

Maria Betânia de Freitas

**POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR NO PREPARO DE  
AMOSTRAS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA  
DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE AMITRIPTILINA E  
NORTRIPTILINA EM PLASMA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Orientadora: Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira.

Alfenas/MG  
2008

Maria Betânia de Freitas

**POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR NO PREPARO DE  
AMOSTRAS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA  
DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE AMITRIPTILINA E  
NORTRIPTILINA EM PLASMA**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Aprovada em: 27 de junho de 2008

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
Assinatura:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Maria Alvarez Leite  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais  
Assinatura:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isarita Martins  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
Assinatura:

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Fernando e Angélica,  
fontes de toda a inspiração para a conquista deste título, ofereço  
com o mais profundo respeito e gratidão as seguintes palavras:

"Se pude ver mais longe foi porque me apoiei em ombros de  
gigantes..."

Isaac Newton

Ao Alysson,  
Companheiro...  
Amigo...  
Minha vida...

Enfim, só um sentimento justifica todos os momentos juntos: AMOR!

À professora Doutora Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, pelos ensinamentos e orientação neste trabalho. Espero ter atingido as suas expectativas como orientada.

À minha irmã, Josélia, com toda admiração,  
Ao meu irmão, Marcos, exemplo de dedicação ao seu trabalho,  
Minha família, que nunca tiveram que saber o que era polímero  
de impressão molecular ou para que servia um HPLC, para apoiarem,  
incentivarem e rezarem para que este trabalho se realizasse. E que,  
mesmo longe dos olhos sempre estiveram perto do meu coração.

Agradeço especialmente a DEUS,

O único que realmente sabe o que esta dissertação de mestrado significa para mim, por isso fortaleceu meus passos e guiou-me nesta difícil caminhada, tornando possível o alcance dos meus objetivos.

E me ensinou: humildade sempre.

“...que a tua mão esquerda não saiba o que faz a direita.”

Mt 6,3

## AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar à Professora Doutora Magali Benjamin de Araújo, pelo incentivo à minha carreira e pela amizade. Um exemplo de pessoa e profissional que quero ser quando "crescer".

À Unifal-MG, pela oportunidade oferecida para obtenção deste título.

Ao doutorando do Instituto de Química da Unicamp, Eduardo Costa Figueiredo e ao seu orientador professor Doutor Marco Aurélio Zezzi Arruda, sempre disponíveis a atender as necessidades do meu trabalho.

Ao Professor Doutor Fábio Augusto e à sua orientada de doutorado Raquel Gomes da Costa Silva, do Instituto de Química da Unicamp, pelos ensinamentos para desenvolvimento desta pesquisa.

A toda "família" do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Unifal-MG: Beth, Isarita, Fábio, Márcia e Andressa, que de alguma forma contribuíram e estiveram prontos para ajudar quando precisei. Em especial a Patrícia por tanta disposição em nos ajudar nos equipamentos, pelas horas extras no laboratório e também pela sua amizade em todos os momentos.

Ao auxílio técnico da acadêmica Joyce Brito nas análises por SPE-C18.

Ao Professor Doutor César Ricardo Teixeira Tarley, pelos importantes ensinamentos e sugestões no decorrer deste trabalho e durante o exame de Qualificação.

À Professora Mestra Luciene Alves Moreira Marques que sempre acreditou no meu trabalho e tornou possível a docência pela Unifenas.

À Professora Mestra Stael Maria Costa Ruela, coordenadora do curso de Farmácia da Unifenas Varginha e à Professora Mestra Lydia Maria Foresti, coordenadora do campus, por me apoiarem nesta carreira e compreenderem a difícil tarefa de conciliação entre minhas atividades acadêmicas e profissionais.

Aos queridos companheiros de "peregrinação": amigo Sartori e amiga Érika. Nossas viagens a trabalho motivadas pelas histórias do professor Sartori ficarão para sempre em minha memória como sinal de amizade e cooperação entre nós. Sou privilegiada por ter encontrado vocês no meu caminho...

Aos funcionários da Unifenas Varginha, Cátia, secretária de apoio do curso de Farmácia, que tanto me ajudou na organização de cursos e congressos e aos técnicos Anderson e Patrícia, sempre atenciosos e disponíveis para montagem das minhas aulas práticas.

Aos amigos da Farmácia Escola da Unifal-MG, Milena, Francine, Valéria e Alan, amizade esta iniciada pelo contato profissional tão importante para meu aprendizado.

Aos amigos inesquecíveis do colégio Anglo, Jorginho, Lúcia Pereira, Bia, Alcides e aos demais colegas, pelos anos de convívio, tantos momentos agradáveis que me fortaleciam a cada semana para continuar a caminhada.

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Fernanda, Pollyana, Daniela, Ananda e Suelen. Compartilhar problemas, dificuldades, bons resultados, experiência... Contribuiu muito para que esse trabalho se realizasse.

Aos meus bons amigos da época de Alfenas, Rodrigo Urias, Tatiana, Rodrigo Valentim, Marquinho e Roberto, pelos momentos incomparáveis de risos e festas que passamos juntos, lembranças eternas...

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho. Muito obrigada!!!

## RESUMO

Os polímeros de impressão molecular (MIP) são materiais promissores para aplicação em extração em fase sólida (SPE). Os MIP são obtidos através da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos, o que se deve ao arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor da molécula molde. Nesse trabalho foi sintetizado MIP - usando como monômero funcional o ácido metacrílico (AMA) e como moléculas molde a amitriptilina (AMI) e a imipramina - e também o MIS, polímeros de sílica organicamente modificada - usando o 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) como monômero funcional e a AMI e nortriptilina (NOR) como moléculas molde. Também foram sintetizados os polímeros não impressos (NIP e NIS) correspondentes. Os polímeros foram avaliados na extração em fase sólida (MISPE) para análise de AMI e NOR em amostras aquosas e de plasma, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A dessorção dos moldes foi realizada em extrator de Soxhlet até que níveis negligenciáveis fossem obtidos, monitorados através da CLAE. Os MISPE foram preparados em cartuchos de polipropileno contendo 200 mg do polímero e utilizando sistema de vácuo multicomponente para as percolações das amostras e dos solventes. As diferentes etapas do MISPE foram otimizadas, como o condicionamento, carregamento, lavagem e eluição dos analitos. Também foi feita uma revalidação de método de preparo de amostra por SPE octadecila seguida de análise em CLAE, para fins de comparação de resultados. A seletividade dos polímeros, avaliada pelo fator de impressão, i.é., a relação da resposta MIS *versus* NIS, mostrou valores de 2,5 e 2,6 para a AMI e NOR, respectivamente, no MIS-AMI, e de 1,7 e 3,5 para a AMI e NOR, respectivamente, no MIS-NOR. No método usando SPE C18, foram obtidos parâmetros de validação adequados para uso na monitorização terapêutica, como linearidade entre 20 e 400 ng mL<sup>-1</sup> ( $r = 0,996$ ); LQ de 20 ng mL<sup>-1</sup>; precisão intra-ensaio entre 3,2 - 16,4% para a AMI e entre 9,5 - 14,8% para a NOR; recuperação média de 99,1% para a AMI e de 93,8% para a NOR. Nenhum dos polímeros sintetizados nesta pesquisa seja por síntese em "bulk" de ácido metacrílico (MIP-AMI e MIP-IMI) ou por processo sol-gel usando o APTMS (MIS-AMI e MIS-NOR), mostrou condições satisfatórias para uso em

MISPE, na análise por CLAE de AMI e NOR, principalmente devido à baixa precisão de resultados nos níveis pretendidos. Por outro lado, o uso dos MISPE no preparo das amostras resultou em perfil cromatográfico mais limpo, quando comparado com o obtido com cartuchos C18 no preparo de amostras.

**Palavras-chave:** Polímeros de Impressão Molecular. Extração em Fase sólida. Amitriptilina. Nortriptilina.

## ABSTRACT

Molecularly imprinted polymers (MIP) have appeared as new selective sorbents for solid-phase extraction (SPE). MIP is obtained through the preparation of polymers with synthetic recognition sites and they show predetermined selectivity to one or more analytes that can be attributed to the arrangement of functional polymer around the template. In this research MIP - using methacrylic acid (MAA) as monomer and amitryptiline (AMI) and imipramine as templates – and also an organically modified molecularly imprinted silica (MIS) – using 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) as monomer and AMI and NOR as templates – as well as the corresponding non imprinted polymers (NIP and NIS) were synthesized. The polymers were evaluated to application in SPE for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of AMI and NOR in aqueous and plasma samples. Desorption of the templates were performed in Soxhlet apparatus until negligible levels were obtained, as monitored by HPLC analysis. The MISPE were packed on polypropylene cartridges containing 200 mg of the polymer and using a vacuum manifold system for the sample and solvents percolations. The different steps of SPE: conditioning, loading, washing and elution were optimized. A SPE C18- HPLC method was also re-validated to compare the results. The selectivity of the polymers, evaluated by imprinting factors, i.e., response in MIS *versus* NIS, showed values of 2.5 and 2.6 for AMI and NOR respectively, in MIS-AMI and 1.7 and 3.5 in MIS-NOR for AMI and NOR respectively, in MIS-NOR. In the extraction using SPE C18, adequate parameters of validation were obtained showing the reliability of the method to the therapeutic drug monitoring, as linearity between 20 and 400 ng mL<sup>-1</sup> ( $r=0.996$ ); LOQ of 20 ng mL<sup>-1</sup>; intra assay precision between 3.2 - 16.4% for AMI and 9.5 - 14.8% for NOR; mean recovery of 99.1% for AMI and 93.8% for NOR. Neither polymers prepared, by the synthesis in bulk of MAA (MIP-AMI and MIP-IMI) or by sol-gel process using APTMS (MIS-AMI and MIS-NOR) showed satisfactory conditions for using in MISPE coupled with HPLC-UV analysis of AMI and NOR, mainly due to poor precision of the results in concentration range of concern. On the other hand, the use of MISPE resulted in cleaner chromatographic profile when compared to the SPE C18 cartridges in sample preparation.

**Key words:** Molecularly Imprinted Polymer. Solid-Phase Extraction. Amitriptyline. Nortriptyline.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura química geral dos antidepressivos tricíclicos.....	<b>28</b>
<b>Figura 2</b> – Fórmula estrutural plana da amitriptilina (AMI), nortriptilina (NOR), imipramina (IMI), desipramina (DESI) e clomipramina (CLOMI).....	<b>28</b>
<b>Figura 3</b> – Biotransformação da amitriptilina.....	<b>32</b>
<b>Figura 4</b> – Esquema do processo de síntese de polímeros biomiméticos.....	<b>34</b>
<b>Figura 5</b> – Monômeros mais empregados no preparo de polímeros biomiméticos.....	<b>36</b>
<b>Figura 6</b> – Iniciadores radicalares mais empregados no preparo de polímeros biomiméticos.....	<b>37</b>
<b>Figura 7</b> – Reagentes de ligação cruzada mais empregados no preparo de polímeros biomiméticos.....	<b>37</b>
<b>Figura 8</b> – Representação das estruturas químicas da 3- aminopropiltrimetoxissilano (A) e do tetraetilortossilicato (B).....	<b>42</b>
<b>Figura 9</b> – Cromatograma obtido após extração em fase sólida C18, de solução aquosa fortificada com $400 \text{ ng mL}^{-1}$ dos analitos de interesse: 1) desipramina (padrão interno), 2) nortriptilina e 3) amitriptilina.....	<b>63</b>
<b>Figura 10</b> – Esquema da formação do polímero para a amitriptilina (AMI), usando-se o ácido metacrílico (AMA), etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN).....	<b>66</b>
<b>Figura 11</b> – Efeito do solvente de condicionamento do cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) na extração da amitriptilina (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).....	<b>70</b>
<b>Figura 12</b> – Efeito do pH da amostra na extração da amitriptilina de cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).....	<b>71</b>
<b>Figura 13</b> – Efeito do solvente de limpeza do cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) na extração da amitriptilina (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).....	<b>72</b>
<b>Figura 14</b> – Efeito do solvente de eluição na extração da amitriptilina de cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI)	

(em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).....73

**Figura 15** – Efeito do volume do solvente de eluição (metanol:ácido acético, 9:1) na extração da amitriptilina de cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE)...74

**Figura 16** – Esquema da formação do polímero para a amitriptilina (AMI), usando-se o 3-aminopropiltrimetoxissilano (ATPMS) e tetraetilortossilicato (TEOS).....76

**Figura 17** – Espectro de absorção infravermelho (KBr) do MIS e NIS. Bandas de absorção: (1)  $810\text{ cm}^{-1}$  (metil C-H), (2)  $1107\text{ cm}^{-1}$  (Si-O), (3)  $1273\text{ cm}^{-1}$  (N-H), (4)  $2969\text{ cm}^{-1}$  (metil C-H) e (5)  $3428\text{ cm}^{-1}$  (-OH).....77

**Figura 18** – Microscopia eletrônica de varredura da MIS–Amitriptilina.....78

**Figura 19** – Microscopia eletrônica de varredura MIS–Nortriptilina.....78

**Figura 20** – Microscopia eletrônica de varredura do NIS.....78

**Figura 21** – Efeito do pH da amostra na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos).....80

**Figura 22** - Efeito do pH da amostra na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).....80

**Figura 23** – Efeito do agente precipitante de proteínas do plasma na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos).....82

**Figura 24** – Efeito do agente precipitante de proteínas do plasma na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).....82

**Figura 25** – Efeito do solvente de eluição na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos).....83

**Figura 26** - Efeito do volume do solvente de eluição (etanol) na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos).....83

