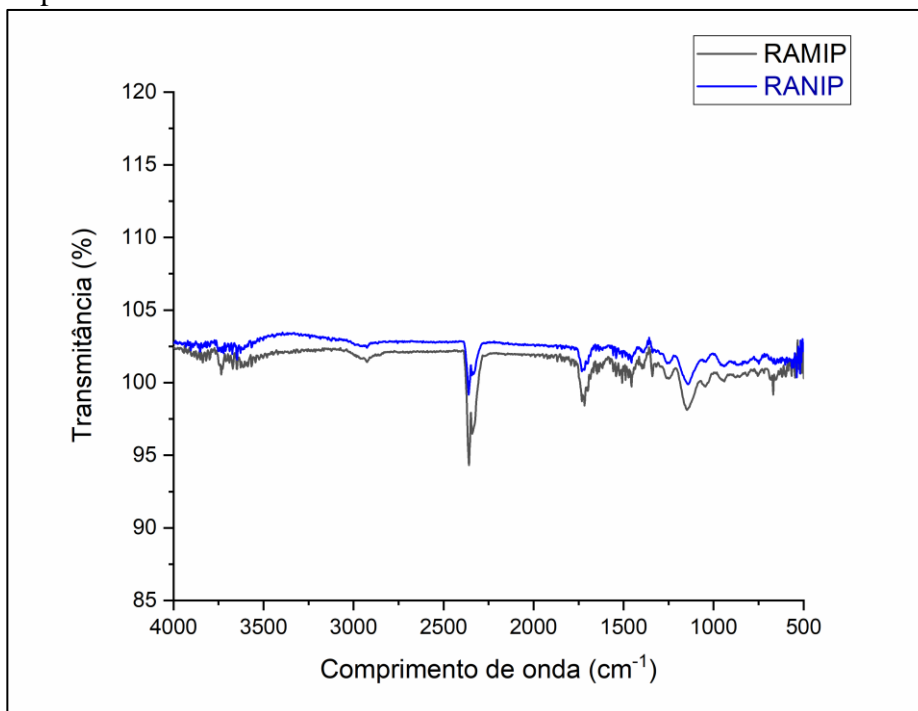
Figura 15 — Espectros de infravermelho do RAMIP e RAMIP-BSA



Fonte: Do autor, 2023.

Representados na Figura 16, os espectros de FT-IR dos polímeros RAMIP e RANIP, são praticamente idênticos, pois possuem os mesmos grupamentos químicos. Como a metodologia de síntese de RAMIP e RANIP é a mesma, exceto pela ausência da MM na síntese do RANIP. Assim, a semelhança dos espectros de RANIP e RAMIP demonstra que o fármaco foi realmente eliminado na fase de lavagem de RAMIP.

Figura 16 — Espectros de infravermelho do RAMIP e RANIP



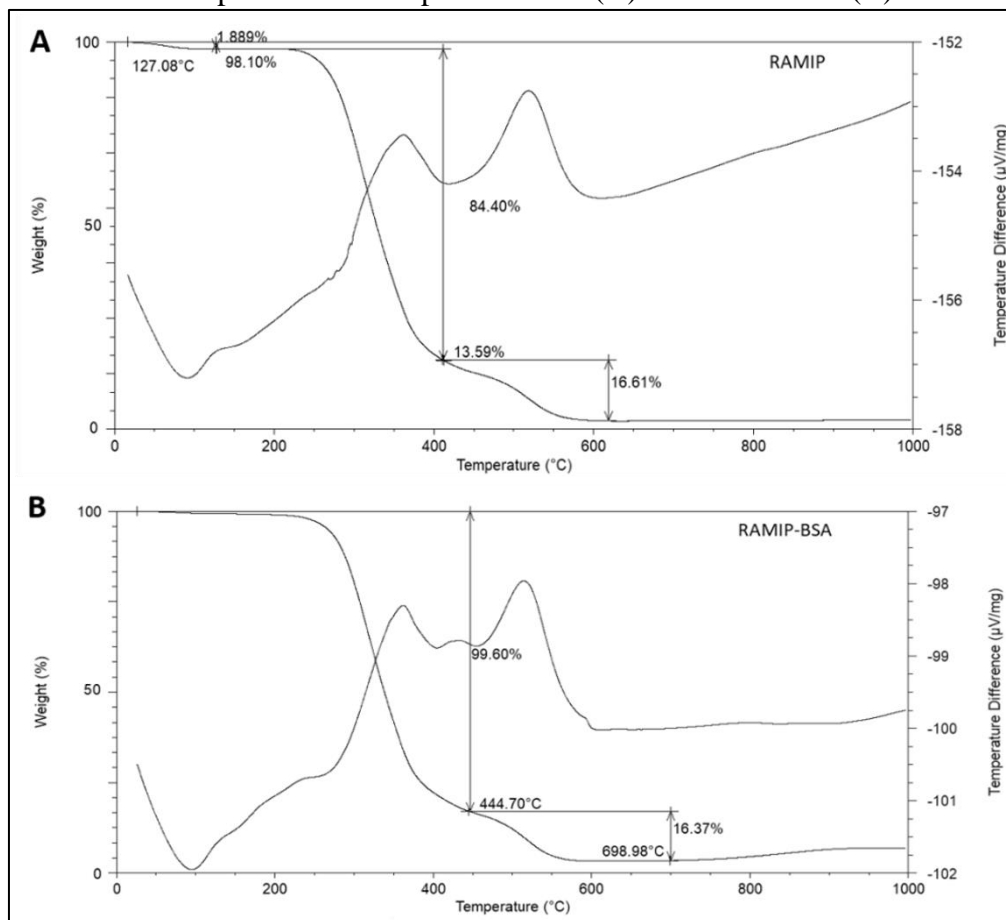
Fonte: Do autor, 2023.

As bandas características dos monômeros utilizados na síntese e que podem ser visualizadas nos polímeros RAMIP e RANIP são aquelas correspondentes à utilização do EGDMA e MAA, na região de 1700 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de C=O do grupo éster e carboxila do ácido e de $1200\text{ a }1300\text{ cm}^{-1}$ característica de estiramento de C-O de ácido carboxílico.

Além disso, as bandas na região entre $3500\text{ a }2400\text{ cm}^{-1}$ de estiramento de O-H de ácido carboxílico e as bandas entre $3000\text{ a }2900\text{ cm}^{-1}$ de estiramento C-H foram observadas em baixa intensidade uma vez que as bandas características do grupo éster presentes em EGDMA e GMA foram predominantes nos espectros de RAMIP e RANIP. Isto pode ser devido a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares que ocorrem entre as cadeias de polímeros, diminuindo a intensidade das bandas de estiramento de O-H. Além disso, os monômeros de reticulação EGDMA e GMA estão em excesso em relação ao monômero funcional MAA, predominando assim as bandas características de ésteres.

Os polímeros também foram caracterizados por análise termogravimétrica. As curvas de perda de massa e a DTG para RAMIP e RAMIP-BSA estão demonstradas na Figura 17. Por meio dessa análise, foi possível avaliar a estabilidade térmica de cada polímero e a eficácia do revestimento do RAMIP-BSA.

Figura 17 — Curvas de perda de massa para RAMIP (A) e RAMIP-BSA (B)



Fonte: Do autor, 2023.

Ao analisar as curvas de perda de massa, é possível observar um evento endotérmico em torno de 100 °C para ambos os materiais, referente a perda de massa de umidade e compostos não reagidos durante a síntese dos materiais. Além disso, foram observados dois eventos exotérmicos a aproximadamente 400 e 600 °C, correspondentes à degradação das cadeias poliméricas. No caso do RAMIP-BSA, um evento térmico distinto foi evidente, indicando a degradação do revestimento de BSA e confirmando sua integração com o RAMIP. Além disso, vale ressaltar que ambos os materiais analisados apresentaram elevada estabilidade térmica.

A área superficial específica, volume e diâmetro médio dos poros de cada material RAMIP e RAMIP-BSA foram determinados usando a análise BET, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. Ao comparar os resultados, observou-se uma redução na área superficial do RAMIP-BSA, provavelmente devido a presença da BSA. Essa redução pode ser atribuída à presença da albumina sérica bovina (BSA) como material de revestimento, pois a BSA é capaz de preencher os espaços vazios entre as partículas do polímero ou cobrir

irregularidades na superfície, reduzindo assim, a rugosidade e a porosidade do material. Esse efeito também se estende ao volume dos poros, pois quando a BSA é usada como camada de revestimento, tem o preenchimento parcialmente ou obstrução dos poros existentes, pois a BSA tem tamanho molecular maior do que os poros do polímero, o que permite ocupar os espaços dos poros. No entanto, ao comparar os diâmetros médios dos poros, não foram observadas diferenças significativas. Além disso, os resultados confirmam a eficiência do revestimento do material com BSA¹¹⁵.