**Figura 27** - Efeito do solvente de eluição na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).....84

- Figura 28** - Efeito do volume do solvente de eluição (metanol:ácido acético, 9:1) na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).....**84**
- Figura 29** – Curva analítica para a amitriptilina (AMI), extraída em SPE octadecila.....**88**
- Figura 30** – Curva analítica para a nortriptilina (NOR) extraída em SPE octadecila.....**88**
- Figura 31** – Cromatogramas de amostra de plasma branco extraída por C18 (a), polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (b, MIS-AM) e polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde nortriptilina (c, MIS-NOR).....**92**
- Figura 32** – Cromatograma de amostra de plasma fortificado com 400 ng mL<sup>-1</sup> de desipramina (DESI), nortriptilina (NOR) e amitriptilina (AMI) extraída por C18 (a) e cromatogramas de amostra de plasma fortificado com 400 ng mL<sup>-1</sup> de NOR e AMI extraída por polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde AMI (b, MIS-AM) e polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde NOR (c, MISNOR).....**93**
- Quadro 1** – Parâmetros físico-químicos da amitriptilina (cloridrato) e nortriptilina (cloridrato).....**30**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Aplicação dos polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de fármacos presentes em material biológico.....**49**
- Tabela 2** – Parâmetros de conformidade do sistema (*System Suitability*).....**63**
- Tabela 3** – Fatores de impressão (razão da resposta MIS *versus* NIS) dos fármacos antidepressivos tricíclicos nos dois polímeros testados (MIS-AMI e MIS-NOR).....**86**
- Tabela 4** – Precisão intra-corrída e intercorridas para a análise de AMI e NOR por SPE C18 e CLAE.....**89**
- Tabela 5** – Recuperação (%) do método de análise de AMI e NOR por SPE C18.....**90**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADT** – antidepressivo tricíclico
- AMA** – ácido metacrílico
- AMI** – amitriptilina
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APTMS** – aminopropiltrimetoxisilano
- CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência
- CLOMI** – clomipramina
- CV** – coeficiente de variação
- DEA** – dietilamina
- DESI** – desipramina
- DOX** – doxepina
- EFS** – extração em fase sólida
- EGDMA** – etilenoglicoldimetacrilato
- ELL** – extração líquido-líquido
- IAE** – do inglês, Immuno Affinity Extraction, extração por imunoafinidade
- IMAO** – inibidores da monoaminoxidase
- IMI** – imipramina
- LPME** – do inglês, liquid-phase microextraction - microextração líquido-líquido
- LQ** – limite de quantificação
- MIP** – do inglês, molecularly imprinted polymer, polímero de impressão molecular
- MIS** – do inglês, molecularly imprinted sílica, sílica impressa molecularmente
- MISPE** – do inglês, molecularly imprinted polymer– solid-phase extraction, polímero de impressão molecular na extração em fase sólida
- NIP** – do inglês, non-imprinted polymer, polímero não impresso
- NIS** – do inglês, non-imprinted sílica, sílica não impressa
- NOR** – nortriptilina
- PROT** – protriptilina
- SBSE** – do inglês, stir bar sorptive extraction, extração sortiva em barras de agitação
- SPE** – do inglês, solid-phase extraction - extração em fase sólida
- SPME** – do inglês, solid-phase microextraction - microextração em fase sólida

**SUS** – Sistema Único de Saúde

**TEOS** – tetraetilortosilicato

**UV** – ultravioleta

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

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Antidepressivos tricíclicos: amitriptilina e nortriptilina</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Polímeros de impressão molecular</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Extração em fase sólida (SPE)</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Polímeros de impressão molecular na extração em fase sólida (MISPE)</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b>	<b>51</b>
4.1.1	Reagentes e solventes	51
4.1.2	Equipamentos e acessórios	51
4.1.3	Soluções-padrão	52
4.1.4	Amostras biológicas	52
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b>	<b>53</b>
4.2.1	Condições cromatográficas	53
4.2.2	Polímeros de impressão molecular usando o ácido metacrílico (AMA) como monômero	54
4.2.2.1	Síntese do polímero	54
4.2.2.2	Dessorção da molécula molde do polímero	54
4.2.2.3	Otimização do desempenho do MISPE- IMI	55
4.2.3	Polímeros de impressão molecular usando o 3-aminopropil - trimetoxisilano (APTMS) como monômero	56
4.2.3.1	Síntese do polímero	56
4.2.3.2	Dessorção da molécula molde do polímero	57
4.2.3.3	Caracterização dos polímeros	57
4.2.3.4	Otimização do desempenho do MISPE	57
4.2.3.5	Seletividade do MIS	59
4.2.4	Extração em fase sólida octadecila	59
4.2.4.1	Parâmetros de validação avaliados	60
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Condições cromatográficas</b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>Polímeros de ácido metacrílico</b>	<b>65</b>
5.2.1	Síntese dos polímeros de ácido metacrílico (AMA)	65
5.2.2	Dessorção da molécula molde	68
5.2.3	Otimização do desempenho da MISPE-IMI	70
<b>5.3</b>	<b>Polímeros de 3-aminopropiltrimetoxisolano</b>	<b>74</b>
5.3.1	Síntese dos ormosils	75
5.3.2	Dessorção da molécula molde	76
5.3.3	Caracterização dos polímeros	77
5.3.4	Otimização do desempenho do MISPE	79

5.3.5	Seletividade dos polímeros	85
<b>5.4</b>	<b>Extração em fase sólida octadecila</b>	<b>87</b>
5.4.1	Linearidade	87
5.4.2	Precisão	89
5.4.3	Limite de quantificação	89
5.4.4	Recuperação	89
<b>5.5</b>	<b>Perfis cromatográficos</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>109</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de investigação e rastreamento de fármacos em amostras biológicas é importante para o desenvolvimento de fármacos novos, para avaliar possíveis interações medicamentosas e reações adversas. Também é fundamental na determinação de parâmetros farmacocinéticos utilizados na otimização da terapia, destacando-se ainda a aplicabilidade em estudos toxicológicos e em análises forenses. A análise de fármacos e/ou de seus metabólitos em material biológico auxilia o diagnóstico e o monitoramento da evolução de determinada doença, e na resposta clínica do paciente ao tratamento, permitindo melhorar esta resposta e diminuir a morbidade (PRESKORN; FAST, 1991).

A utilidade da monitorização da concentração de um fármaco no sangue é baseada na premissa de que a resposta farmacológica é melhor correlacionada com a concentração do fármaco no local de ação (receptor) de que com a dose ingerida. Entretanto, como a medida da concentração do fármaco no receptor, em pacientes, é tecnicamente impraticável, a estreita correlação entre a concentração de alguns fármacos no sangue e o efeito farmacológico observado, permite que análises neste material sejam utilizadas na monitorização terapêutica do paciente. Deve-se, não obstante, ter em mente que a concentração de um fármaco no sangue não é necessariamente igual à concentração no receptor, podendo simplesmente refleti-la (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

Com o emprego sistemático da monitorização terapêutica podem ser minimizadas as variações que ocorrem nas concentrações plasmáticas dos fármacos e reduzidos seus efeitos adversos; também é útil para avaliar a adesão do paciente ao tratamento (STEIMER et al., 2001).

Dentre os fármacos para os quais se recomenda a monitorização terapêutica estão os antidepressivos, que são usados no tratamento de pacientes mentalmente deprimidos. São úteis em depressões e sintomas depressivos e, até certo ponto, no tratamento de fases depressivas de determinados tipos de esquizofrenia (KOROLKOVAS; FRANÇA; CUNHA, 2001).

Apesar de existirem atualmente varias classes de antidepressivos, os tricíclicos (ADT), primeiros a serem introduzidos na terapêutica na década de 50,

ainda são bastante utilizados (DELUCIA et al., 2007), e, no Brasil, principalmente por sua distribuição pelo governo através do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2007).

Os ADT constituem uma classe de fármacos que preenche os critérios necessários para que seja recomendado a sua monitorização, pois apresentam ampla variação interindividual na farmacocinética, estreita faixa terapêutica, presença de metabólitos ativos e uma pobre correlação entre a dose administrada e a resposta terapêutica (STEIMER et al., 2001).

O desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos, desde preparo de amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse, permite a obtenção de dados confiáveis para acompanhamento clínico no uso de determinado fármaco.

O processo analítico é dividido em cinco etapas: amostragem, preparação da amostra, separação, detecção e análise dos dados (KATAOKA, 2003). Mais de que 80% do tempo da análise pode ser gasto com amostragem e preparação da amostra. Além do mais, a qualidade dessas etapas é fator chave na determinação do sucesso da análise de matrizes complexas, tais como amostras biológicas, sendo que a escolha do método de preparação da amostra influencia na confiabilidade e exatidão da análise. Em geral, é nessa etapa que se cometem mais erros e que se gasta mais tempo. É também a etapa de maior custo. Assim, os passos de um procedimento de pré-tratamento de amostra deverão ser sempre considerados cuidadosamente (KRUG, 1998).

As técnicas de extração ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada em um tempo razoável de análise (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

As principais técnicas aplicadas na preparação de amostras biológicas para a análise cromatográfica de fármacos são: a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (SPE). Técnicas miniaturizadas como a microextração líquido-líquido (LPME) e a microextração em fase sólida (SPME), além da extração sortiva em barras de agitação (SBSE) têm sido introduzidas nos últimos anos com esta finalidade.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresenta sensibilidade e seletividade adequadas para a aplicação clínica, sendo a técnica de escolha para análise de fármacos em material biológico. Na monitorização terapêutica a quantidade de amostra disponível para a análise é pequena (1-5 mL de sangue) e os fármacos estão geralmente presentes em baixas quantidades (ng ou  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Portanto, são necessárias técnicas de preparo de amostra adequadas antes da identificação cromatográfica (LEKE et al., 2004).

Novas tendências na preparação de amostras para análises clínica e farmacêutica abordam o reconhecimento molecular. A extração baseada em imunoafinidade (IAE) e polímeros de impressão molecular (MIP) são métodos seletivos aplicados na SPE e na SPME. A partir desses materiais é possível remover o analito de interesse da amostra eliminando a maioria dos interferentes, tais como, proteínas, sais, ácidos, bases e outros compostos orgânicos com propriedades similares aos analitos (LAVIGNAC; ALLENDER; BRAIN, 2004).

Este trabalho foi desenvolvido visando explorar o potencial de seletividade dos MIP no preparo de amostra de plasma por extração em fase sólida para análise de amitriptilina e nortriptilina.

## 2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um polímero de impressão molecular para uso no preparo de amostras por extração em fase sólida (MISPE), na determinação cromatográfica de amitriptilina e nortriptilina em plasma, visando sua aplicação na monitorização terapêutica de pacientes.

Os objetivos específicos foram:

- otimizar as condições cromatográficas para análise de AMI e NOR pelo estudo das variáveis: fase móvel e sua vazão, comprimento de onda, tipo de coluna e padrão interno;
- sintetizar polímero de impressão molecular (MIP) e polímero não impresso (NIP), usando como molécula molde os analitos ou substância química similar, bem como fazer suas caracterizações química e morfológica;
- estudar o melhor processo de dessorção dos moldes: solvente, pH e técnica, monitorando a presença do remanescente através da CLAE;
- otimizar as condições de uso do polímero de impressão molecular como sorvente na extração em fase sólida, pelo estudo das etapas dessa técnica: condicionamento, carregamento, lavagem e eluição;
- revalidar método de extração por SPE C18 para fins de comparação de resultados com a MISPE;
- avaliar a potencialidade da aplicação da técnica de extração em fase sólida com polímero de impressão molecular para a análise cromatográfica de AMI e NOR em plasma.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Antidepressivos tricíclicos: amitriptilina e nortriptilina

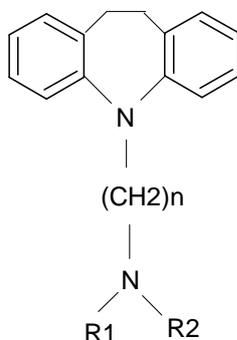
Os antidepressivos podem ser classificados segundo seu mecanismo de ação, nas seguintes classes: a) tricíclicos (ADT), com ação predominante na recaptação da 5-hidroxitriptamina (ex. amitriptilina) ou da norepinefrina (ex. nortriptilina); b) inibidores da monoaminoxidase (IMAO) não seletivos e irreversíveis (ex. fenelzina) e seletivos e reversíveis (ex. moclobemida); c) inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ex. fluoxetina); d) inibidores seletivos da recaptação da norepinefrina (ex. reboxetina); e) inibidores seletivos da recaptação da serotonina e da norepinefrina (ex. venflaxina); f) inibidores de recaptação de serotonina e antagonistas de adrenoceptores  $\alpha_2$  (ex. nefaxodona); g) inibidores seletivos da recaptação de dopamina (ex. bupropiona); h) antagonistas de adrenoceptores  $\alpha_2$  (ex. mirtazapina) (GORESTEIN; SCAVONE, 2007).

Pertencem à classe dos ADT: a amitriptilina (AMI), a imipramina (IMI), a doxepina (DOX) e a clomipramina (CLOMI) que são conhecidas como aminas terciárias devido à presença de dois grupamentos metílicos ligados ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral. Outros ADT como desipramina (DESI), nortriptilina (NOR) e protriptilina (PROT) são conhecidos como aminas secundárias devido a um átomo de hidrogênio em substituição ao grupo metílico na cadeia lateral (TORRE et al., 2001).

Essa classe de fármacos apresenta em sua estrutura química comum três anéis, sendo o anel central com sete ou oito átomos de carbono, uma cadeia lateral e um grupo amina terminal (FIGURA 1).

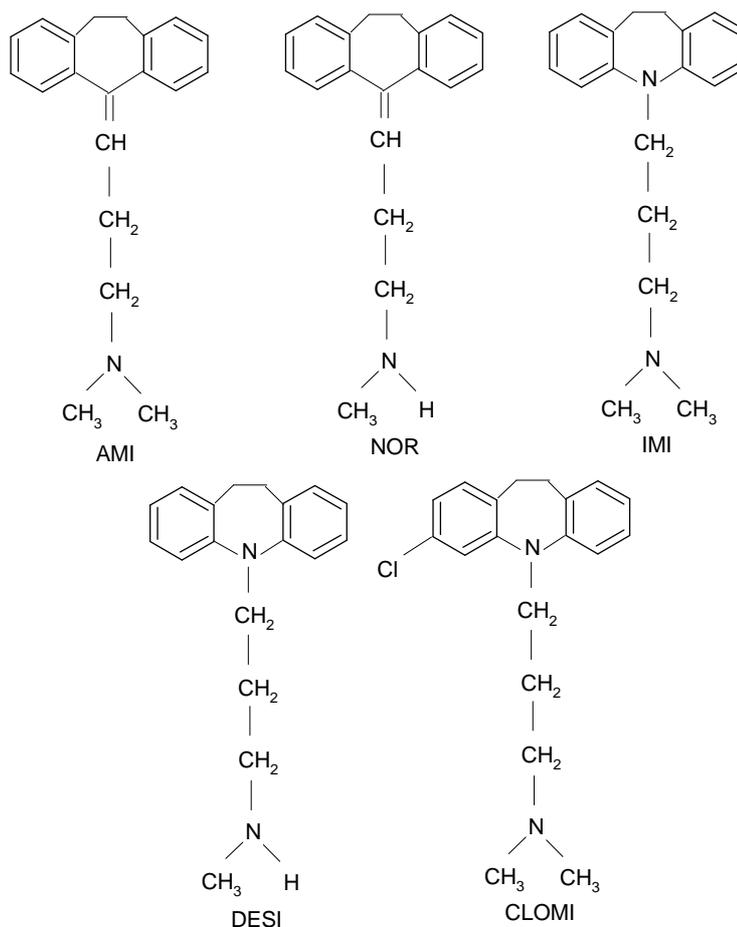
O antidepressivos tricíclicos começaram a ser utilizados em 1950 no tratamento da esquizofrenia como fármacos neurolépticos, porém não foram capazes de reverter consideravelmente os sintomas clínicos desta patologia. Posteriormente demonstrou-se que a imipramina, o primeiro ADT a ser sintetizado, aliviava sintomas depressivos, o que levou ao estudo de outros fármacos estruturalmente semelhantes para o tratamento de distúrbios depressivos que

tivessem ação mais rápida e eficaz, tendo sido introduzidos a amitriptilina, a desipramina e a nortriptilina (FULLER; ORSULAK, 1999; GORESTEIN; SCAVONE, 2007; RANG et al., 2004).



**Figura 1** - Estrutura química geral dos antidepressivos tricíclicos

A Figura 2, mostra a estrutura química dos ADT usados nesta pesquisa.



**Figura 2** - Fórmula estrutural plana da amitriptilina (AMI), nortriptilina (NOR), imipramina (IMI), desipramina (DESI) e clomipramina (CLOMI).

Os compostos tricíclicos são os mais usados para o tratamento de pacientes deprimidos. Reduzem a preocupação mórbida em 60% a 70% dos pacientes com depressão maior (KOROLKOVAS; FRANÇA; CUNHA, 2001).

Sabe-se que estes fármacos atuam bloqueando a recaptção de neurotransmissores, principalmente a da norepinefrina e da serotonina, e em menor grau, de dopamina, resultando no aumento das concentrações dessas substâncias no sistema nervoso central (FULLER; ORSULAK, 1999; GELENBERG; BASSUK; SCHOONOVER, 1991; LINDER; KECK, 1998; TONEY; ERESHEFKY, 1995). Os ADT derivados de amina terciária são inibidores mais potentes da recaptção da serotonina (p. ex., clomipramina) e os derivados de amina secundária atuam principalmente sobre a recaptção da norepinefrina (p. ex., nortriptilina) (GORESTEIN; SCAVONE, 2007).

As doses diárias de AMI administradas a pacientes variam entre 25 e 300 mg dia<sup>-1</sup> (usualmente de 100 a 200 mg dia<sup>-1</sup>) e as de NOR entre 25 e 250 mg dia<sup>-1</sup> (usualmente de 75 a 150 mg dia<sup>-1</sup>). As faixas de concentrações plasmáticas dos fármacos, relacionados à eficácia terapêutica (faixa ou janela terapêutica) são de 100-250 ng mL<sup>-1</sup> para a AMI e 60-150 ng mL<sup>-1</sup> para a NOR (BALDESSARINI, 2006).

Os efeitos adversos dos ADT são consequência da ligação desses fármacos nos receptores colinérgicos, histamínicos e  $\alpha$ -1-adrenérgicos. A atividade anticolinérgica causa uma série de sintomas, tais como: xerostomia, visão turva, constipação, retenção urinária, diminuição da sudorese e perda da memória recente (GELENBERG; BASSUK; SCHOONOVER, 1991; LINDER; KECK, 1998; TONEY; ERESHEFKY, 1995). Cardiotoxicidade e neurotoxicidade têm sido relatados para concentrações cinco vezes a concentração plasmática terapêutica. O início dos efeitos tóxicos pode ser esperado em concentrações plasmáticas acima de 0,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e teores acima de 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> podem ser fatais (BALDESSARINI, 2006). A toxicidade dos ADT depende de fatores como idade do paciente, dose ingerida e tolerância. Alguns pacientes podem manifestar toxicidade quando são administradas doses terapêuticas, resultado de maior sensibilidade aos fármacos antidepressivos ou de uma interação medicamentosa (GELENBERG; BASSUK; SCHOONOVER, 1991).

Algumas das características físico-químicas do cloridrato de amitriptilina e de nortriptilina, analitos de interesse neste estudo, são mostradas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Parâmetros físico-químicos da amitriptilina (cloridrato) e da nortriptilina (cloridrato)

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição - AMI</b>	<b>Descrição - NOR</b>
Fórmula molecular	$C_{20}H_{23}N.HCl$ (United States Pharmacopeia -USP- 30, 2007)	$C_{19}H_{21}N.HCl$ (United States Pharmacopeia -USP- 30, 2007)
Peso molecular	313,86 (USP 30, 2007)	299,84 (USP 30, 2007)
CAS	549-18-8 (MARTINDALE, 2002)	894-71-3 (MARTINDALE, 2002)
Descrição	Pó cristalino ou pequenos cristais, branco ou praticamente branco, inodoro ou praticamente inodoro (MARTINDALE, 2002)	Pó branco ou praticamente branco (MARTINDALE, 2002)
Solubilidade	Amplamente solúvel em água, em álcool, em clorofórmio e álcool metílico; insolúvel em éter (MARTINDALE, 2002)	Fracamente solúvel em água, solúvel em álcool e diclorometano (MARTINDALE, 2002)
pH	Entre 5,0 e 6,0 da solução a 1% (USP 30, 2007)	Entre 2,5 e 4,0 da solução a 1% (USP 30, 2007)
pKa	9,42 (SCIFINDER, 2006)	9,73 (SCIFINDER, 2006)
Ponto de fusão	Entre 195° e 199° C (USP 30, 2007)	Entre 215° e 220° C (USP 30, 2007)
Perda por dessecação	A perda não é maior que 0,5% do peso inicial quando secado sob pressão não excedendo 5 mmHg a 60° C constantes (USP 30, 2007)	A perda não é maior que 0,5% do peso inicial após secagem a 105°C por 3h (USP 30, 2007)
Doseamento	Contém não menos que 98% e não mais que 102% de $C_{20}H_{23}N.HCl$ , calculado sobre a base seca (USP 30, 2007)	Contém não menos que 97% e não mais que 101,5% de $C_{19}H_{21}N.HCl$ , calculado sobre a base seca (USP 30, 2007)

A AMI é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal; a ligação às proteínas é em torno de 95%; é parcialmente desmetilada por eliminação pré-sistêmica no fígado, originando o metabólito ativo, a NOR; tanto o fármaco íntegro quanto seu metabólito são distribuídos por todo o organismo e extensivamente ligados às proteínas plasmáticas e teciduais; a meia-vida média da AMI é de 15,1 h (10,3 a 25,3 h), e a da NOR 26,6 h (16,5 a 35,7 h); o início de ação é lento, durando de 1 a 3 semanas; o volume de distribuição é de 12 a 18 L kg<sup>-1</sup> e é eliminada lentamente, sobretudo pela urina (KOROLKOVAS; FRANÇA; CUNHA, 2001).

Os ADT são biotransformados no fígado por duas vias, a saber, *N-desmetilação*, quando as aminas terciárias são convertidas em aminas secundárias (p.ex., imipramina em desmetilimipramina, AMI em NOR) e *hidroxilação* do anel. Os metabólitos desmetilados e hidroxilados geralmente têm atividade biológica. Durante o tratamento prolongado com ADT a concentração plasmática destes metabólitos é habitualmente comparável com a do fármaco precursor, embora seja observada ampla variação entre os indivíduos. A inativação dos fármacos ocorre por glicuroconjugação dos metabólitos hidroxilados, sendo os glicuronídeos excretados na urina (RANG et al., 2004).

Várias isoenzimas CYP – como CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2 e outras – biotransformam os ADT (TRIPATHI, 2006). A Figura 3 denota a biotransformação da amitriptilina.

A análise laboratorial dos ADT tornou-se comum, sendo esta classe frequentemente encontrada em amostras clínicas e, em forenses, associada à superdosagem.

Os ADT podem ser mensurados por uma série de métodos analíticos, sendo os cromatográficos os mais utilizados (TONEY; ERESHEFKY, 1995). O método de escolha deve ser capaz de determinar simultaneamente a AMI e seu metabólito ativo, a NOR (LEKE et. al., 2004). O preparo de amostras mais usado nas análises rotineiras é a SPE em cartucho octadecila e a extração líquido-líquido.

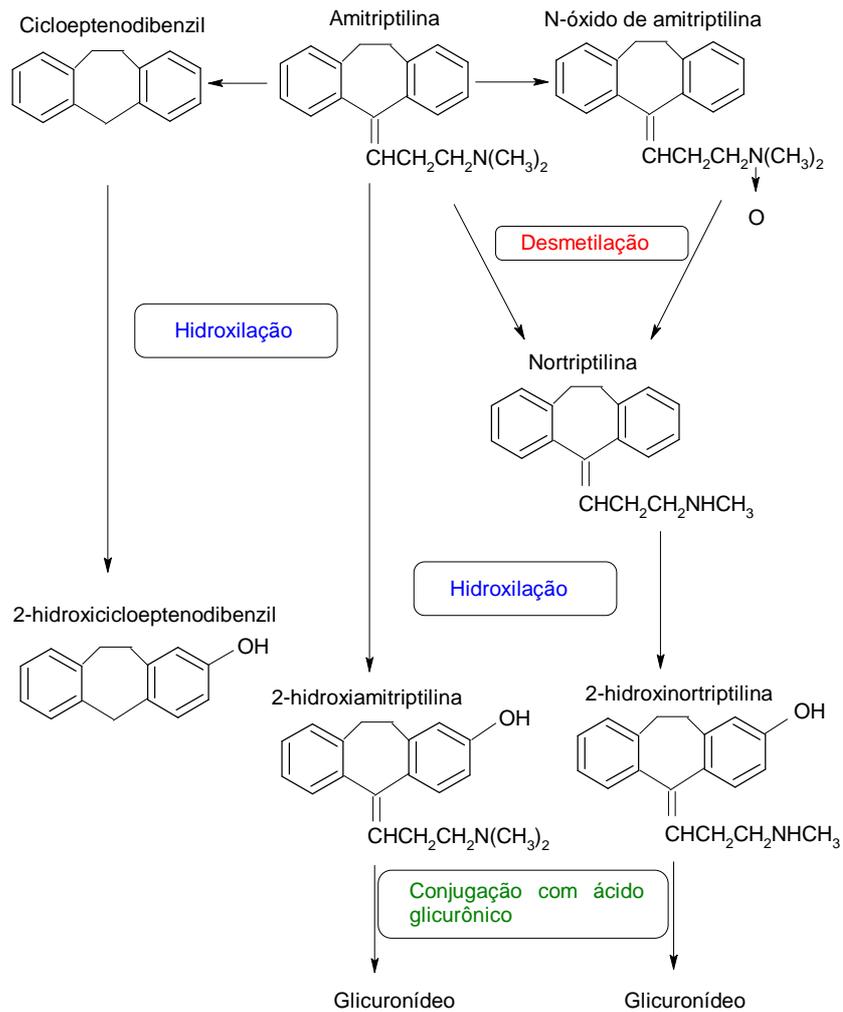


Figura 3 - Biotransformação da amitriptilina (adaptado de RANG et al., 2004).

### 3.2 Polímeros de impressão molecular

A biomimetização de interações bioquímicas é um dos maiores desafios em várias áreas da ciência. A partir deste ponto de vista, polímeros sintéticos com impressão molecular, mais conhecidos como MIP (do inglês, *molecularly imprinted polymer*), têm atraído considerável atenção na última década, pois aparecem como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de sistemas com reconhecimento biomimético semelhante aos sistemas específicos enzimas-substratos ou antígeno-anticorpo (VERLI; BARREIRO, 2005).

As vantagens dos polímeros impressos em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) incluem fácil preparo, baixo custo, possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço e, resistência a ambientes diversos, nos quais biomoléculas naturais não resistiriam (HAUPT; MOSBACH, 1999; PILETSKY; ALCOCK; TURNER, 2001).

Em 1972, Wulff e Sarhan descreveram o primeiro trabalho em química analítica empregando MIP para separação enantiomérica de racematos de açúcares. Os MIP são obtidos através da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos (ANDERSSON, 2000a; SELLERGREN, 1999). A estratégia da impressão molecular permite a manipulação seletiva do formato, tamanho e grupos funcionais da matriz polimérica por meio da molécula molde.

Os materiais de impressão molecular têm capacidade de reconhecimento molecular e são estáveis suficientemente para armazenagem a longo prazo. Assim, eles podem ser considerados como o novo meio artificial de afinidade (KATAOKA, 2003). O potencial do uso destes tipos de materiais é alto, uma vez que oferecem resistência mecânica à alta temperatura e à pressão e são inertes frente a condições extremas de ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos. Estas características são altamente favoráveis à sua utilização em análises de rotina (QIAO et al., 2006).