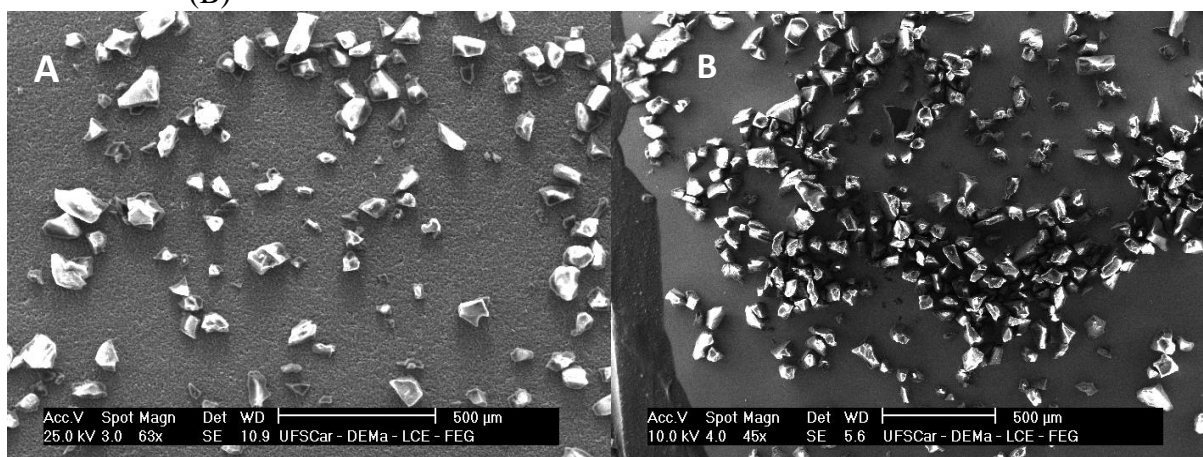
Tabela 2 — Área superficial específica, volume e diâmetro médio dos poros de cada material RAMIP e RAMIP-BSA

Polímero	Área superficial específica ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume do poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro do poro (Å)
RAMIP	13,28	0,0097	21,13
RAMIP-BSA	11,76	0,0019	21,16

Fonte: Do autor, 2023.

O MEV é uma técnica de microscopia que permite visualizar a superfície de materiais em alta resolução. No contexto apresentado, utilizou-se para analisar as partículas sintetizadas e observar a presença do revestimento com a BSA. O resultado da análise, representado na Figura 18, não demonstrou diferenças que podem ser atribuídas a camada de BSA no material (RAMIP-BSA), entretanto, foi possível observar que as partículas possuem uma distribuição relativamente uniforme e tamanho médio de 100 μm , e que embora a síntese tenha sido feita pelo método *in bulk*, elas apresentam certa uniformidade.

Figura 18 — Microscopia eletrônica de varredura dos materiais RAMIP (A) e RAMIP-BSA (B)



Fonte: Do autor, 2023.

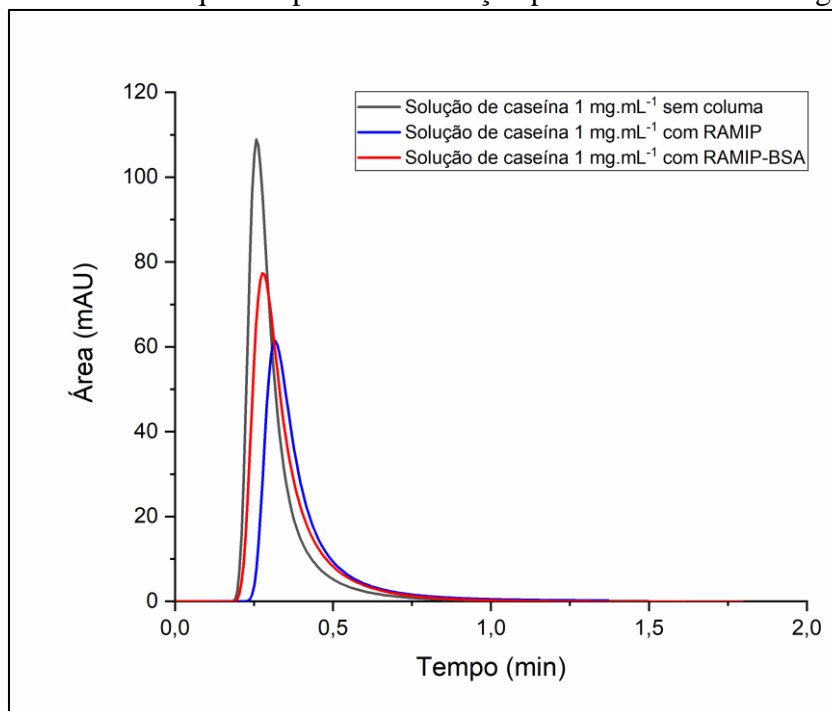
No teste de seletividade, comparando o RAMIP-BSA com o RANIP-BSA, o polímero impresso mostrou maior adsorção de MBZ em todas as concentrações testadas: aproximadamente 41% a $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, 30% a $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e 28% a $125,0 \mu\text{g L}^{-1}$, quando comparado ao polímero não impresso. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que o polímero RAMIP-BSA foi sintetizado especificamente para interagir de forma seletiva com o analito de interesse, resultando em uma retenção mais eficiente e precisa durante a análise. Por outro lado, o polímero RANIP-BSA, que não possui a mesma molécula molde incorporada, pode apresentar uma menor capacidade de distinguir o analito em meio aos demais componentes da amostra.

Esses resultados reforçam a importância da escolha adequada do material sintetizado no preparo de amostras complexas e amostras em que os analitos encontram-se em baixas concentrações, afim de garantir a seletividade necessária na análise de compostos específicos.

A maior seletividade do polímero RAMIP-BSA é útil para aplicações mais precisas e confiáveis em diversas áreas, como análises farmacêuticas, ambientais e clínicas, onde a capacidade de separar e identificar os analitos de interesse é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis e significativos.

5.3 ESTUDO DE ELIMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Para o teste de exclusão de proteínas foram utilizados RAMIP e RAMIP-BSA. Os valores em porcentagem foram obtidos considerando a área do pico obtida a partir da solução de caseína, sem coluna extratora no percurso analítico, como 100%. De forma similar também foi verificada a capacidade de exclusão do material RAMIP-BSA quando percolada uma solução de BSA. Os resultados estão demonstrados na Figura 19, para a caseína e Figura 20, para a BSA.

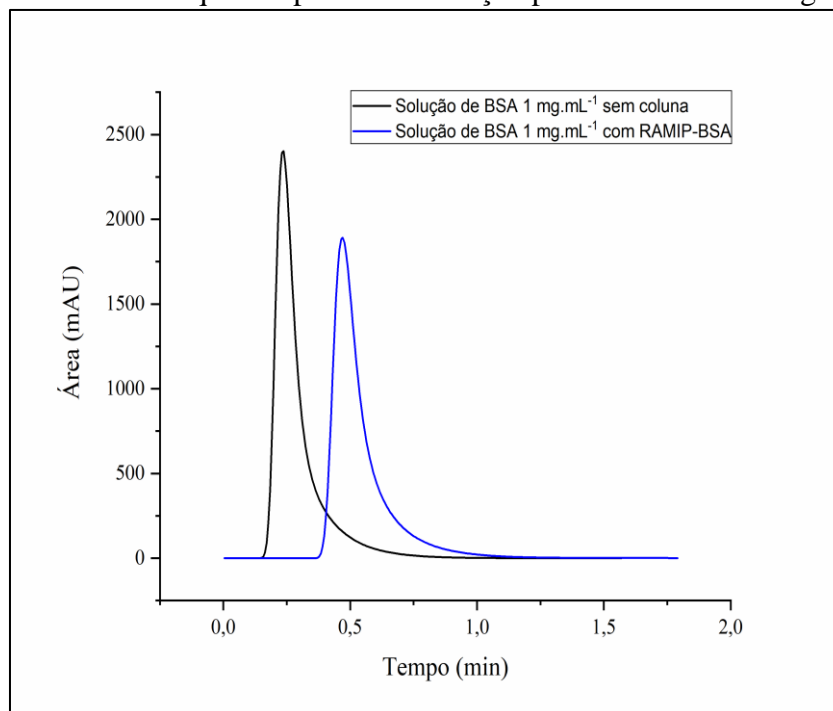
Figura 19 — Gráfico obtido quando percolada solução padrão de caseína 1 mg mL⁻¹

Fonte: Do autor, 2023.

A eliminação de caseína, foi de 93,4% quando utilizado o RAMIP-BSA, sendo esse valor suficiente para que o polímero revestido seja utilizado na extração direta de fármacos em matrizes complexas, sem necessidade de etapa de precipitação com ácidos ou solventes. Isso ocorre devido à presença do recobrimento com BSA que provoca tanto um impedimento estérico para a adsorção de proteínas, quanto uma repulsão eletrostática quando se trabalha com o pH superior ou inferior ao ponto isoelétrico da BSA e das proteínas da amostra. Nesse caso, todas elas estarão carregadas negativamente ou positivamente.

Em relação ao RAMIP essa porcentagem é menor, sendo de 79,6%. Embora a presença da camada hidrofílica contribua para a não adsorção das proteínas na superfície, somente ela não é suficiente para uma exclusão satisfatória das proteínas quando comparada com o material revestido.