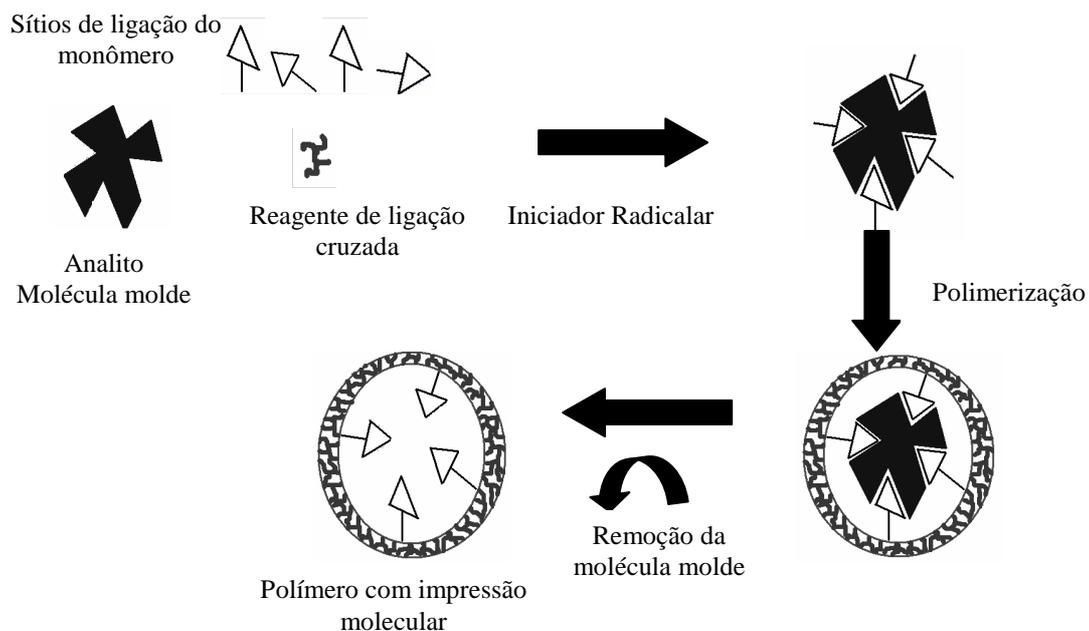
Estes sorventes são materiais poliméricos sintéticos que possuem cavidades específicas desenhadas para uma molécula molde envolvendo um mecanismo de retenção baseado no reconhecimento molecular. Os MIP têm sido aplicados com sucesso em várias áreas, tais como sensores, síntese orgânica e separação de enantiômeros (PICHON, 2007).

Os sítios de reconhecimento são obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor das moléculas do analito. Assim são formados complexos, por meio de interação molecular, entre o analito e o monômero precursor. Os complexos são fixados através de reações de entrecruzamento de polímeros. A remoção do analito da matriz polimérica, forma lacunas (sítios de reconhecimento) que irão exibir afinidade pelo analito (ANDERSSON; PAPRICA; ARVIDSSON, 1997; WALSH et al., 1997).

Para a construção dos MIP, uma molécula utilizada como molde interage por meio de ligação covalente ou não com as moléculas do monômero. Posteriormente, é adicionado ao meio um agente reacional que promove ligações cruzadas no monômero a fim de formar uma matriz polimérica rígida. A reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar. Por fim, a molécula molde é removida da matriz polimérica por meio de solvente, ou quando necessário, por meio de clivagem química se a molécula estabelecer ligação covalente com o monômero (MASQUÉ et al., 2000; MAYES; MOSBACH, 1997; YE; MOSBACH, 2001) (FIGURA 4).

Após a polimerização, as moléculas molde são removidas por etapas de lavagens extensivas para romper as interações entre moléculas molde e monômeros tornando disponíveis os sítios ligantes, isto é, cavidades complementares ao molde em tamanho, formato e posição dos grupos funcionais. A completa remoção da molécula molde do MIP é difícil de ser alcançada necessitando de lavagens em condições ácidas ou básicas com vários solventes orgânicos (PICHON, 2007).

Na impressão não-covalente, as interações envolvidas são fracas, portanto, o candidato à molécula molde deve possuir múltiplos sítios funcionais a fim de aumentar a força de ligação molécula molde-monômero funcional (PICHON, 2007).



**Figura 4** - Esquema do processo de síntese de polímeros biomiméticos (adaptado de ANDERSSON, 2000a).

O primeiro passo para a síntese dos MIP consiste em estabelecer criteriosamente a escolha do monômero e do analito. O analito necessita conter em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir com os monômeros, a fim de formar uma espécie de complexo estável. A interação analito-monômero pode se dar por meio de ligação covalente ou não covalente, por meio de ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou por interação hidrofóbica (AL-KINDY et al., 2000). A natureza da interação depende dos reagentes envolvidos na síntese do MIP (PICHON, 2007).

Por outro lado, tem sido discutido o papel do formato da cavidade na seletividade do polímero formado, como um importante fator com relação a ligações de grupos funcionais. Simon, Collins e Spivak (2007) desenvolveram um estudo para investigar a influência da seletividade do formato versus pré-organização de grupos funcionais sobre o reconhecimento molecular dos MIP, usando vários derivados de aminoácidos como moldes. Os autores observaram que no MIP onde a molécula molde apresenta um ou dois pontos de interação com o monômero funcional, o mecanismo dominante para o efeito de impressão era a seletividade do formato. Ao contrário, o desempenho de MIP com três ou mais interações com o monômero funcional era definido pela pré-organização de grupos funcionais. Os autores concluíram também que estes dois efeitos não trabalham na mesma direção na impressão molecular ou no re-ligamento do analito, mas que, de fato, parece existir competição entre eles, resultando em diminuição do desempenho do polímero, e que maior seletividade é normalmente encontrada para moléculas molde onde o modo predominante de reconhecimento molecular é a seletividade do formato da cavidade.

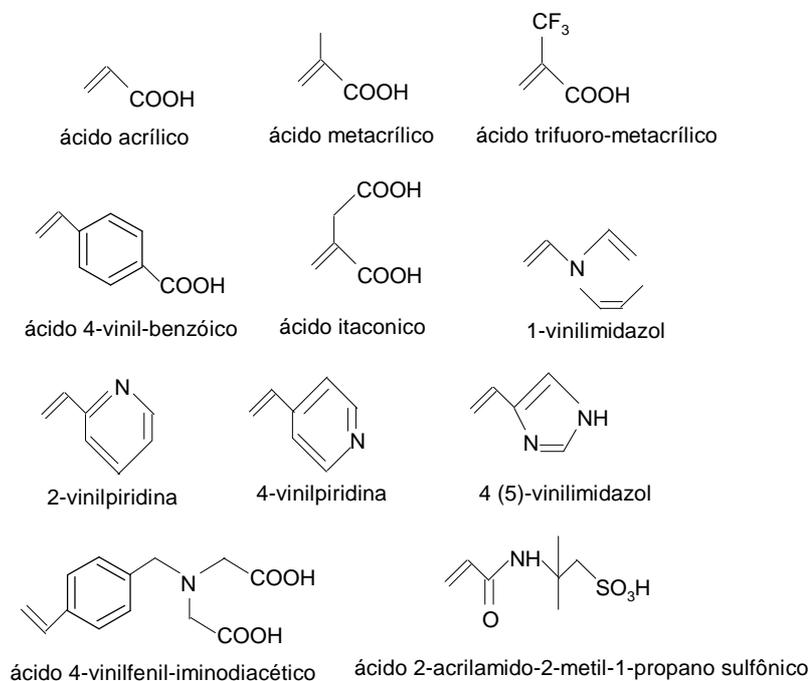
Outro importante parâmetro que influencia a estabilidade da formação do complexo “analito-monômero” é o solvente. Este, além de fornecer um meio onde analitos e monômeros sejam solúveis, não deve interferir na interação analito-monômero (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a), e como determina a porosidade das partículas, recebe o nome de solvente porogênico.

A natureza polar de interações, tais como ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas, entre molécula molde e monômero explica a dificuldade de aplicação do MIP em amostras aquosas (PICHON, 2007). As moléculas de água do meio podem impedir, através de um efeito competitivo, a retenção dos analitos na cavidade do MIP.

É válido lembrar que o reconhecimento molecular de um MIP ocorre preferencialmente no mesmo meio reacional no qual foi sintetizado. Isto significa que a extração e/ou pré-concentração direta de amostras aquosas num MIP preparado em solvente apolar exibirá seletividade menos pronunciada pela espécie de interesse (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

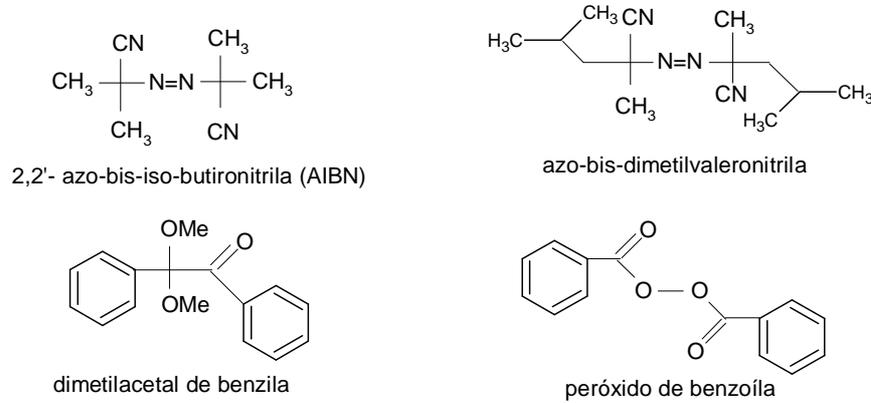
Para que os MIP apresentem características desejáveis no tocante à seletividade, é fundamental que haja um estudo apurado do tipo ou diferentes composições de solventes durante a síntese (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

Na Figura 5 são mostrados os monômeros mais empregados para o preparo dos MIP. Destes, o ácido metacrílico (AMA) tem sido o monômero mais utilizado; no entanto, como já mencionado, deve-se salientar que a escolha deste é ditada pela natureza do analito. Assim sendo, analitos que possuem grupos básicos interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, como o AMA. Em contrapartida, monômeros com caráter básico como o 4-vinilpiridina interagem preferencialmente com analitos ácidos (ANDERSSON; SELLERGEN; MOSBACH, 1984; MARTÍN-ESTEBAN, 2001).



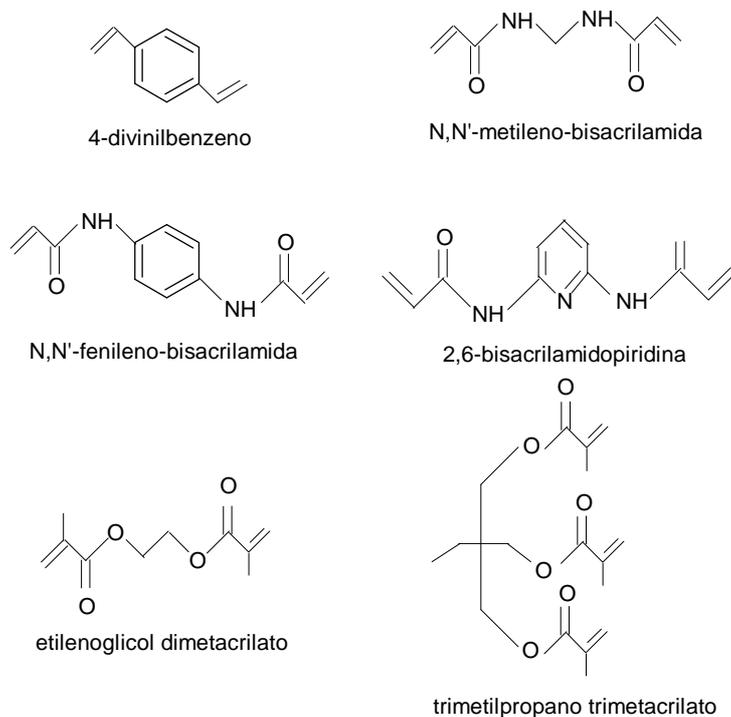
**Figura 5** - Monômeros mais empregados no preparo de polímeros biomiméticos

O iniciador radicalar 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) é o mais empregado na síntese dos MIP, mas outros também podem ser utilizados (CORMACK; ELORZA, 2004) (FIGURA 6).



**Figura 6** - Iniciadores radiculares mais empregados no preparo de polímeros biomiméticos

O etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) tem sido o reagente de ligação cruzada mais utilizado, pois promove a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa. Outros reagentes de ligação cruzada têm sido investigados (FIGURA 7), mas apenas o trimetilpropano trimetacrilato tem apresentado resultados similares ou melhores que o EGDMA (KEMPE, 1996; NAVARRO-VILLOSLADA, 2004).



**Figura 7** - Reagentes de ligação cruzada mais empregados no preparo de polímeros biomiméticos

Os MIP são preparados convencionalmente pelo método conhecido por polimerização em “bulk”, onde a reação é realizada em sistema homogêneo. Esta reação é conduzida em frascos selados contendo monômero, analito, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigênio sob fluxo de N<sub>2</sub> ou Ar e induzida com aquecimento ou radiação UV. O oxigênio deve ser eliminado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar (CORMACK; ELORZA, 2004). Por fim, o sólido polimérico resultante é moído, peneirado e submetido a uma lavagem com solvente para extração do analito, visando seu uso posterior (MASQUÉ; MARCÉ; BORRULL, 1998; PRASAD; BANERJEE, 2002).

Muitos relatos sobre polímeros de impressão molecular indicam o método de preparação em “bulk” devido à própria simplicidade do método. O monólito do polímero obtido é triturado e peneirado para se obter partículas principalmente entre 25-50 µm. A próxima etapa consiste na sedimentação para remoção de partículas finas. O método em “bulk” é de fácil preparação, mas consome tempo, é de trabalho intenso e dispendioso, pois somente 30-40% das partículas do polímero são recuperadas como material usável. Além do mais, o formato e tamanho irregular das partículas obtidas pela polimerização em “bulk”, pode causar picos assimétricos largos quando acoplado “on-line” à cromatografia líquida (PICHON, 2007). Por isso polímeros preparados por este processo não são adequados para empacotar colunas cromatográficas.