Figura 20 — Gráfico obtido quando percolada solução padrão de BSA 44 mg mL⁻¹



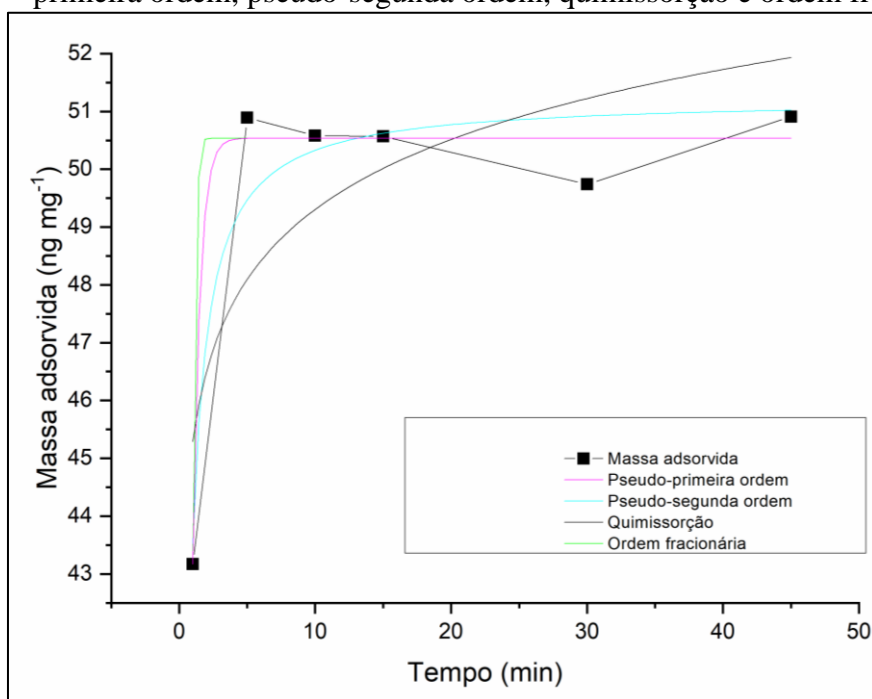
Fonte: Do autor, 2023.

Os resultados obtidos utilizando o material revestido para a exclusão da BSA foram altamente satisfatórios, atingindo uma eficiência de 98,8%. Isso demonstra que o RAMIP-BSA possui uma excelente capacidade de remover as macromoléculas presentes no leite, especialmente a BSA, que é uma proteína presente em grande quantidade nesta matriz. Esses resultados são promissores e indicam que o RAMIP-BSA pode ser uma escolha eficaz na remoção de proteínas em aplicações relacionadas ao leite.

5.4 ESTUDO DE CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO

A adsorção é uma operação de transferência de massa, na qual se estuda a habilidade de certos sólidos em se acumularem na interface de determinadas substâncias. Os dados obtidos para o estudo da cinética de adsorção indicam o tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre o sorvente (polímero) e o analito. De acordo com a Figura 21, o tempo de equilíbrio é estabelecido em 5 min.

Figura 21 — Cinéticas de adsorção do RAMIP-BSA adequadas aos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária



Fonte: Do autor, 2023.

Além disso, os dados do teste de cinética podem ser explicados por um modelo matemático a fim de se entender melhor a interação adsorbato-adsorvente. Sendo assim, os modelos aplicados às curvas foram o de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, ordem fracionária e quimissorção (Elovich). Para cada modelo testado, avalia-se o ajuste de acordo com os valores obtidos de R^2 e função erro (F_{error}).

Em relação ao valor de R^2 quanto mais próximo for de 1,00, maior é a proximidade dos dados obtidos à linha de regressão. Já na função erro, a equação correlaciona os dados obtidos experimentalmente com aqueles calculados após o ajuste ao modelo, assim quanto menores os valores obtidos, menor a diferença entre os dados experimentais e teóricos¹¹⁶.

De acordo com os valores do coeficiente de determinação dos modelos, assim como o F_{error} encontrado, representados na Tabela 3, o modelo de pseudo-primeira foi o que apresentou melhor ajuste. Esse modelo apresenta bom ajuste aos processos em que são utilizadas soluções muito diluídas, em que a variação da quantidade de soluto adsorvido, com o tempo, é diretamente proporcional a diferença entre a quantidade do soluto adsorvida no equilíbrio e quantidade adsorvida em um tempo qualquer. Ainda, pode ser caracterizado como um processo de fisissorção. Ademais, é amplamente utilizado em correlações de dados experimentais para se obter os parâmetros de adsorção, porém não fornece uma representação eficaz dos dados

experimentais durante toda faixa de tempo de contato, sendo normalmente aplicado nos estágios iniciais do processo de adsorção estudado^{117, 118}.

Tabela 3 — Parâmetros cinéticos para adsorção de MBZ em RAMIP-BSA ajustado para os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, quimissorção e ordem fracionária

Modelo cinético	Equação	Parâmetro	Dados
Pseudo-primeira Ordem	$qt = qe[1 - \exp(-k_1 t)]$	qe (ng mg ⁻¹)	50,538
		k_1 (min ⁻¹)	1,9256
		R^2	0,9755
		F_{error}	0,4754
Pseudo-segunda Ordem	$qt = \frac{K_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$	qe (ng mg ⁻¹)	51,220
		K_2 (min ⁻¹)	0,1101
		R^2	0,9022
		F_{error}	0,9548
Quimissorção	$qt = \frac{1}{k} \ln(n k) + \frac{1}{k} \ln(t)$	N	3,25 ¹¹
		K (min ⁻¹)	0,5730
		R^2	0,5269
		F_{error}	2,0711
Ordem Fracionária	$qt = qe [1 - \exp(-k t)^n]$	qe (ng mg ⁻¹)	50,538
		K (min ⁻¹)	1,3455
		N	2,2079
		R^2	0,9674
		F_{error}	56,117

Fonte: Do autor, 2023.

Legenda: qt: quantidade de analito adsorvido no tempo t; qe: quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; t: tempo de contato; k₁: constante de velocidade de pseudo-primeira ordem; k₂: constante de velocidade de pseudo-segunda ordem; n: reação de ordem fracionária relacionada ao mecanismo de adsorção.

Além da cinética, a adsorção também pode ser avaliada quantitativamente através de isotermas de adsorção, que são curvas extremamente úteis para fornecer informações sobre o mecanismo de como o adsorvente efetivamente adsorverá o soluto e a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes. Também é possível estabelecer uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente adsorverá.

De maneira análoga ao que foi feito para a cinética de adsorção, o R^2 e a F_{error} foram usados para verificar o melhor ajuste das isotermas. Os dados experimentais foram ajustados aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Redlich-Peterson e Toth. Foi possível observar que o modelo de Sips apresentou o melhor ajuste, visto que o R^2 foi maior e a F_{error} menor, como pode ser observado na Tabela 4. O equilíbrio de adsorção ocorreu em torno de 600 ng.mg⁻¹ de material, como pode ser observado na Figura 22.

Tabela 4 — Parâmetros das isotermas de adsorção de MBZ em RAMIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Toth e Redlich Peterson

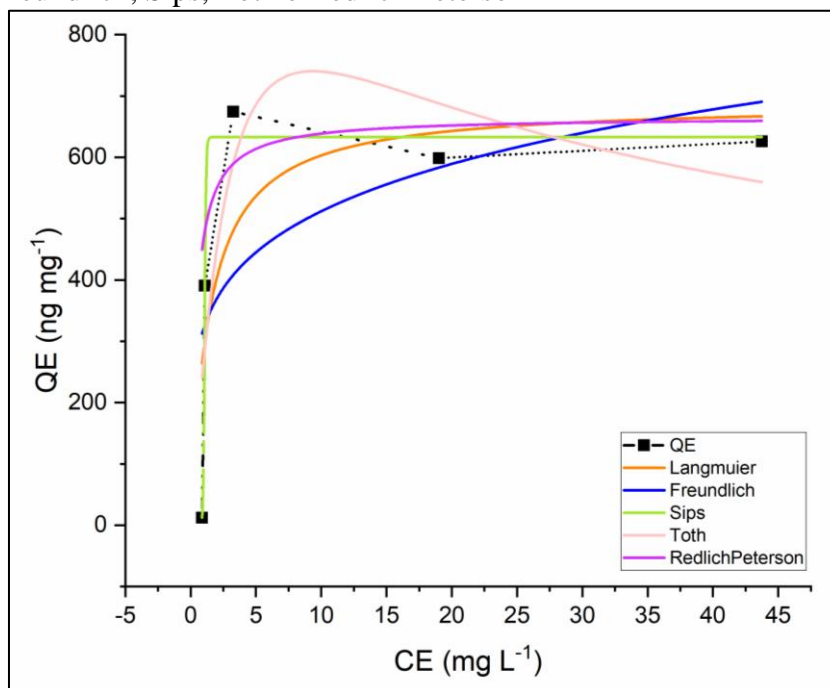
Modelo de isoterma	Equação	Parâmetro	Dados
Langmuir	$q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + b C_e}$	q_s (ng mg ⁻¹)	688,35
		K_L (min ⁻¹)	0,7065
		R^2	0,4948
		F_{error}	660,79
Freundlich	$q_e = K_f C_e^{1/n_f}$	K_F (ng mg ⁻¹) (mg L ⁻¹) ⁿ	320,90
		n_F	4,9304
		R^2	0,2395
		F_{error}	415,74
Sips	$q_e = \frac{q_s K_s C_e^{1/n_s}}{1 + a_s C_e^{1/n_s}}$	q_s (ng mg ⁻¹)	632,98
		K_s (mg L ⁻¹)	0,2640
		N_s	20,256
		R^2	0,9800
Toth	$q_e = \frac{K_t C_e}{(a_t + C_e)^{1/t}}$	F_{error}	38,543
		K_t	2170,8
		A_t	7,0815
		R^2	0,4477
Redlich Peterson	$q_e = \frac{K_e C_e}{1 + a_R C_e^g}$	F_{error}	202,89
		K_r (g L ⁻¹)	1570,2
		a_r (mg L ⁻¹)	2,3586
		g ($0 \leq g \leq 1$)	1
		R^2	0,1882
		F_{error}	324,19

Fonte: Do autor, 2023.

Legenda: q_e : quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; q_s : capacidade de saturação teórica; K_L : constante de afinidade de Langmuir; C_e : concentração de analito no equilíbrio; K_F e n_F : constante e expoente do modelo de Freundlich, respectivamente; K_s e n_s : constante e expoente do modelo de Sips, respectivamente; K_T e A_t : constantes da isoterma de Toth; t : expoente do modelo de Toth; K_R e a_r : constantes do modelo de Redlich-Peterson; g : expoente do modelo de Redlich-Peterson.

O modelo Sips é uma combinação entre os modelos de Langmuir e Freundlich, sendo utilizado para desviar da limitação da concentração crescente de adsorbato do modelo de Freundlich e antever sistemas heterogêneos de adsorção. Sendo assim, em altas concentrações do adsorbato, o modelo prevê uma capacidade de adsorção em monocamada característica da isoterma de Langmuir. Já a adsorção em baixas concentrações do adsorbato é efetivamente reduzida para isoterma de Freundlich, que indica que a adsorção dos analitos se dá sob uma superfície heterogênea com a formação de multicamadas¹¹⁹.

Figura 22 — Isotermas de adsorção do RAMIP-BSA adequadas aos modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Toth e Redlich Peterson



Fonte: Do autor, 2023.

5.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS MS-MS

A otimização dos parâmetros MS/MS foi realizada através da injeção direta das soluções padrões dos analitos, previamente preparadas em metanol na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Os parâmetros específicos de cada analito, como as transições de monitoramento de reação selecionadas (SRM), energia de colisão (CE) e a voltagem do cone (CV), foram ajustados de forma a maximizar a intensidade do sinal analítico, conforme apresentado na Tabela 5. O modo de ionização positivo foi selecionado para ionizar MBZ e ABZ.

Os critérios de identificação incluíram a observação simultânea de ambos os fragmentos de cada molécula, a comparação da relação entre esses fragmentos com as análises padrão de MBZ e ABZ, bem como a avaliação das abundâncias relativas dos fragmentos. As análises quantitativas foram conduzidas fazendo uso da transição SRM de maior intensidade.

Tabela 5 — Parâmetros MS/MS

Analito	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Fragmentação (<i>m/z</i>)	CE (eV)	CV (V)	Modo de ionização
ABZ	266.0	234.0	-20	-25	ESI ⁺
		190.9			
		159.0			
MBZ	296.0	263.9	-22	-17	ESI ⁺
		105.1			

Fonte: Do autor, (2023).

A escolha da ESI como interface é especialmente recomendada para compostos neutros ou polares, pois permite que essas moléculas sejam protonadas ou desprotonadas em condições de pH apropriadas¹²⁰. Os compostos analisados neste estudo possuem um caráter moderadamente polar, e os resultados mostraram que a técnica de ESI proporcionou alta sensibilidade durante as análises. Isso ressalta a eficácia da ESI como método de ionização para esses compostos, permitindo uma detecção melhor e precisa nas análises.

5.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO ON-LINE

Para otimização das condições de extração on-line foi utilizada a capacidade máxima de empacotamento da coluna com o RAMIP-BSA, sendo de 25 mg, com o objetivo de maximizar a capacidade extratora da coluna e garantir uma maior quantidade de sítios ativos no material para uma interação apropriada com o analito. Sob essa condição, a pressão do sistema foi monitorada para evitar sobrecarga indesejada do equipamento.

Após processamento inicial, o pH da amostra foi avaliado. Os melhores resultados para ambos os analitos em termos de sinal analítico foram obtidos em pH 3,0. Em pH neutro, houve uma redução de 55% na detectabilidade do mebendazol e uma redução de 33% em pH básico. Da mesma forma, para o albendazol, a detecção diminuiu 63% em pH neutro e 30% em pH básico. Essas variações podem ser atribuídas à interação entre o sorvente e o analito, que é influenciada pelo pH. Nesse contexto, o pH 3,0 desempenha um papel significativo na ionização de ambos os analitos por meio da protonação e desprotonação do sítio de ligação do sorvente^{121,122}.

A composição da MPA foi otimizada para condicionar o RAMIP-BSA na coluna e para carregar a amostra. Essa fase é crucial para preparar o sorvente para receber os analitos alvo, transportá-los pelo caminho analítico, remover certas substâncias interferentes e recondicionar o sorvente para análises subsequentes. Foram testadas duas fases: água Milli-Q e um tampão

de fosfato de amônio a 10,0 mM. Os melhores resultados em termos de sinais analíticos foram obtidos ao usar água Milli-Q, provavelmente devido à sua neutralidade química e ausência de íons, tornando-a compatível com a maioria dos polímeros usados no processo de extração.

O tempo necessário para extrair os analitos e remover interferentes foi avaliado no intervalo de 3,5 a 5 minutos, com a melhor precisão e detectabilidade observada em 4 minutos. Extrações concluídas em 3,5 minutos resultaram em baixa precisão, possivelmente devido ao tempo insuficiente para o condicionamento do sorvente, inserção da amostra e remoção de interferentes. Aos 4,5 minutos, a detectabilidade dos analitos diminuiu, e o albendazol apresentou baixa precisão de 20,97%. Ao estender o tempo de extração para 5,0 minutos, obteve-se boa precisão, mas os resultados foram semelhantes aos alcançados aos 4,0 minutos em termos de sinal analítico. Conseqüentemente, foi determinado que o tempo de extração ótimo de 4,0 minutos, proporcionando uma detectabilidade aprimorada, precisão e alta frequência analítica.

A taxa de fluxo da fase móvel desempenha um papel crítico na determinação da simetria dos picos, tempo de análise e retenção/eluição do analito. Portanto, foram investigadas taxas de fluxo variando de 0,3 a 0,6 mL min⁻¹. Os melhores resultados em termos de sinais analíticos foram obtidos a 0,3 mL min⁻¹. No entanto, não houve reprodutibilidade entre as análises, possivelmente porque essa taxa de fluxo foi insuficiente para garantir a retenção adequada de MBZ e ABZ pelo RAMIP-BSA, para limpeza e para recondicionar adequadamente o sistema. Para a taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹, o coeficiente de variação foi reduzido para ambos os analitos, e não houve aumento na pressão do sistema. Além disso, essa taxa de fluxo possibilitou uma maior frequência analítica.

A composição do eluente desempenha um papel crucial para garantir a eluição eficiente dos analitos da coluna RAMIP-BSA e limpar o polímero para as corridas subsequentes, evitando assim o efeito de *carry over*. Portanto, foram testadas as soluções de eluição: metanol puro e uma solução contendo 1% (v:v) de ácido fórmico em metanol. Como esperado, o uso do eluente contendo 1% de ácido fórmico resultou em maiores recuperações dos analitos. Esses resultados podem ser atribuídos ao uso do ácido fórmico, que otimiza a ionização dos analitos, resultando em melhor detectabilidade do método.

Além disso, é comum o uso de fases móveis acidificadas para a análise de determinados compostos. Nesse sentido, compostos como acetato de amônio, formiato de amônio ou ácido fórmico são preferidos como aditivos na fase móvel¹²³. Esses ácidos são adicionados à fase móvel com o objetivo de aumentar a ionização das moléculas que contêm íons positivos, melhorando assim a detecção dessas espécies durante a análise. O ácido fórmico possui a

vantagem de evaporar facilmente durante a etapa de ionização, evitando interferências indesejadas no espectro de massas.