O método de polimerização por suspensão é o mais simples e comum para produção de MIP com partículas de tamanho uniforme. Nesta técnica, a reação polimérica ocorre dentro das gotas do monômero suspensos normalmente em água. Esta reação é conduzida quando monômero, analito, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar são solubilizados em solvente orgânico apolar e posteriormente adicionados em água. O sistema é mantido homogêneo pela adição de um agente dispersante, como perfluorocarbono, que previne a separação de fases. O meio reacional é aquecido e mantido sob agitação. O polímero obtido é separado da fase aquosa apresentando formato esférico de 5 a 50 µm de tamanho. Dada a uniformidade de tamanho e formato das partículas alguns trabalhos têm sido desenvolvidos empregando-se a polimerização por suspensão em métodos de separação cromatográfica “on-line”, obtendo-se um empacotamento uniforme da

coluna o que resultaria em eficiência no formato dos picos cromatográficos. A desvantagem do método é que a água é incompatível com muitos procedimentos de impressão não-covalente, o que implicaria na obtenção de um polímero com baixo reconhecimento molecular (HE et al., 2007; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

Outro método descrito é a polimerização por precipitação, método análogo à polimerização em “bulk”, com a diferença no volume de solvente aplicado, cerca de 5 vezes superior a este. O nome deste método é atribuído à formação, ao longo do processo, do polímero que, insolúvel ao meio, tende a precipitar, sendo as partículas do MIP recolhidas através de centrifugação. As vantagens deste método são bom rendimento e não utilização de agente dispersante. Os MIP obtidos também apresentam partículas com tamanho uniforme semelhantes ao método por suspensão, porém com tamanho reduzido (normalmente  $\leq 1 \mu\text{m}$ ), tornando inviável a aplicação destes materiais como fase estacionária em CLAE, o que implicaria em condições cromatográficas extremas no parâmetro pressão no interior da coluna. (HE et al., 2007; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

O método de polimerização por expansão em multi-etapas é uma alternativa aos acima descritos devido à viabilidade de obtenção de polímeros com tamanhos e poros regulares e maiores. Monômero e solvente passam por uma etapa de expansão sobre um polímero com diâmetro bem definido, normalmente poliestireno com diâmetro de  $1 \mu\text{m}$ , antes da polimerização do MIP. Dessa forma, as partículas poliméricas serão responsáveis pela formação de partículas regulares e de tamanho reduzido, diferente dos métodos anteriores, nos quais isto é atribuído ao solvente do meio. A desvantagem é que o método é mais trabalhoso comparando-o aos demais descritos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a).

A escolha do método de síntese dos polímeros de impressão molecular será influenciada pelas características de cada um deles em função da aplicação pretendida para o MIP nas diferentes áreas químicas.

Desde a publicação do primeiro trabalho anunciando o emprego de polímeros com sítios seletivos, em 1972, vários outros vêm sendo explorados, a saber: emprego dos MIP em técnicas de separação, como CLAE, eletroforese capilar, eletrocromatografia capilar e cromatografia em camada delgada, em extração em fase sólida e microextração em fase sólida, (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a). Os MIP têm apresentado real potencial também como receptores

biomiméticos para aplicações em ensaios de fluoroafinidade, radioafinidade e para o desenvolvimento de sensores químicos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005b).

De acordo com Matsui et al. (1997), a maioria dos meios de impressão molecular são baseados no uso de polímeros tipo acrílicos ou acrilatos orgânicos. A limitação severa deste tipo de impressão é o requerimento de solvente orgânico no qual todas as espécies sejam solúveis; assim, moléculas molde que são solúveis somente em fase aquosa, geralmente não são susceptíveis à impressão desta maneira, o que representaria uma limitação dos MIP para aplicações ambientais e biológicas (CUMMINS; DUGGAN; MCLOUGHLIN, 2005).

Materiais híbridos orgânico-inorgânico baseados em sílica organicamente modificada (ormosils), podem ser uma alternativa aos MIP acrílicos como sorventes para extração em fase sólida. Os ormosils são materiais promissores em análises químicas devido à boa estabilidade mecânica e química que apresentam e à facilidade na qual podem ser preparados e modificados (WEN; WILKES, 1996).

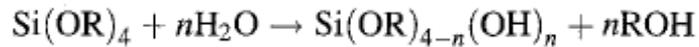
MIS (sílicas de impressão molecular) são preparadas por hidrólise controlada de grupos aquil silanóxidos através da rota sintética sol-gel descrita inicialmente por Brinker e Scherer (1989), que envolve a transição do sistema de sol líquido para fase gel sólida. A impressão sol-gel forma polímeros através da hidrólise e condensação de monômeros silanos por catálise ácida ou básica.

Collinson (1998) descreve a química do processo de formação dos ormosils. Nestes materiais, a rede de silicato é sintetizada através de precursores alcóxido contendo ligações Si-C não hidrolizáveis, isto é,  $R_{4-x}Si(OR)_x$ , onde R representa o grupo funcional e  $x = 1 - 4$ . Grupos funcionais específicos que têm sido comumente usados incluem  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_6H_5$ ,  $(CH_2)_nNH_2$ ,  $(CH_2)_nSH$ . Os monômeros envolvidos na síntese dos ormosils são conhecidos por precursores organosiliconados.

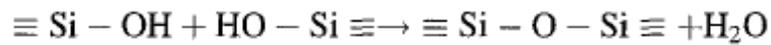
Durante a transformação sol-gel, a viscosidade da solução aumenta gradualmente de sol (suspensão coloidal com partículas muito pequenas, 1-100 nm) tornando-se uma rede interconectada rígida e porosa, o gel. Através da hidrólise e condensação cuidadosamente controladas, a rede organicamente modificada pode se apresentar distribuída homoganeamente por toda matriz inorgânica (COLLINSON, 1998).

A polimerização pode ser dividida em duas partes:

- 1) hidrólise de grupos alcóxidos para formar grupos silanóis reativos

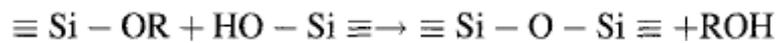


- 2) condensação de grupos silanóis inicialmente formando o sol e finalmente o gel



Condensação em água

ou



Condensação em álcool

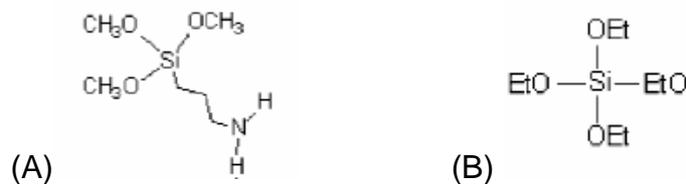
Segundo Collinson (1998) as propriedades físicas do gel seco de ormosil formado, como distribuição e média de tamanho de poro e área de superfície, dependem fortemente de parâmetros do processo sol-gel. A razão água/silano, a natureza e concentração do catalisador e os precursores alcóxidos, são parâmetros que afetam fortemente a hidrólise e condensação, as quais ditam as propriedades do material final. No geral, baixos valores de pH e de quantidade de água, fornecem materiais densos com pequeno tamanho de poro, já valores altos de pH e de água, fornecem materiais mais porosos. A natureza do catalisador afeta amplamente a taxa de substituição de grupos alquila e a hidrólise. A reação sob condições ácidas envolve protonação do grupo alcóxido seguida do ataque nucleofílico pela água formando um intermediário pentacoordenado. A carga parcialmente positiva sobre o grupo alcóxido confere melhores características ao grupo.

Sob condições básicas, o mecanismo envolve ataque nucleofílico do ânion hidróxido sobre o átomo de silício formando um intermediário pentacoordenado de carga negativa seguido por deslocamento do ânion alcóxido. Nestas condições, ocorre um retardo significativo na taxa de polimerização devido à não estabilidade do estado de transição carregado negativamente. Por isso em muitos casos os meios ácidos são utilizados em decorrência da baixa reatividade dos precursores organossiliconados em meio básico.

A taxa de hidrólise e condensação são ditadas também pelo tamanho do grupo alcóxido por fatores estéricos. O tamanho amplo dos grupos alcóxidos e o aumento na extensão das cadeias laterais, diminuem a taxa de hidrólise.

Os precursores organossiliconados de fórmula geral  $R_{4-x}Si(OR)_x$ , estão disponíveis comercialmente ou podem ser preparados por diferentes estratégias sintéticas, dependendo da aplicação dos ormosils, que têm sido desenvolvidos como sensores químicos, em aplicações ópticas, em membranas de separação e de troca iônica e em aplicações cromatográficas e catalíticas (COLLINSON, 1998; WEN; WILKES, 1996).

O monômero funcional amplamente citado em trabalhos é o 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) (FIGURA 8, A), tetraetilortosilicato (TEOS) (FIGURA 8, B) é utilizado como agente reticulante, que promove o cruzamento entre as cadeias dos monômeros, formando a rede tridimensional ao redor da molécula molde.



**Figura 8** - Representação das estruturas químicas da 3- aminopropiltrimetoxissilano (A) e do tetraetilortosilicato (B).

Cummins, Duggan e McLoughlin, (2005) compararam as sílicas de impressão molecular (MIS) com MIP acrílicos e verificaram que o MIS pode ser mais específico às espécies alvo, apresentando várias propriedades vantajosas, como maior porosidade e estabilidade.

Em 2006, Silva e Augusto demonstraram o potencial de ormosils preparadas pelo processo sol-gel como material de impressão molecular para aplicações analíticas. Os autores desenvolveram um trabalho com MIS organicamente modificado não-covalente, preparado usando a cafeína como molécula molde, e avaliaram o desempenho desse material como sorvente em SPE para determinação de metilxantinas em água e em urina humana.

Uma das mais extensas aplicações dos materiais impressos molecularmente é como sorvente para extração em fase sólida (SPE) (HE et al., 2007).

### 3.3 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida foi inicialmente desenvolvida como complemento ou substituição da extração líquido-líquido (ELL). Atualmente é a técnica de preparo de amostras mais comum em muitas áreas da química analítica. Existem dois formatos básicos de sistemas para uso na SPE: cartuchos e discos. Os mais utilizados são cartuchos de polipropileno contendo de 50 a 500 mg de sorvente de 40-60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, fixado no cartucho por meio de dois discos de retenção, os “frits”. Os discos geralmente são constituídos de matrizes de PTFE embebidas ou impregnadas com a fase sorvente e são mais usados na extração de traços de analitos de grandes volumes de amostra aquosa (LANÇAS, 2004; OLIVEIRA et al., 2007; POOLE, 2002).

O processo de separação ocorre por interação líquido-sólido, onde há transferência dos analitos presentes em uma solução (fase móvel, amostra) para uma fase sólida (estacionária, fase extratora), em um processo semelhante ao que ocorre na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na extração em fase sólida, a amostra é percolada através de uma fase sólida que retém os solutos de interesse. Estes são posteriormente eluídos com pequeno volume de solvente. Esta técnica oferece vantagens sobre a tradicional ELL, entre elas: a alta concentração do analito no extrato final, a maior seletividade, alternativas de escolha de fase sólida, permitindo a extração de praticamente todos os compostos de matrizes aquosas ou orgânicas, o pequeno manuseio da amostra, a ausência de emulsão, o baixo consumo de vidrarias, a facilidade de automação (KATAOKA, 2003; POOLE, 2002).

Entretanto, como qualquer outra técnica de preparo de amostras, apresenta algumas limitações, como a dificuldade de serem extraídas mais de 4 amostras simultaneamente, no modo manual (ainda que no comércio sejam oferecidos sistemas multicomponentes – “manifolds” - para uso de 10 ou mais cartuchos). Também são relatadas variações nos resultados de análises realizadas em cartuchos de diferentes marcas e mesmo de diferentes lotes disponíveis no mercado.

Os parâmetros operacionais relevantes em SPE são: a natureza do sorvente, o volume da amostra, a natureza dos solventes, o formato do sistema de extração e o modo de operação. A capacidade retensiva dos cartuchos depende da massa do sorvente, da afinidade do sorvente pelo analito, do volume da amostra e da natureza e quantidade de impurezas (OLIVEIRA et al., 2007).

Uma grande variedade de sorventes são disponíveis comercialmente. Em geral, os materiais de recheio para SPE são similares aos usados em cromatografia líquida. Adsorventes como carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fases quimicamente ligadas e trocadores iônicos orgânicos e inorgânico são usados. Fases denominadas de “especiais”, mais seletivas, têm sido introduzidas nos últimos anos, como os imunosorventes, fases poliméricas, por exemplo, o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno, fases de acesso restrito (RAM) e polímeros de impressão molecular (LANÇAS, 2004; OLIVEIRA et al., 2007; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A separação em SPE ocorre devido às interações intermoleculares entre o analito e os grupos funcionais do sorvente. Os sorventes mais usados para análise de fármacos em material biológico envolvem interações apolares, polares ou iônicas.

As interações apolares são as que ocorrem entre grupos  $CH_n$  do adsorvente e do analito (forças de Van der Waals, dipolo induzido ou forças de dispersão). A maioria dos fármacos são compostos orgânicos com estrutura parcialmente apolar sendo este tipo de interação a mais prevalente para estes analitos. Os sorventes mais usados são compostos apolares, representados por cadeias de carbono de comprimentos diversos ligadas à sílica, sendo os mais usados a octadecila ( $Si-C_{18}H_{37}$ ), octila ( $Si-C_8H_{17}$ ), cicloexila ( $Si-C_6H_{11}$ ) e fenila ( $Si-C_6H_5$ ). São todos sorventes não seletivos; solventes polares, como a água, facilitam a ligação dos compostos mais apolares às cadeias apolares do sorvente. Solventes apolares são então utilizados na eluição dos compostos sorvidos, sendo capazes de desfazer a interação analito-sorvente (WELLS, 2003)

As interações polares envolvem ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido, além de outras, nas quais a distribuição de elétrons nos grupos funcionais não é equivalente, levando a polaridade positiva ou negativa. Esta propriedade permite a um analito interagir com o grupo polar do adsorvente. Os principais tipos de grupos ligados ao adsorvente incluem hidroxilas, aminas,

carboxilas, anéis aromáticos, sulfidrilas, duplas ligações e grupos contendo heteroátomos como oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo. Nestas materiais a retenção dos compostos polares pelo sorvente, também polar, é favorecida por solventes apolares e a eluição deve ser feita com solventes de polaridade elevada para que, na competição com o sorvente, possa romper a ligação deste com o analito (WELLS, 2003).