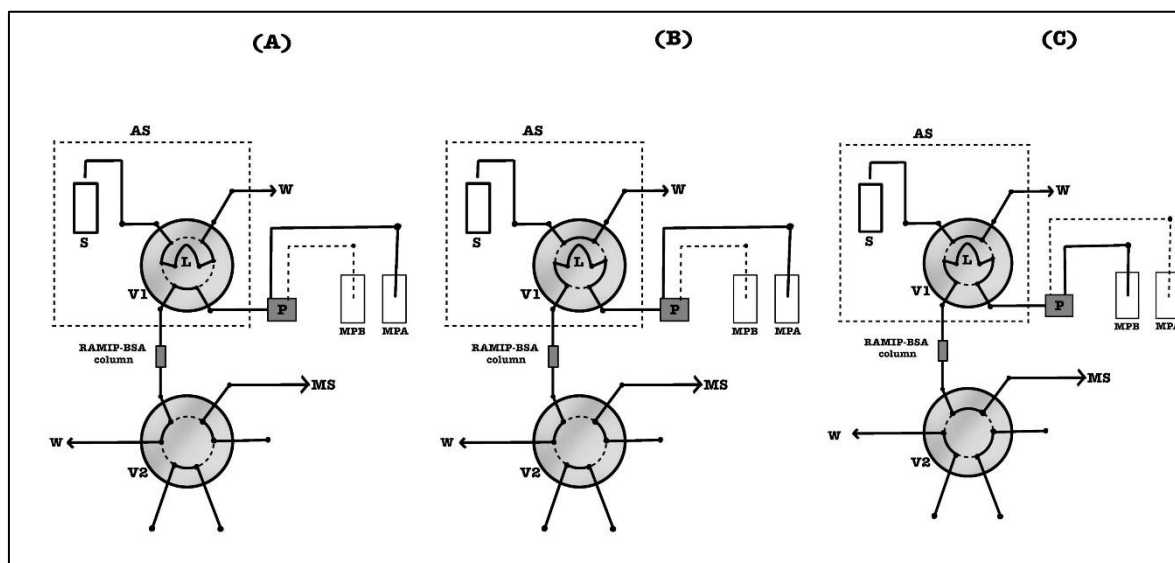
O leite é uma matriz complexa que contém componentes como proteínas, gorduras e açúcares, que podem interferir na ionização dos analitos alvo, levando à supressão do sinal. Nesse contexto, a diluição pode ser necessária para reduzir a concentração desses interferentes, minimizando seu impacto na análise e aprimorando as recuperações e a seletividade do método. Neste estudo, foram avaliados fatores de diluição de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (v:v) de amostra: água Milli-Q e leite não diluído. Os resultados mostraram uma diminuição gradual do sinal analítico com o aumento da diluição. Conseqüentemente, a amostra não diluída apresenta uma maior recuperação dos analitos.

Outro parâmetro significativo que requer otimização é o volume de injeção, que desempenha um papel fundamental na garantia da extração eficiente dos analitos, maximização da detecção e minimização do uso da amostra. Foram avaliados volumes de injeção de 10,0 a 100,0 μL , e os resultados mais favoráveis foram obtidos com um volume de injeção de 70 μL , pois produziu sinais analíticos mais altos. Além de 70,0 μL , houve um declínio no sinal analítico para ambos os analitos. Esse declínio pode ser atribuído à possibilidade de que volumes de injeção maiores possam causar supressão iônica ou exceder a capacidade de adsorção do polímero, resultando na perda de analitos não retidos.

5.7 SISTEMA DE ANÁLISE DIRETA SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS

O sistema para as análises diretas, representado na Figura 23, foi constituído de fases móveis, como água para a fase de condicionamento do polímero (MPA) e ácido fórmico a 1% em metanol para a fase de eluição e limpeza (MPB), ambas com uma taxa de fluxo de 0,5 mL min^{-1} , fornecidas por uma bomba (P) conectada a um amostrador automático (AS) equipado com uma válvula de injeção (V1) com uma alça de 100,0 μL . O amostrador automático foi conectado a uma válvula eletrônica de seis vias (V2), e a coluna RAMIP-BSA estava posicionada entre V1 e V2.

Figura 23 — Sistema on-line de análise direta



Fonte: Do autor, 2023.

O procedimento de análise começou com a injeção de 70,0 μL da amostra na alça de amostragem (Figura 23A) e MPA foi impulsionada pela bomba A, fluindo através da coluna RAMIP-BSA. Posteriormente, a válvula V1 foi acionada, permitindo que a MPA transportasse a amostra através da coluna RAMIP-BSA por 3,5 minutos (Figura 23B). Durante esta fase, o ABZ e o MBZ foram retidos dentro da coluna RAMIP-BSA, enquanto as macromoléculas foram excluídas. Em seguida, a bomba B impulsionou a MPB através da coluna RAMIP-BSA, e após 3,5 minutos, a válvula V2 foi acionada, permitindo que a MPB eluisse os analitos da coluna RAMIP-BSA ao longo de 5,4 minutos, direcionando-os para o espectrômetro de massa (Figura 23C). Pouco depois, o sistema retornou à posição inicial (Figura 23A), e o processo de recondicionamento ocorreu por 2,0 minutos. No total, a análise levou 10,9 minutos, abrangendo fases como condicionamento da RAMIP-BSA, eliminação de proteínas, extração de analitos-alvo e análise por espectrometria de massa.

5.8 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Após otimizadas as condições, o método foi validado avaliando-se os seguintes parâmetros: faixa linear, precisão intra e inter-dias, exatidão inter e intra-dias, limite de detecção e de quantificação e seletividade.

O método desenvolvido demonstrou linearidade para o ABZ dentro da faixa de concentração de 10,0 a 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o MBZ dentro da faixa de 15,0 a 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em termos de precisão, tanto as variações intra-dias, quanto inter-dias, expressas como coeficiente

de variação (CV%) foram consistentemente inferiores a 15%, cumprindo as diretrizes de validação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA)¹²⁴, conforme detalhado na Tabela 6.

A exatidão intra-dias e inter-dias, avaliada por meio do erro relativo, também apresentou resultados satisfatórios. Os limites de detecção (LDs) foram determinados como 4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MBZ e 2,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ABZ. Enquanto isso, os limites de quantificação (LQs) foram estabelecidos em 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MBZ e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ABZ.

A seletividade do método foi demonstrada pela ausência de picos no branco no mesmo tempo de retenção dos analitos.

Além disso, vale ressaltar que a coluna de RAMIP-BSA apresentou notável durabilidade, permitindo mais de 150 extrações sem perda discernível no sinal analítico.

Para uma representação visual dos resultados, a Figura 24 exhibe os gráficos de sinal (TIC) obtidos para (A) amostra de leite em branco; (1B) após otimização para 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ABZ e (2B) 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MBZ; (1C) após otimização para 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ABZ e (2C) 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MBZ.

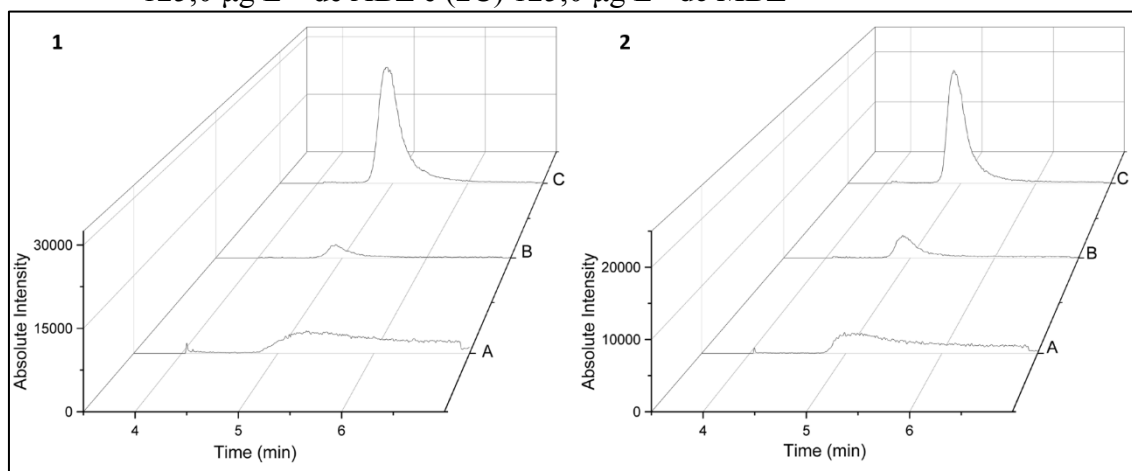
Tabela 6 — Parâmetros da extração on-line aplicada no método MS/MS para a determinação de MBZ e ABZ no leite

Parâmetros	ABZ	MBZ
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10,0-125,0	15,0-125,0
Curva de calibração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$y = 4945,2x + 2431,8$	$y = 3118,8x + 13490$
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,92	4,44
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10,00	15,00
Precisão intra-dias CV% (n=6)	8,83 ^a	3,37 ^b
	2,24 ^c	1,59 ^c
	3,76 ^d	4,63 ^d
Precisão inter-dias CV% (n=6, 3 dias)	9,00 ^a	3,21 ^b
	3,14 ^c	5,26 ^c
	4,86 ^d	4,88 ^d
Exatidão EPR% (n=6)	-7,44 ^a	5,00 ^b
	3,16 ^c	-0,06 ^c
	-1,23 ^d	4,48 ^d
Exatidão EPR% (n=6, 3 dias)	-9,37 ^a	11,13 ^b
	4,32 ^c	4,54 ^c
	-2,92 ^d	-1,66 ^d

Fonte: Do autor, 2023.

Legenda: ^a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. ^b 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. ^c 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. ^d 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 24 — Gráficos (TIC) obtidos para (A) amostra de leite em branco; (1B) após otimização para 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ABZ e (2B) 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MBZ; (1C) após otimização para 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ABZ e (2C) 125,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MBZ



Fonte: Do autor, 2023.

A Tabela 7 apresenta uma comparação entre este artigo e métodos relatados na literatura, destacando a técnica de preparo de amostras, a técnica analítica, o LQ e as limitações em comparação com o estudo atual.

Tabela 7 — Comparação entre os estudos relatados na literatura e os obtidos neste trabalho para a determinação de albendazol e mebendazol em amostras de leite

(continua)

Técnica de preparo de amostra	Técnica analítica	LQ	Desvantagens	Referência
Extração dispersiva em fase sólida (QuEChERS)	UHPLC-MS/MS	0,31 – 117,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Tempo de preparo de amostra (38 min) e uso de coluna cromatográfica	WHELAN, M. <i>et al.</i> (2010) ¹²⁵
Extração dispersiva em fase sólida (QuEChERS)	LC-MS/MS	5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Tempo de preparo de amostra (24 min) e uso de duas colunas cromatográficas	KINSELL, B. <i>et al.</i> (2009) ¹²⁶
Extração dispersiva em fase sólida (QuEChERS)	LC-MS/MS	1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Uso de coluna cromatográfica	DE OLIVEIRA, J. L. <i>et al.</i> (2018) ¹²⁷

Tabela 7 — Comparação entre os estudos relatados na literatura e os obtidos neste trabalho para a determinação de albendazol e mebendazol em amostras de leite

(conclusão)				
Técnica de preparo de amostra	Técnica analítica	LQ	Desvantagens	Referência
Extração por microemulsificação assistida por ultrassom com aumento da eficiência do surfactante (UASEME)	HPLC-UV	2,0 – 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Uso de coluna cromatográfica	BOONTONGT O, T; SANTALADC HAIYAKIT, Y; BURAKHAM, R. (2014) ¹²⁸
Extração com fase líquida suportada em membranas (SLM)	HPLC-UV ou MS	-	Tempo de preparo da amostra (60 min), várias etapas e uso de coluna cromatográfica	MSAGATI, T. A; NINDI, M. M. (2001) ¹²⁹
Extração on-line com polímero molecularmente impresso de acesso restrito	ESI-MS/MS	10,0 – 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	Este trabalho

Fonte: Do autor, 2023.

5.9 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido para a determinação de resíduos de albendazol e mebendazol foi aplicado em cinco amostras de leite. Das cinco amostras analisadas, três delas apresentaram traços de anti-helmínticos, indicando a presença dessas substâncias nos produtos lácteos, como pode ser observada na Tabela 8. O CV das replicatas (n=3) em que foi possível quantificar o mebendazol foi inferior a 14%.

Tabela 8 — Concentrações dos fármacos determinados (n=3) em amostras de leite

Amostras	Concentração determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$) (CV%)	
	Albendazol	Mebendazol
1	<LD	<LD
2	<LD	<LD
3	<LQ	<LD
4	<LD	<LQ
5	<LD	26,05 (13,82)

Fonte: Do autor, 2023.

Legenda: <LD: menor que o limite de detecção

<LQ: menor que o limite de quantificação

Em uma das amostras, foi identificada a presença de albendazol, porém em níveis baixos, abaixo do limite de quantificação (<LQ). Quanto ao mebendazol, ele foi detectado em duas amostras, uma delas também em níveis baixos (<LQ) e na outra amostra, a concentração foi de 26,05 $\mu\text{g L}^{-1}$, valor que pode ser detectado e quantificado com precisão pelo método desenvolvido.

Esta constatação é de extrema importância, uma vez que não há tolerância para a presença de mebendazol, mesmo em baixas concentrações, em produtos lácteos destinados ao consumo humano⁸³. Essa descoberta levanta questões sobre a qualidade e segurança desses produtos lácteos, pois o consumo de leite contendo qualquer quantidade detectável de mebendazol pode representar riscos à saúde dos consumidores.

Esses resultados enfatizam a relevância da aplicação de métodos analíticos confiáveis e sensíveis para monitorar a presença de resíduos de medicamentos em alimentos, garantindo a segurança e a qualidade dos produtos que chegam à mesa dos consumidores. Medidas de controle e fiscalização devem ser implementadas para evitar a presença de resíduos de medicamentos em níveis acima dos limites permitidos, visando proteger a saúde pública e assegurar a conformidade dos produtos com os padrões regulatórios estabelecidos.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, um RAMIP-BSA seletivo a anti-helmínticos benzimidazólicos foi sintetizado e caracterizado por FT-IR, TG, BET e MEV. Por meio dessas caracterizações, foi possível atestar a eficiência da síntese e do revestimento com a BSA. O material também foi avaliado quanto à sua seletividade em relação a molécula molde comparada ao material RANIP-BSA e a sua capacidade de excluir macromoléculas de amostras complexas.

A síntese desse material provou ser eficiente, mostrando uma notável seletividade para os analitos alvo, ao mesmo tempo em que excluía efetivamente as proteínas presentes na matriz do leite. Conseqüentemente, a necessidade de preparação prévia da amostra foi eliminada.

O estudo de cinética de adsorção demonstrou que o equilíbrio de adsorção é alcançado em 5 min e que o modelo não linear que a explica é o modelo de pseudo-primeira ordem, caracterizando um processo de fisissorção. A isoterma de adsorção, por sua vez, foi melhor ajustada ao modelo de Sips, sendo essa uma combinação entre as isotermas de Langmuir e Freundlich.

Um sistema on-line foi projetado para a extração e análise de anti-helmínticos benzimidazólicos em leite de vaca. Neste, o RAMIP-BSA previamente sintetizado e caracterizado foi usado para extração de MBZ e ABZ e a ESI-MS/MS foi usada para detecção e quantificação dos fármacos. Para isso, o método foi primeiramente otimizado, sendo os parâmetros ideais de análise pH da amostra ajustado para 3,0, água como fase de condicionamento e metanol com 1% de ácido fórmico como fase de eluição e limpeza do polímero, fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e 70 µL de volume de injeção. O tempo total de análise, incluindo o tempo de extração e detecção dos analitos foi de 10,9 min.

O método desenvolvido apresentou boas figuras de mérito, incluindo alta seletividade, precisão e exatidão, o que permitiu análises em baixas concentrações. A aplicação em amostras reais, apresentou eficiência em sua aplicabilidade, sendo que foram encontrados resíduos dos fármacos estudados, albendazol e mebendazol, nas amostras de leite coletadas.

Essa abordagem possui uma ampla gama de aplicações, que vão desde o controle de qualidade em produtos lácteos até a monitorização de resíduos de medicamentos em alimentos. Como tal, representa uma contribuição significativa para o campo da análise de resíduos de medicamentos em alimentos.

REFERÊNCIAS

- ¹CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Alta dos custos pressiona PIB do agronegócio no primeiro semestre recuo de 2,48%**. [s. l.]: CEPEA, 2022. Disponível em: [dtec.pib_jun_2022.20set2022_vf \(usp.br\)](https://dtec.pib_jun_2022.20set2022_vf.usp.br). Acesso em: 20 dez. 2022.
- ²FULBER, L. C. B. *et al.* Caracterização de propriedades leiteiras do município de Toledo, oeste do Paraná= Factors interfering in the quality of milk from cattle in herds of Toledo, western Paraná. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 53985-54006, 2022.
- ³VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P. Integrated control of nematode infections in cattle: A reality? A need? A future?. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 165-175, 1999.
- ⁴FORTES, F.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 33, p. 1391-1402, 2013.
- ⁵SALLE, G. *et al.* Risk factor analysis of equine strongyle resistance to anthelmintics. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 407-415, 2017.
- ⁶MOONEY, D. *et al.* An analysis of the spatio-temporal occurrence of anthelmintic veterinary drug residues in groundwater. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 769, p. 144804, 2021.
- ⁷YOO, K. *et al.* Development of an analytical method for multi-residue quantification of 18 anthelmintics in various animal-based food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 68-76, 2021.
- ⁸DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 880, p. 103-121, 2015.
- ⁹BELTRAN, A. *et al.* Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 1363–1375, 2010.

¹⁰JUNG, H. *et al.* Simultaneous quantification of 12 veterinary drug residues in fishery products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 348, p. 129105, 2021.

¹¹SAUNDERS, K. C. *et al.* Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 652, n. 1-2, p. 22-31, 2009.

¹²BERENDSEN, B. J. A. *et al.* Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 43, p. 229-239, 2013.

¹³FIGUEIREDO, 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. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 44, p. 361-375, 2008.

¹⁴TARLEY, 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**, [s. l.], v. 28, p. 1076-1086, 2005.

¹⁵DE FARIA. *et al.* New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 959, p. 43-65, 2017.

¹⁶MENGERINK, Y. *et al.* Sequence distribution determination by SWAMP- MS a systematic way of analyzing multiple fragmented polymers with mass spectrometry. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 140, n. 13, p. e53683, 2023.

¹⁷SANTOS, M. G. **Síntese, caracterização e emprego de polímeros molecularmente impressos na extração de fármacos em amostras humanas de plasma e urina**. 2015. 91f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, 2015.

¹⁸CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Strategies for preparation of molecularly imprinted polymers modified electrodes and their application in electroanalysis: a review. **Analytical Letters**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 297-313, 2012.

¹⁹DICKEY, F. H. The preparation of specific adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 227-229, 1949.

²⁰TAMAYO, F.G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1152, n. 1-2, p. 32-40, 2007.

²¹SOUZA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: Síntese e caracterização. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1609 – 1619, 2009.

²²HALVORSEN, T. G. *et al.* Affinity capture in bottom-up protein analysis—overview of current status of proteolytic peptide capture using antibodies and molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1182, p. 338714, 2021.

²³UO, M. *et al.* Protein-imprinted polymer with immobilized assistant recognition polymer chains, **Biomaterials**, [s. l.], v. 27, p. 4381-4387, 2006.

²⁴MARTÍN- ESTEBAN, A. Green molecularly imprinted polymers for sustainable sample preparation. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 233-245, 2022.