A terceira classe de interação em SPE é a iônica e ocorre entre o analito com carga negativa (fosfatos, ácidos carboxílicos e sulfônicos etc) ou positiva (aminas, sódio, magnésio, cálcio etc) e o adsorvente com carga oposta. Para que haja retenção efetiva do analito num sorvente por esta mecanismo, duas condições devem ser observadas: a) a matriz e/ou o solvente deve estar num pH tal que o analito e o sorvente estejam carregados, ou seja, num pH abaixo do pKa do cátion e acima do pKa do ânion e b) a matriz e/ou o solvente não deve ter íons de mesma carga que o analito competindo. Os principais sorventes usados na troca de cátions são o benzenosulfônico, a sulfonilpropila e a carboximetila e os que promovam a troca de ânions são as aminas quaternárias e as di e as trietilaminopropilas (WELLS, 2003).

Existem ainda os cartuchos de fase mista, que possuem uma parte de sorvente lipofílico, em geral cadeias octila ou octadecila ligadas à sílica, e uma parte iônica. Estes materiais são usados quando se deseja reter analitos de caráter ácido, básico e neutro de material biológico, mas apresentam a desvantagem de reter também muitos interferentes da amostra. Há três formas básicas para a utilização de fases duplas em SPE: modo misto, onde as duas distintas fases são misturadas no mesmo cartucho; em camadas quando as duas fases são colocadas no mesmo cartucho, porém, uma sobre a outra; em série, quando as fases são colocadas em cartuchos diferentes, usados em série (LANÇAS, 2004)

Atualmente, a SPE pode ser utilizada em processos automatizados, que empregam equipamentos de extração robotizados ou interfaces para acoplamento “on-line” com sistemas cromatográficos, principalmente HPLC. Os processos de extração automatizados fornecem grande agilidade e produtividade às análises, mas apresentam custo ainda muito elevado, o que faz com que o processo de extração manual, “off-line”, ainda seja o mais utilizado nos laboratórios de análises toxicológicas (COSTA, 2008).

Em geral, os procedimentos da SPE compreendem 4 etapas, que são condicionamento, carregamento, limpeza e eluição (LANÇAS, 2004; WELLS, 2003) descritas a seguir:

- **condicionamento** da fase extratora com solvente adequado para ativação dos sítios ativos disponíveis que possivelmente ligarão os analitos presentes na amostra. A fase sólida deve ser umedecida previamente ao carregamento para favorecer a passagem homogênea da amostra pelo cartucho evitando-se a formação de canais preferenciais;
- **carregamento** que consiste na introdução da amostra a uma velocidade satisfatória propiciando o contato amostra/fase extratora quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes;
- **limpeza** da coluna para remoção dos interferentes retidos. É importante que o solvente de limpeza tenha características químicas para eluir apenas os compostos indesejáveis, não interferindo na retenção do analito na fase extratora. Após passagem do solvente de limpeza, a fase extratora deve ser seca para remoção de todo resíduo desta etapa;
- **eluição** dos analitos através de pequeno volume de solvente que arrasta preferencialmente os analitos retidos na fase extratora para posterior análise.

A etapa crítica da aplicação de SPE consiste na retenção de compostos interferentes que apresentem capacidade de adsorção similar ao analito. Em função da não seletividade dos sorventes, algumas estratégias alternativas têm sido adotadas. O emprego de polímeros biomiméticos como materiais sorventes em SPE vêm adquirindo destaque, pois oferecem alto grau de seletividade quando comparados aos outros sorventes, como a sílica modificada (C18) e resinas de troca iônica e, ao mesmo tempo, por serem mais estáveis que os imunossorventes (HAUPT, 2001; HAUPT; MOSBACH, 2000).

### **3.4 Polímeros de impressão molecular na extração em fase sólida (MISPE)**

Nos últimos anos a SPE têm-se tornado a técnica de preparação de amostra mais comum e nem sempre oferece limpeza adequada da matriz e enriquecimento do analito para posterior análise. Isso é devido à falta de seletividade dos sorventes para SPE disponíveis comercialmente, o que se torna problemático quando uma extração seletiva precisa ser realizada em uma matriz complexa, pois, substâncias interferentes de polaridades similares ao analito podem ser retidas e concentradas (YANG et al. 2006).

Outros materiais com alta seletividade como os imunosorventes e os polímeros de impressão molecular têm sido desenvolvidos e aplicados em procedimentos de extração. O custo e consumo de tempo para produzir e isolar anticorpos, bem como a falta de disponibilidade, tem levado os MIP a serem explorados amplamente na extração em fase sólida com impressão molecular, técnica denominada como MISPE (QIAO et al., 2006).

O emprego dos MIP na extração em fase sólida permite extrações altamente seletivas e consiste na percolação da amostra em colunas recheadas com os polímeros impressos molecularmente, ou seja, as partículas do polímero são dispostas entre dois discos de retenção nos cartuchos de SPE, onde a espécie de interesse fica retida. As etapas de extração, concentração e isolamento são possíveis em um único passo.

Existem atualmente cartuchos de MISPE disponíveis no comércio para a extração de alguns analitos e algumas empresas disponibilizam serviço de síntese de MIP para SPE, o que tem facilitado o uso dos MISPE por laboratórios analíticos (TAMAYO; TURIEL; MARTIN-ESTEBAN, 2007).

A MISPE funciona como um procedimento convencional de SPE. Assim, tem-se as etapas de condicionamento, carregamento, lavagem e eluição dos cartuchos (QIAO et al., 2006).

As etapas de condicionamento e carregamento do cartucho visam ativar as cavidades seletivas do polímero para maximizar as interações com o analito (CARO

et al., 2006a). O solvente no qual as amostras serão percoladas não deve interferir nas interações polímero-analito para aumentar a retenção deste.

Na etapa de lavagem devem ser otimizadas as condições de pH, polaridade e volume de solvente, de tal modo que o analito não seja removido dos sítios específicos de ligação (CARO et al., 2006a). Para tal finalidade são usados solventes de baixa polaridade tais como o tolueno, clorofórmio, diclorometano.

A capacidade de reconhecimento molecular deve ser avaliada com relação a um polímero não impresso (NIP, non imprinted polymer). Assim, o NIP funciona como um polímero de controle, pois não apresenta sítios específicos de ligação.

A MISPE pode ser realizada nos dois modos distintos: “on-line” e “off-line”, esta última a mais utilizada até o momento (CARO et al., 2006a).

He et al. (2007) relatam que em muitos casos, MISPE são aplicadas no método “off-line”, similar à SPE “off-line” com solventes convencionais. A principal vantagem deste modo de operação é sua simplicidade e facilidade, o que possibilita o uso de muitos solventes sem influenciar na análise cromatográfica subsequente. No procedimento MISPE “off-line”, uma pequena quantidade do polímero impresso (tipicamente 15 a 500 mg) é usada para empacotar os cartuchos e então, através do condicionamento, carregamento, lavagem e eluição, os analitos podem ser isolados de amostras reais. A finalidade de cada uma das etapas citadas são semelhantes às descritas em 3.3 para a SPE convencional. Infelizmente, o modo “off-line” apresenta a grande desvantagem de consumo de tempo e, conseqüentemente, ocorre aumento de erros analíticos.

Para superar os sinais interferentes da MISPE “off-line”, procedimentos MISPE “on-line” têm sido desenvolvidos. Este modo envolve a automação, acoplando o cartucho com o polímero ao sistema analítico e evitando a manipulação da amostra entre as etapas de pré-concentração e análise, o que reduz a perda de analitos e o risco de contaminação, além de aumentar a exatidão e a reprodutibilidade da análise (MASQUÉ et al., 2000). Além do mais, devido à automação da MISPE, o tempo de pré-tratamento de amostras reais pode ser reduzido, assim como o volume das amostras (HE et al. 2007).

Técnicas de impressão covalente, não-covalente e semi-covalente, podem ser usadas para se obter MIP para aplicação em SPE (HE et al. 2007).

Os métodos de polimerização em “bulk”, por precipitação e por suspensão podem ser aplicados na síntese de materiais para a SPE (PICHON, 2007), assim

como o processo sol-gel, usado por Silva e Augusto (2006). Além destes, novas estratégias de síntese têm sido descritas para uso do polímero em SPE visando a obtenção de material com características físico-químicas mais apropriadas para este uso (tamanho de partículas, porosidade, volume do poro, área superficial). Um destes processos é o “multi-step swelling” e polimerização, que basicamente consiste no intumescimento das partículas de sustentação (látex de poliestireno, ~ 1 µm) usando uma microemulsão de solvente de ativação de baixo peso molecular (i.é., dibutilftalato) em água contendo dodecilsulfato de sódio como estabilizador, e na presença de um iniciador. Quando as gotas da emulsão são absorvidas no material de sustentação, esta dispersão é adicionada a uma segunda dispersão aquosa contendo estabilizador polimérico, monômero, agente de reação cruzada, iniciador radicalar, porogênio e a molécula molde e a mistura é agitada por várias horas. O material é então purgado com gás inerte e inicia-se o processo de polimerização. Entretanto, este material, ainda que vantajoso para uso em SPE, só é aplicável para MIP em que as ligações polímero-molde se fazem por interações eletrostáticas ou hidrofóbicas (TAMAYO; TURIEL; MARTIN-ESTEBAN, 2007).

Outra estratégia é sintetizar o polímero dentro dos cartuchos de SPE; a limpeza e a remoção do molde são realizadas no mesmo cartucho da extração, como citado em artigo de revisão por Pichon (2007).

Vários estudos foram realizados nos últimos anos quanto ao emprego da MISPE em análise cromatográfica de fármacos em material biológico, mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Aplicação dos polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de fármacos presentes em material biológico

Molécula molde	Síntese do MIP	Amostra	Analito	Sistema analítico	Referência
β-agonista	Não-covalente, bulk	Urina	β-agonistas	CLAE/EM/EM	VAN HOOF et al., 2005
β-agonistas	Não-covalente, bulk	Urina	β-agonistas	CLAE/EM/EM	WIDSTRAND et al., 2004
β-agonistas	Não-covalente, bulk	Urina	β-agonistas	CLAE/EM/EM	FIORI et al., 2005
Amobarbital	Não-covalente, suspensão	Urina	Fenobarbital	CLAE/UV	HU; WANG; HE, 2003
Cloranfenicol, análogo estrutural	Não-covalente, bulk	Plasma e Urina	Cloranfenicol	CLAE/EM/EM	BOYD et al., 2007
Brombuterol	Não-covalente, bulk	Urina	Clenbuterol	CLAE/UV	BLOMGREN et al., 2002
Brombuterol	Não-covalente, bulk	Urina	Clenbuterol	EM	VAN HOUT et al., 2003
Bromoclenbuterol	Não-covalente, bulk	Fígado	Clenbuterol	CLAE/EM	CRESCENZI et al., 2001
Bupivacaína	Não-covalente, bulk	Plasma	Ropivacaína	CLAE/EM/EM	ABDEL-REHIM et al., 2006

(continua)

**Tabela 1** – Aplicação dos polímeros de impressão molecular para extração em fase sólida de fármacos presentes em material biológico

					(conclusão)
Molécula molde	Síntese do MIP	Amostra	Analito	Sistema analítico	Referência
Bupivacaína	Não-covalente, bulk	Plasma	Ropivacaína e bupivacaína	CLAE/UV	COBB; SELLERGREEN; ANDERSSON, 2007
Cafeína	Sol-gel	Urina	Metilxantinas	CLAE/UV	SILVA; AUGUSTO, 2006
Carbamazepina	Não-covalente, bulk	Urina	Carbamazepina	CLAE/UV	BELTRAN et al., 2007
Cefalexina	Não-covalente, bulk	Soro	Cefalexina	PE/EM	WU; LAI; MAYER, 2004
Cefalexina	Não-covalente, bulk	Soro e plasma	Cefalexina	UV	LAI; WU, 2003
Cefatiamidina	Não-covalente, bulk	Soro e plasma	Cefatiamidina	CLAE/UV	TANG et al., 2005
Cefatiamidina	Não-covalente, bulk	Soro	Ceftiamidina	CLAE/UV	HUANG; TANG, 2005
Diazepam	Não-covalente, bulk	Cabelo	Benzodiazepínicos	CLAE/EM	ARIFFIN et al., 2007
Dopamina	Não-covalente, bulk	Urina	Fármacos adrenérgicos	CLAE/ fluorescência	SUEDEE et al., 2006
Enrofloxacin	Não-covalente, bulk	Urina	Enrofloxacin	CLAE/UV	CARO et al., 2006b
Eritromicina	Não-covalente, bulk	Fígado	Ciprofloxacina		
Eritromicina	Não-covalente, bulk	Músculo	Eritromicina	CLAE/ fluorescência	SONG et al., 2008
Fenitoína	Não-covalente, bulk	Plasma	Fenitoína	CLAE/UV	BERECZKI et al., 2001
Hiosciamina	Não-covalente, bulk	Urina, soro	Escopolamina	CLAE/UV	THEODORIDIS et al., 2003
Naproxeno	Não-covalente, bulk	Urina	Naproxeno	CLAE/EM/EM	CARO et al., 2004
Oxitetraciclina	Não-covalente, bulk	Rim	Tetraciclina antibiótico	CLAE/UV	CARO; MARCE; CORMACK, 2005
Pentacaína	Não-covalente, bulk	Plasma	Ropivacaína, bupivacaína	CG/NPD	ANDERSSON et al., 2004
Pentacaína	Não-covalente, bulk	Plasma	Ropivacaína, bupivacaína	CG/CLAE/EM/EM	ANDERSSON et al., 2002
Propranolol	Não-covalente, bulk	Plasma	β-bloqueadores	CLAE/ fluorescência	MARTIN et al., 2003
Propranolol	Não-covalente, bulk	Fluidos biológicos	β-bloqueadores	CLAE/UV	SANBE; HAGINAKA, 2003
Propranolol	Não-covalente, bulk	Plasma	Análogo estrutural ao propranolol	CLAE/ fluorescência	MARTIN et al., 2004
Quercetina	Não-covalente, bulk	Plasma	Quercetina	CLAE/UV	XIE et al., 2003
Ropivacaína, análogo estrutural	Não-covalente, bulk	Plasma	Ropivacaína	CLAE/EM	COBB; ANDERSSON, 2005
Sildenafil, análogos estruturais	Não-covalente, bulk	Plasma	Sildenafil e desmetilsildenafil	CLAE/UV	DZYGIEL et al., 2007
Tramadol	Não-covalente, bulk	Plasma	Tramadol	CLAE/UV	BOOS; FLEISCHER, 2001
Trimetoprima	Não-covalente, bulk suspensão	Urina	Trimetoprima	CLAE/UV	HU; LI; HE, 2005
Verapamil	Não-covalente, bulk	Urina, plasma	Verapamil e galopamil	CLAE/EM	MULLETT et al., 2004
Xantinas	Não-covalente, bulk	Plasma	Xantinas	CLAE/UV	THEODORIDIS; MANESIOTIS, 2002