²⁵SOUZA, I. D. *et al.* Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 932, p. 49-59, 2016.

²⁶VALERO-NAVARRO, A. *et al.* Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1218, n. 41, p. 7289-7296, 2011.

²⁷DIAS, A. C. B. *et al.* Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. **Talanta**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 988-996, 2008.

²⁸CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 804, p. 173-182, 2004.

²⁹WANG, Y. *et al.* Thermo- sensitive surface molecularly imprinted magnetic microspheres based on bio- macromolecules and their specific recognition of bovine serum albumin. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 996-1002, 2020.

- ³⁰XIA, J. *et al.* Separation/enrichment of the low-content high molecular weight natural protein using protein-imprinted polymers with ARPCs. **Science in China Series B: Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 1388-1393, 2009.
- ³¹ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 745, p.3-13, 2000.
- ³²KIDAKOVA, A. *et al.* Advanced sensing materials based on molecularly imprinted polymers towards developing point-of-care diagnostics devices. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 158-167, 2019.
- ³³CARRASCO, S. *et al.* Fiber-optic array using molecularly imprinted microspheres for antibiotic analysis. **Chemical Science**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 3139-3147, 2015.
- ³⁴HU, T. *et al.* Recent advances and applications of molecularly imprinted polymers in solid-phase extraction for real sample analysis. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 274-309, 2021.
- ³⁵MAIER. *et al.* Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam: Elsevier, [s. l.], v. 804, n. 1, p. 103 – 111, 2004.
- ³⁶MAHONY, J. O. *et al.* Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 534, n. 1, p. 31-39, 2005.
- ³⁷ZUO, H. *et al.* Preparation of a novel restricted access material combined to core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for determination of dimethyl phthalate in soils. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 529-546, 2019.
- ³⁸ZUO, H. G. *et al.* Preparation of Novel Restricted Access Material-Surface Molecularly Imprinted Polymers via Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization for 17 β -Estradiol Determination in Milk Powder. **Journal of Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 77, n. 9, p. 1203-1212, 2022.

³⁹DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 544, p. 25, 1991.

⁴⁰BOOS, K. S.; GRIMM, C. H. High-performance liquid chromatography integrated solidphase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 175-180, 1999.

⁴¹WANG, X. *et al.* Monodisperse restricted access material with molecularly imprinted surface for selective solid- phase extraction of 17 β - estradiol from milk. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 43, n. 17, p. 3520-3533, 2020.

⁴²WANG, H. *et al.* Synthesis of a novel restricted access chiral stationary phase based on atom transfer radical polymerization and click chemistry for the analysis of chiral drugs in biological matrices. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1218, n. 9, p. 1310-1313, 2011.

⁴³DE CARVALHO, L.C.; FIGUEIREDO, E. Costa. A new restricted access molecularly imprinted fiber for direct solid phase microextraction of benzodiazepines from plasma samples. **Analyst**, [s. l.], v. 144, n. 14, p. 4320-4330, 2019.

⁴⁴PINTO, M. A. L.; DE SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 139, p. 116-124, 2017.

⁴⁵KUMAR, T. V.; SUNDRAMOORTHY, A. K. Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1074, p. 131-141, 2019.

⁴⁶MACIEL, E. V. S. *et al.* New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. **TrAc Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 119, p. 115633, 2019.

⁴⁷KAYA, S. I.; CETINKAYA, A.; OZKAN, S. A. Molecularly imprinted polymers as highly selective sorbents in sample preparation techniques and their applications in environmental water analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, p. e00193, 2022.

- ⁴⁸RIEUX, L. *et al.* Restricted-access material-based high-molecular-weight protein depletion coupled on-line with nano-liquid chromatography–mass spectrometry for proteomics applications. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1149, n. 2, p. 169-177, 2007.
- ⁴⁹HAGINAKA, J. *et al.* Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 849, n. 2, p. 331-339, 1999.
- ⁵⁰WANG, D. D. *et al.* Preparation of restricted access molecularly imprinted polymers based fiber for selective solid-phase microextraction of hesperetin and its metabolites in vivo. **Talanta**, [s. l.], v. 202, p. 392-401, 2019.
- ⁵¹MENDES, T. V. *et al.* Synthesis and characterization of a new magnetic restricted access molecularly imprinted polymer for biological sample preparation. **Materials Today Communications**, [s. l.], v. 24, p. 101002, 2020.
- ⁵²SOUZA, I. D. *et al.* Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 932, p. 49-59, 2016.
- ⁵³SANTOS, M. G. *et al.* Direct doping analysis of beta-blocker drugs from urinary samples by on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography/mass spectrometry. **Analyst**, [s. l.], v. 140, n. 8, p. 2696-2703, 2015.
- ⁵⁴DE LIMA, M. M. *et al.* On-line restricted access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 197, p. 7-13, 2016.
- ⁵⁵SUN, Z. *et al.* A restricted access molecularly imprinted polymer coating on metal–organic frameworks for solid-phase extraction of ofloxacin and enrofloxacin from bovine serum. **RSC Advances**, [s. l.], v. 9, n. 48, p. 27953-27960, 2019.
- ⁵⁶DE OLIVEIRA, G. *et al.* 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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 405, n. 24, p. 7687-7696, 2013.

- ⁵⁷BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo – PAMVet**. Brasília: MEC, 2015. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 jan. 2023.
- ⁵⁸PAWAR, P. *et al.* Evaluation and correlation of multiple anthelmintic resistances to gastrointestinal nematodes using different fecal egg count reduction methods in small ruminants of Punjab, India. **Acta Parasitologica**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 456-463, 2019.
- ⁵⁹DOYLE, S. R.; COTTON, J. A. Genome-wide approaches to investigate anthelmintic resistance. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 289-301, 2019.
- ⁶⁰DRUDGE, J. H. *et al.* Field studies on parasite control in sheep: comparison of thia-bendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 25, n. 108, p. 1512-1518, 1964.
- ⁶¹JACKSON, R. *et al.* Anthelmintic resistance and management of nematode parasites on beef cattle-rearing farms in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 289-296, 2006.
- ⁶²LANUSSE, C. *et al.* Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 664-682, 2018.
- ⁶³ALI, M. S. *et al.* Anthelmintic drugs: Their efficacy and cost-effectiveness in different parity cattle. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 79-85, 2018.
- ⁶⁴FLORES, A. G. *et al.* Multiple resistance in equine cyathostomins: a case study from military establishments in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 29, 2020.
- ⁶⁵AKASHI, K. T. *et al.* Classificação e ação de antihelmínticos em ruminantes: Revisão de literatura. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, [s. l.], v. 4, p. 190-197, 2017.
- ⁶⁶ANDRADE, S. F. Endo e ectoparasiticidas. *In*: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. [s. l.]: Editora Roca, 2008. v. 3, p. 520-560.
- ⁶⁷LIANG, G. *et al.* Molecularly imprinted monolithic column based on functionalized β -cyclodextrin and multi-walled carbon nanotubes for selective recognition of benzimidazole residues in citrus samples. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 146, p. 1285-1294, 2019.

- ⁶⁸ARDILA, J. A. *et al.* Design of experiments applied to stress testing of pharmaceutical products: A case study of Albendazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 165, p. 105939, 2021.
- ⁶⁹SANGAMITHIRAI, D. *et al.* Tunable poly (o-anisidine)/carbon nanotubes nanocomposites as an electrochemical sensor for the detection of an anthelmintic drug mebendazole. **Polymer Bulletin**, [s. l.], v. 75, n. 7, p. 3127-3147, 2018.
- ⁷⁰YANG, W-Z. *et al.* Determination of the solubility and thermodynamic properties of albendazole in a binary solvent of ethanol and water. **Physics and Chemistry of Liquids**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 1-11, 2021.
- ⁷¹DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 86, n. 2-3, p. 141-159, 2003.
- ⁷²RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L. *et al.* The Identification of Metabolites and Effects of Albendazole in Alfalfa (*Medicago sativa*). **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 16, p. 5943, 2020.
- ⁷³PETTARIN, M. *et al.* A combined in vitro in-silico approach to predict the oral bioavailability of borderline BCS Class II/IV weak base albendazole and its main metabolite albendazole sulfoxide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 155, p. 105552, 2020.
- ⁷⁴BLANCO-PANIAGUA, E. *et al.* Secretion into Milk of the Main Metabolites of the Anthelmintic Albendazole Is Mediated by the ABCG2/BCRP Transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. e00062-22, 2022.
- ⁷⁵CHHONKER, Y. S.; EDI, C.; MURRY, D.J. LC–MS/MS method for simultaneous determination of diethylcarbamazine, albendazole and albendazole metabolites in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 151, p. 84-90, 2018.
- ⁷⁶EL GAMMAL, R. N. *et al.* Exploring the molecular interaction of mebendazole with bovine serum albumin using multi-spectroscopic approaches and molecular docking. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, p. 11582, 2022.

⁷⁷TEGGI, A.; LASTILLA, M. G.; DE ROSA, F. Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 1679-1684, 1993.

⁷⁸MATHUR, M. K. *et al.* Study of opportunistic intestinal parasitic infections in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 164, 2013.

⁷⁹BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. **Relação nacional de medicamentos essenciais RENAME 2022**. Brasília: MS, 2022.

⁸⁰LEATHWICK, D. M. *et al.* Anthelmintic resistance in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, [s. l.], v.49, n.6, p.227-235, 2001.

⁸¹VLAMINCK, J. *et al.* Comprehensive evaluation of stool-based diagnostic methods and benzimidazole resistance markers to assess drug efficacy and detect the emergence of anthelmintic resistance: A Starworms study protocol. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. e0006912, 2018.

⁸²GHAFFAR, A. *et al.* Evaluation of anti-helminthic activity of Zingiber officinale roscoe extract on Fasciola hepatica miracidia In vitro. **International Archives of Health Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 45, 2021.

⁸³BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Lista de IDA, DRFA E LMR para IFA com uso autorizado - Instrução normativa 2019**. Brasília: MAPA, 2019. Disponível em: [instrucao-normativa-2019_51-anvisa.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/medicamentos-antiparasitarios/relacao-nacional-de-medicamentos-essenciais-2022/instrucao-normativa-2019_51-anvisa.pdf) (www.gov.br). Acesso em: 17 nov. 2021.

⁸⁴WESDEMIOTIS, C. *et al.* Mass spectrometry of polymers: A tutorial review. **Mass Spectrometry Reviews**, 2023.

⁸⁵YU, C. *et al.* A one adsorbent QuEChERS method coupled with LC-MS/MS for simultaneous determination of 10 organophosphorus pesticide residues in tea. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 321, p. 126657, 2020.

- ⁸⁶MESONZHNIK, N. V. *et al.* LC-MS/MS Identification and Structural Characterization of Main Biodegradation Products of Nitroproston-A Novel Prostaglandin-based Pharmaceutical Compound. **Drug Metabolism Letters**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 54-61, 2018.
- ⁸⁷PASUPULETI, R. R. *et al.* Novel fast pesticides extraction (FaPEX) strategy coupled with UHPLC-MS/MS for rapid monitoring of emerging pollutant fipronil and its metabolite in food and environmental samples. **Environmental Research**, [s. l.], v. 217, p. 114823, 2023.
- ⁸⁸EL-ANEED, A; COHEN, A; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009.
- ⁸⁹YANG, Z. *et al.* Development of a newly compact double-focusing mass spectrometer. **Vacuum**, [s. l.], v. 210, p. 111815, 2023.
- ⁹⁰WILM, M. Principles of electrospray ionization. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2011.
- ⁹¹MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual review of biochemistry**, [s. l.], v. 70, n 1, p. 437-473, 2021.
- ⁹²GALLIEN, S. *et al.* Selectivity of LC-MS/MS analysis: implication for proteomics experiments. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 81, p. 148-158, 2013.
- ⁹³ARSHAK, P.; HANNO, G.; MICHAEL, J. Schöning, Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 140, 2019.
- ⁹⁴LI, Q. *et al.* The application of NMR- based milk metabolite analysis in milk authenticity identification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 97, n. 9, p. 2875-2882, 2017.
- ⁹⁵ZHENG, W. *et al.* Bithionol residue analysis in animal-derived food products by an effective and rugged extraction method coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 1064, p. 100-108, 2017.

- ⁹⁶LÓPEZ-RUIZ, R. *et al.* Applying an instrument-agnostic methodology for the standardization of pesticide quantitation using different liquid chromatography-mass spectrometry platforms: A case study. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1664, p. 462791, 2022.
- ⁹⁷KARATASSO, Y. O. *et al.* Quantitative ESI-MS analysis of antiarrhythmic drugs in blood plasma without chromatographic separation. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 166-169, 2007.
- ⁹⁸FIGUEIREDO, E. C. *et al.* Quantitation of drugs via molecularly imprinted polymer solid phase extraction and electrospray ionization mass spectrometry: benzodiazepines in human plasma. **Analyst**, [s. l.], v. 136, n. 18, p. 3753-3757, 2011.
- ⁹⁹BECCARIA, M.; CABOOTER, D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Analyst**, [s. l.], v. 145, n. 4, p. 1129-1157, 2020.
- ¹⁰⁰HARUN, N.; ANDERSON, R. A.; CORMACK, P. AG. Analysis of ketamine and norketamine in hair samples using molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 396, p. 2449-2459, 2010.
- ¹⁰¹CHEN, G.; ZHITOMIRSKY, I.; GHOSH, R. Fast, low-pressure chromatographic separation of proteins using hydroxyapatite nanoparticles. **Talanta**, [s. l.], v. 199, p. 472-477, 2019.
- ¹⁰²FAN, Y. *et al.* Column-free purification methods for recombinant proteins using self-cleaving aggregating tags. **Polymers**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 468, 2018.
- ¹⁰³TÖLGYESI, A. *et al.* Screening and confirmation of steroids and nitroimidazoles in urine, blood, and food matrices: Sample preparation methods and liquid chromatography tandem mass spectrometric separations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 145, p. 805-813, 2017.
- ¹⁰⁴GRECCO, C. F. *et al.* Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 99-110, 2018.

¹⁰⁵CALDAS, S. S. *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

¹⁰⁶PORTO, J. M. *et al.* Determinação de resíduos anti-helmínticos no leite caprino no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, [s. l.], v. 20, 2019.

¹⁰⁷LOURENCO, A. *et al.* Determination of the presence of pathogens and anthelmintic drugs in raw milk and raw milk cheeses from small scale producers in Ireland. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 130, p. 109347, 2020.

¹⁰⁸LI, Y. *et al.* Determination of 19 anthelmintics in environmental water and sediment using an optimized PLE and SPE method coupled with UHPLC-MS/MS. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 719, p. 137516, 2020.

¹⁰⁹BUSTAMANTE- RANGEL, M.; DELGADO- ZAMARREÑO, M. M.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E. Simple method for the determination of anthelmintic drugs in milk intended for human consumption using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 322-329, 2022.

¹¹⁰OHNSMANN, J. *et al.* Determination of caffeine in tea samples by Fourier transform infrared spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 374, p. 561-565, 2002.

¹¹¹SANTOS, M. G. *et al.* Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification. **Talanta**, [s. l.], v. 163, p. 8-16, 2017.

¹¹²AOAC INTERNATIONAL. **Guidelines for standard method performance requirements AOAC Official Methods of Analysis**. [s. l.], 2016. Appendix F, p. 1-18.

Disponível em: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf. Acesso em: 11 set. 2023.

¹¹³TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: 78 preparo e aplicações de MIP (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, São Paulo, v.28, p.1076-1086, 2005.

- ¹¹⁴PUOCI, F. *et al.* New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, Calábria, v.45, n.6, p.1634–1640, 2009.
- ¹¹⁵SANTOS, M. G. *et al.* Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: a comparison related to physical and chemical properties. **The Analyst**, Alfenas, v.140, n.22, p.7768–7775, 2015.
- ¹¹⁶FERNANDES, R. M. T. **Polímero de impressão molecular para a extração seletiva de fármacos em matrizes biológicas e determinação por LC-MS/MS e MS/MS**. 2012. 113f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Campinas, Campinas-SP, 2012.
- ¹¹⁷TAN, K. L.; HAMEED, B. H. Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 74, p. 25–48, 2017.
- ¹¹⁸TRAN, H. N. *et al.* Mistakes and inconsistencies regarding adsorption of contaminants from aqueous solutions: A critical review. **Water Research**, [s. l.], v. 120, p. 88–116, 2017.
- ¹¹⁹FOO K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, Malásia, v.156, n.1, p.2–10, 2010.
- ¹²⁰ZHANG. K; PEREIRA, A. S.; MARTIN, J. W. Estimates of octanol–water partitioning for thousands of dissolved organic species in oil sands process-affected water. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 49, n. 14, p. 8907-8913, 2015.
- ¹²¹YOUSEF, F. O. *et al.* Investigation of spectroscopic properties and molecular dynamics simulations of the interaction of mebendazole with β -cyclodextrin. **Journal of the Iranian Chemical Society**, [s. l.], v. 18, p. 75-86, 2021.
- ¹²²WANG, D. *et al.* Hypercrosslinked β -cyclodextrin porous polymer as adsorbent for effective uptake towards albendazole from aqueous media. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 227, p. 115720, 2019.
- ¹²³RUSH, M. D.; VAN BREEMEN, R. B. Role of ammonium in the ionization of phosphatidylcholines during electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 264-268, 2017.

- ¹²⁴BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica - resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília: MAPA, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacao-metodos-da-rede-lfda/residuos-contaminantes/manualdegarantiaanalitica.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2023.
- ¹²⁵WHELAN, M. *et al.* Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1217, n. 27, p. 4612-4622, 2010.
- ¹²⁶KINSELLA, B. *et al.* New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 637, n. 1-2, p. 196-207, 2009.
- ¹²⁷DE OLIVEIRA, J. L. *et al.* Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 240, p. 1243-1253, 2018.
- ¹²⁸BOONTONGTO, T., SANTALADCHAIYAKIT, Y., BURAKHAM, R. Alternative green preconcentration approach based on ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction and HPLC for determination of benzimidazole anthelmintics in milk formulae. **Chromatographia**, [s. l.], v. 77, p. 1557-1562, 2014.
- ¹²⁹MSAGATI, T. A., NINDI, M. M. Determination of benzimidazole anthelmintic compounds by supported liquid membrane extraction and liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 606-614, 2001.