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EM: Espectrometria de Massa

UV: Ultravioleta

PE: Eluição por Pulsos

CG: Cromatografia Gasosa

NPD: Detector Nitrogênio-Fósforo

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Reagentes e solventes

- Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes para a síntese dos polímeros: ácido metacrílico (AMA), Sigma Aldrich®; 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), Sigma Aldrich®; etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), Sigma Aldrich®; 3-aminopropiltrimetoxisilano 95% (APTMS), Acros Organics®; tetraetilortosilicato 95% (TEOS), Acros Organics®; acetonitrila, grau HPLC da Merck®;

- Os solventes e reagentes usados no preparo de soluções, nos testes de otimização das condições cromatográficas e das variáveis do polímero em fase sólida (MISPE) foram: metanol, grau HPLC J. T. Baker®; etanol grau HPLC Nuclear®; acetonitrila, grau HPLC Merck®; isopropanol, grau HPLC, Vetec®; clorofórmio, p.a., Vetec®; ácido acético, p.a., Merck ®; acetato de sódio triidratado, p.a., Vetec®; hidróxido de amônio, p.a., Merck ®; ácido perclórico p.a., Merck®; éter di-etílico p.a., Vetec®; *n*-hexano, p.a., J. T. Baker®; cloreto de sódio, p.a., Merck ®; água purificada Milli-Q.

#### 4.1.2 Equipamentos e acessórios

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu® LC 10 AVP®, bomba LC 10AD, com forno de colunas, injetor automático, detector UV; coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck (250 mm x 4 mm x 5µm), e pré-coluna similar LiChroCART® 4-4, Merck; coluna cromatográfica BDS Hypersil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) e pré coluna LiChroCART® 4-4, Merck Thermo Electron Corporation®;

sistema de purificação de água Milli-Q Plus, Millipore®; banho de ultrassom Unique®; peagâmetro digital Nova Técnica®; balança eletrônica de precisão BG 440, Gehaka®; balança analítica Kern 410®; agitador mecânico tipo vórtex MA 162, Marcon®; centrífuga NT-811, Nova Técnica®; banho de água NT-265, Nova Técnica®; conjunto para filtração a vácuo composto de funil, base e tampa tubulada em vidro borossilicato e garra de alumínio Millipore®; torpedo contendo nitrogênio White Martins®; microcolunas ODS-C18 200 mg/ 3mL (AccuBOND II®); cartuchos vazios de polipropileno e “frits” para 3 mL de amostra (AccuBOND II®, Technologies® e Chromabond®); sistema de suporte e extração “manifold” da Supelco®; espectrômetro de infra-vermelho Bomem MB-102 (ABB, St-Laurent, Canada); microscópio de varredura eletrônica (MEV) Jeol LV-JSM 6360 operando na voltagem de 15 keV.

#### 4.1.3 Soluções-padrão

Foram preparadas soluções-padrão de amitriptilina, nortriptilina e desipramina na concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  em metanol.

A partir de diluições das soluções-padrão, obteve-se concentrações finais para as soluções de trabalho entre 200 e  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  para otimização das condições de aplicação da MISPE. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas a  $(-20^{\circ}\text{C})$ , as estoques, no máximo por 30 dias, e as de uso preparadas antes da utilização.

#### 4.1.4 Amostras biológicas

Foram utilizadas amostras de plasma, obtidas de sangue heparinizado coletado em sistema de coleta à vácuo, Vacuntainer®. O plasma foi separado por meio de centrifugação a 560 g durante 5 minutos e armazenado à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para estudos de otimização e validação analítica, utilizou-se *pool* de plasma

branco, coletado de voluntários que não ingeriam qualquer tipo de medicamento e não-fumantes, fortificado com padrões dos analitos. Amostra de plasma de 2 (dois) pacientes que faziam uso de AMI foram usadas na técnica de SPE C18.

O protocolo da pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifal-MG (ANEXO).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Condições cromatográficas

Após alguns experimentos, foram usadas as seguintes fases móveis e colunas cromatográficas no decorrer dos trabalhos: a) nos ensaios com o MIP-AMI, a fase móvel formada por acetonitrila:fosfato de sódio monobásico 5 mmol<sup>-1</sup> (1:1) contendo 0,1% de dietilamina (DEA) e na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e a coluna cromatográfica BDS Hypersil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), Thermo Electron Corporation®; b) nos testes com o MIS-AMI e MIS-NOR, assim como com a SPE C18, a coluna Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck (250 mm x 4 mm x 5µm), e a fase móvel tampão ácido acético/acetato de sódio 0,25 mol L<sup>-1</sup> pH 5,5: acetonitrila (55:45), na vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup> foram empregadas. A leitura foi efetuada na região do ultravioleta com comprimento de onda ajustado em 254 nm.

O desempenho da separação cromatográfica foi avaliado pelos parâmetros de conformidade do sistema que representa um conjunto de testes que devem ser realizados para garantir que o sistema utilizado está apto a gerar resultados exatos e precisos. Para a técnica da cromatografia líquida, parâmetros como número de pratos teóricos ( $\geq 2000$ ), resolução ( $\geq 2$ ), assimetria 10% ( $0,5 \leq T \leq 2$ ) e fator de capacidade ( $\geq 10$ ) devem ser avaliados (US FDA , 2004).

## 4.2.2 Polímeros de impressão molecular usando o ácido metacrílico (AMA) como monômero

### 4.2.2.1 Síntese do polímero

O método empregado na síntese foi o de polimerização em “bulk”. Em um frasco de vidro de 30 mL, 100 mg de padrão de AMI foram dissolvidos em 11,0 mL de acetonitrila. A seguir, foram adicionados 8,0 mmol de ácido metacrílico, 40,0 mmol de etilenoglicol dimetacrilato e 1,5 mmol de 2,2'-azobisisobutironitrila. Após a adição dos reagentes o frasco foi resfriado num banho de gelo, purgado com nitrogênio por 5 min e selado. O sistema foi colocado num banho de glicerina a 60° C por 24 h. Após a polimerização, o conteúdo sólido do frasco foi triturado em gral e o pó peneirado em tamis para seleção das partículas com tamanho inferior a 100 µm. Polímero de controle (NIP) também foi sintetizado e tratado exatamente como descrito para o MIP, exceto pela adição da molécula molde.

Posteriormente, também foi sintetizado o polímero com a molécula molde imipramina (IMI), análogo estrutural à AMI, com a finalidade de aplicação do MIP para extração em fase sólida. O método empregado na síntese foi também o da polimerização em “bulk”. Em um frasco de vidro de 300 mL, 50 mg de padrão de IMI foram dissolvidos em 5,0 mL de acetonitrila. Foram então adicionados 4,0 mmol de ácido metacrílico, 20,0 mmol de etileno glicoldimetacrilato e 50,0 mg de 2,2'-azobisisobutironitrila. As demais operações foram realizadas do mesmo modo descrito para os polímeros de MIP-AMI e de NIP.

As sínteses destes polímeros foram realizadas no Laboratório de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização-GEPAM do Instituto de Química da Unicamp.

### 4.2.2.2 Dessorção da molécula molde do polímero

Após a síntese do polímero, cerca de 300 mg do material foram colocados nos cartuchos de polipropileno e submetidos a passagens sucessivas de solvente extrator, aproximadamente 20 frações de 10 mL cada, sendo testados metanol e metanol:ácido acético (9:1; 4:1 e 1:1). A última fração era recolhida e cromatografada para avaliar a presença ou não do molde.

Outro método para dessorção foi a utilização do extrator de Soxhlet. Um cartucho de papel Whatman nº 1 contendo todo polímero resultante da síntese era colocado no aparelho. Os solventes extratores testados foram metanol e metanol:ácido acético 9:1. Decorrido o tempo, aproximadamente 72 h, o material foi seco em estufa para posterior preparação dos cartuchos de polipropileno. Eluatos provenientes da passagem de metanol e metanol:ácido foram cromatografadas para avaliar a presença ou não do molde.

#### **4.2.2.3 Otimização do desempenho do MISPE- IMI**

As condições de aplicação MISPE-IMI foram estudadas para otimizar a técnica de extração da AMI. Estas variáveis foram o solvente de condicionamento dos cartuchos, de lavagem e de eluição dos analitos.

Quantidades de 200 e 300 mg do MIP foram transferidas para cartuchos de SPE, contendo os “frits” posicionados em sua base; o segundo “frit” foi cuidadosamente posicionado no topo da fase polimérica. Após uso, os cartuchos eram lavados com metanol, fechados com papel alumínio e armazenados até novo uso. Usou-se um sistema de vácuo multicomponentes, “Manifold”, com vazão em torno de 2 mL min<sup>-1</sup> para a passagem dos diferentes solventes e amostras nos cartuchos, secando-se o mesmo apenas após a lavagem, antes da eluição dos analitos.

##### *Condicionamento*

Foram testados os seguintes solventes no condicionamento dos cartuchos: etanol, metanol, acetonitrila e água em duas frações de 10 mL cada.

##### *Carregamento da amostra*

As amostras de padrões em solução aquosa foram passadas nos cartuchos ainda úmidos com a solução de condicionamento, em volumes de 1 mL. Foi avaliado o efeito do pH das amostras, testando-se os valores de 3,0; 7,0; 12,0.

#### *Limpeza*

Os solventes testados para a etapa de limpeza foram: acetonitrila, acetonitrila 20%, acetonitrila 30%, água, metanol, metanol 20%, metanol 50%, diclorometano e etanol, nos seguintes volumes: 5, 10 e 20 mL.

#### *Eluição*

Os solventes testados foram: metanol, metanol/ácido acético (9:1), etanol, acetonitrila, clorofórmio e isopropanol.

Escolhido o solvente de eluição, foi necessário otimizar o volume adequado para remoção máxima do analito, tendo sido testados volumes de 5, 10, 20 e 30 mL.

### 4.2.3 Polímeros de impressão molecular usando o 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) como monômero

#### **4.2.3.1 Síntese do polímero**

Na síntese do polímero de ormosil, foi empregado o processo sol-gel, descrito por Silva e Augusto (2006). Foram dissolvidas 100 mg do padrão de AMI em 0,8 mL de água a fim de se obter uma solução saturada do padrão. Em um frasco de vidro de 30 mL, colocou-se 0,52 g de APTMS, 2,0 g de TEOS, a solução saturada de padrão de AMI e 0,8 g de hidróxido de amônio, adicionados nesta seqüência. O frasco foi levado ao ultrassom por 2 minutos e posteriormente colocado em estufa a 85°C por 10 h para a completa secagem e solidificação do material. Após a polimerização, o conteúdo sólido do frasco foi triturado em gral e o pó peneirado em tamis para seleção das partículas com tamanho menor de 100

$\mu\text{m}$ . Este mesmo processo também foi o utilizado para a síntese do polímero com a nortriptilina como molécula molde. O polímero sem a impressão molecular (NIS) foi sintetizado de maneira idêntica, exceto pela ausência do molde. Inicialmente foi sintetizado e avaliado o MIS-AMI e, posteriormente, frente a resultados não satisfatórios, o MIS-NOR.

As primeiras sínteses foram feitas no Laboratório de Cromatografia Gasosa do Instituto de Química da Unicamp, passando a ser realizada posteriormente no Laboratório de Análises Toxicológicas da Unifal-MG, com os reagentes gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fábio Augusto, do IQ/Unicamp.

#### **4.2.3.2 Dessorção da molécula molde do polímero**

O método para dessorção da molécula molde tanto para o MIS-AMI quanto para o MIS-NOR foi o aparelho extrator de Soxhlet. Um cartucho de papel Whatman nº 1 com 8 cm de altura e 4 cm de largura contendo todo polímero resultante da síntese foi colocado no aparelho. Os solventes extratores testados foram metanol e metanol:ácido acético (9:1). Decorrido o tempo, cerca de 72 h, o material foi seco em estufa para posterior preparação dos cartuchos de polipropileno para a SPE.

#### **4.2.3.3 Caracterização dos polímeros**

A caracterização química dos polímeros (MIS-AMI, MIS-NOR e NIS) foi feita por espectrofotometria no infravermelho, no Laboratório de Espectrofotometria de Infravermelho, e a caracterização morfológica obtida por microscopia de varredura eletrônica, no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, análises realizadas do Instituto de Química da Unicamp.

#### **4.2.3.4 Otimização do desempenho do MISPE**

As condições de aplicação do MIS em extração em fase sólida foram estudadas para otimizar a técnica de extração dos analitos de interesse: AMI e NOR.

O empacotamento dos cartuchos foi realizado como descrito anteriormente para o MIP, usando-se 200 mg do polímero. O condicionamento foi realizado pela passagem de 2 mL metanol seguidos de 2 mL água conforme preconizado por Silva e Augusto (2006).

#### *Carregamento da amostra*

Amostras aquosas de amitriptilina e nortriptilina a 400 ng mL<sup>-1</sup> foram usadas na otimização dos experimentos, usando-se 1 mL para o carregamento dos cartuchos ainda úmidos com a solução de condicionamento. O estudo do efeito do pH das amostras foi avaliado nos valores 3,0; 7,0; 12,0.

As amostras de plasma foram passadas nos cartuchos, após precipitação das proteínas, usando-se todo o sobrenadante obtido. Foram testados o ácido perclórico 6% e a acetonitrila para a precipitação das proteínas do plasma.

Posteriormente, na tentativa de melhorar o desempenho da extração do MIS-AMI, foi também realizado o seguinte procedimento de extração líquido-líquido, previamente ao carregamento da amostra: em tubo de extração (15mL), colocou-se 0,5 mL de plasma previamente fortificado com os analitos, 100 mg de cloreto de sódio, 2,0 mL de éter di-etílico e 2,0 mL de *n*-hexano. A seguir, esta mistura foi agitada no vórtex por 3 minutos. Transferiu-se toda a fase orgânica para carregamento do cartucho de MIS.

#### *Limpeza*

A limpeza dos cartuchos foi realizada com 2 mL de água para o MIS-AMI e com 5 mL de água para o MIS-NOR.

#### *Eluição*

Os solventes testados foram: metanol, metanol:ácido acético (9:1), etanol, acetonitrila, clorofórmio e isopropanol para o MIS-AMI e metanol, metanol:ácido acético (9:1), etanol, acetonitrila e diclorometano para o MIS-NOR.

Selecionado o melhor solvente, estudou-se o volume adequado para melhor extração, sendo testados os de 5, 10, 20 e 30 mL.

#### 4.2.3.5 Seletividade do MIS

A seletividade dos polímeros MIS-AMI e MIS-NOR foram avaliadas por meio do fator de impressão, obtido pela razão da resposta MIS/NIS, onde quantidades conhecidas de analito foram carregadas sob as mesmas condições nos cartucho impressos e nos cartuchos não-impressos. Foram avaliadas as seletividades para outros antidepressivos do grupo, a desipramina, imipramina e a clomipramina, além da amitriptilina e nortriptilina.

#### 4.2.4 Extração em fase sólida octadecila

Para estas análises foi feita a revalidação parcial de método previamente desenvolvido no Laboratório de Análises Toxicológicas, descrito a seguir:

- condicionar o cartucho com 6,0 mL de metanol, 6,0 mL de acetonitrila e 6,0 mL de água;
- passar a amostra de plasma diluída (1,0 mL de plasma, 1,0 mL de solução de bicarbonato de sódio 1,0 M pH 10,0 e 2,0 mL de água Milli-Q);
- lavar o cartucho com 1,0 mL da solução de água/acetonitrila (8:2) e 1,0 mL da solução água/acetonitrila/metanol (2:3:3). Secar a coluna por 2 minutos;
- eluir os analitos com 4,0 mL de metanol/acetonitrila (8:2).

A vazão usada foi  $\leq 2$  mL/min. O eluato recolhido em um béquer afunilado foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a uma temperatura de 40°C em banho de água. O resíduo foi ressuspensão em 100  $\mu$ L de fase móvel e 40  $\mu$ L foram injetados no cromatógrafo nas condições descritas em 4.2.1.

#### 4.2.4.1 Parâmetros de validação avaliados

Os parâmetros de validação foram avaliados segundo as recomendações preconizadas pela Anvisa (**BRASIL, 2003**).

##### *Linearidade*

A linearidade, ou seja, a capacidade do método de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, foi determinada em amostras de *pool* de plasma branco fortificadas com amitriptilina e nortriptilina numa faixa de concentração de 20 a 400 ng mL<sup>-1</sup> (faixa linear dinâmica), além do padrão interno, desipramina (200 ng mL<sup>-1</sup>). A regressão linear simples, descrita pela equação  $y = ax + b$ , foi calculada através do quociente das áreas dos picos de AMI e NOR pela área do padrão interno, a desipramina (DESI) pelo método dos mínimos quadrados.

##### *Precisão*

A precisão representa o grau de repetitividade nos resultados de análise de replicatas de mesmas amostras. Para determinar a precisão intra-ensaios foram analisadas amostras de *pool* de plasma branco fortificadas com concentrações de amitriptilina e nortriptilina de 20, 50 e 300 ng mL<sup>-1</sup>. Cada concentração foi analisada em quintuplicata. Na análise interensaios (precisão intermediária) foram analisadas triplicatas/amostra por 3 dias consecutivos. Os resultados foram expressos como coeficientes de variação (% CV).

##### *Limite de quantificação*

O limite de quantificação (LQ) foi determinado pela concentração de AMI ou de NOR em plasma que forneceu uma relação sinal/ruído de 10, com relação ao branco de amostra, na região do tempo de retenção dos fármacos. O LQ foi determinado por meio da adição de amitriptilina e nortriptilina em amostras de *pool* de plasma branco, sendo analisadas 5 replicatas por concentração testada.

##### *Recuperação*

A recuperação relativa foi calculada pela relação das respostas obtidas com amostras de plasma branco fortificadas com os analitos e o PI e extraídas com as resultantes de amostras de plasma branco extraídas e fortificadas ao final de cada

processo, ou seja, nos eluatos provenientes da SPE. Foram analisadas as mesmas concentrações dos estudos de precisão, em triplicata/concentração.

O método validado foi aplicado em análise de amostras reais, de dois pacientes em tratamento com amitriptilina, coletadas às 7 horas da manhã, em jejum:

- paciente A: ingeria 3 comprimidos de 25 mg de amitriptilina à noite (medicamento genérico), há cinco anos, além de diazepam, também à noite.

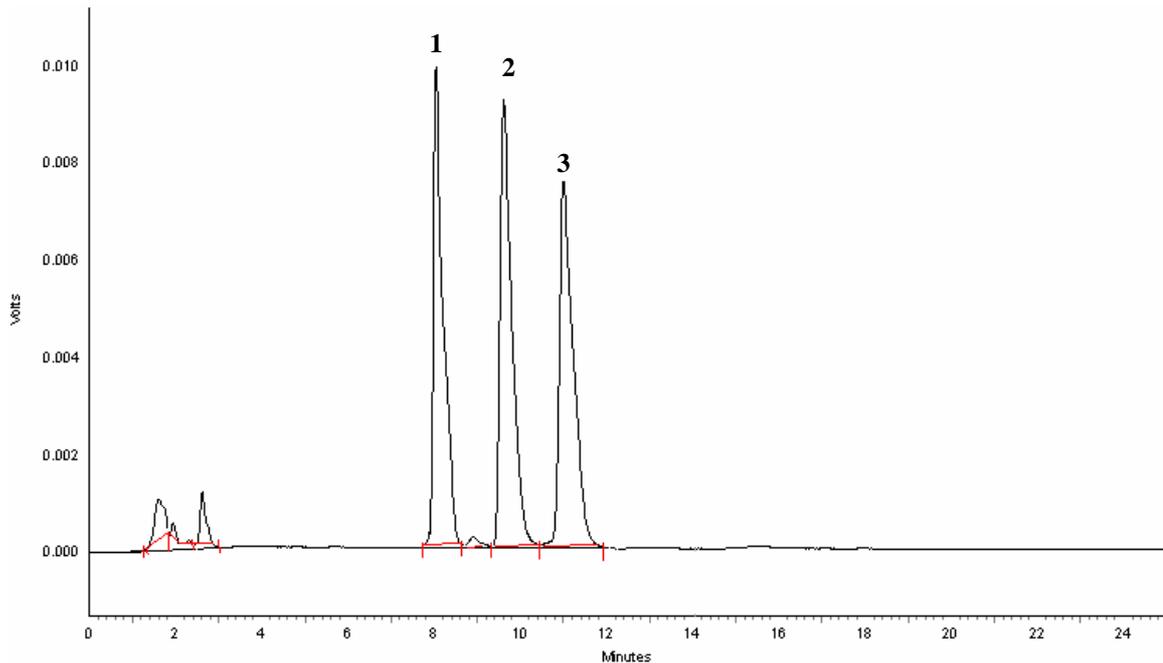
- paciente B: ingeria 1 comprimido de amitriptilina 25 mg de 12 em 12 h (medicamento genérico) há oito anos, além de haloperidol uma vez ao dia.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Condições cromatográficas

A coluna usada no início dos trabalhos para análise do MIP-AMI - BDS Hypersil C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) com fase móvel acetonitrila:tampão fosfato 5 mmol (50:50) pH 7,5, vazão de 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ , temperatura da coluna de 35° C, e detector de ultravioleta a 254 nm - não revelou bom desempenho para a análise cromatográfica dos analitos, fornecendo picos assimétricos, com distorção posterior (cauda), mesmo após adição de 0,1% de DEA à fase móvel para reduzir possíveis interações dos analitos com grupos silanóis livres da fase estacionária. Assim, logo que foi possível, esta coluna foi substituída pela Lichrospher® 60 RP – Select B, Merck® (250 mm x 4 mm x 5  $\mu\text{m}$ ). Nesta coluna, a separação cromatográfica foi alcançada de modo isocrático usando-se a fase móvel constituída de tampão ácido acético/acetato de sódio 0,25 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 5,5: acetonitrila (55:45), na vazão de 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$ , detector ultravioleta a 254 nm e temperatura da coluna de 35° C. Eficiência e resolução adequadas foram obtidas para uso desta técnica na análise de AMI e NOR e do padrão interno desipramina, condições também usadas nas análises por SPE C18 (FIGURA 9).

A utilização de solução tampão é necessária em cromatografia de troca iônica e cromatografia por filtração em gel e, algumas vezes, em cromatografia líquida em fase reversa. Se compostos iônicos ou ionizáveis (como os ADT) precisam ser separados, geralmente a análise cromatográfica necessita ser realizada em um valor de pH bem definido (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).



**Figura 9** - Cromatograma obtido após extração em fase sólida C18, de solução aquosa fortificada com  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  dos analitos: 1) desipramina (padrão interno), 2) nortriptilina e 3) amitriptilina

A Tabela 2 denota os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico nas condições otimizadas.

**Tabela 2** - Parâmetros de conformidade do sistema ("System Suitability")

Analito	Tempo de retenção	Área dos picos	Pratos teóricos	Resolução	Assimetria 10% (T)	Fator de capacidade
Amitriptilina	14,996	283731	4098,82	2,37	1,70	14,00
Nortriptilina	11,473	297006	3792,55	2,02	1,52	10,47
Desipramina	10,055	356384	3728,19	0,00	1,71	9,06

Assim, os parâmetros obtidos na separação cromatográfica da AMI, NOR e DESI são aceitáveis, com pequeno desvio do fator de capacidade para o padrão interno, o que não compromete a separação.

Usando a cromatografia líquida de alto desempenho e detector de UV, Malfará et al. (2007) otimizaram as condições cromatográficas para monitorização terapêutica de antidepressivos tricíclicos (imipramina, amitriptilina, clomipramina) e não-tricíclicos (fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram, mirtazapina, moclobemida, duloxetina), após a extração líquido-líquido de amostras de plasma. Neste trabalho foi utilizada também a coluna Lichrospher<sup>®</sup> 60 RP (C18) Select B,

Merck® (250 mm x 4 mm x 5 µm) e a fase móvel constituída por uma mistura de 35% de acetonitrila:metanol (92:8 v/v) e 65% de tampão acetato de sódio 0,25 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5, com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> em temperatura ambiente e detecção a 230 nm. Nestas condições os pesquisadores obtiveram excelente separação e picos simétricos para cada analito.

Linden et al. (2008) também usaram uma coluna semelhante, de mesmas dimensões, porém C8, e a fase móvel tampão fosfato pH 2,3: acetonitrila (63:37), na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30°C e detector de arranjo de diodos com varredura entre 200 e 380 nm para a determinação simultânea de AMI, NOR, desmetilnortriptilina e 4 metabólitos hidroxilados em plasma, usando a clomipramina como padrão interno. Os autores obtiveram separação satisfatória para todos os analitos.

Frahnert, Rao e Grasmader (2003) desenvolveram um método por CLAE/UV, após extração por SPE C18, para quantificar 18 antidepressivos e alguns metabólitos: AMI, NOR, IMI, DESI, CLOMI, doxepina, nordoxepina, norclomipramina, trimipramina, maprotilina, normaprotilina (ADT) e os antidepressivos não tricíclicos, mirtazapina, reboxetina, moclobemida, venlafaxina, o-desmetilvenlafaxina, paroxetina, fluvoxamina, fluoxetina, norfluoxetina, sertralina, citalopram, mianserina, amissulprida, clozapina, norclozapina, quetiapina risperidona e 9-OH-risperidona em soro. Para isso utilizaram coluna Nucleosil 100-5-Protect 1® capeada (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) mantida a 25° C. A fase móvel consistia em tampão fosfato monobásico de potássio 0,25 mM (pH 7,0):acetonitrila (60:40), vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e detector ultravioleta a 230 nm. A separação cromatográfica foi satisfatória em análises de amostras de plasma branco fortificado.

Para determinação por CLAE/UV dos ADT doxepina, DESI, IMI, maprotilina e da trazodona, Bakkali et al. (1999), utilizaram coluna Waters Nova-Pack® fase reversa C18 (150 mm x 3,9 mm x 4 µm) e detector ultravioleta a 215 nm. A fase móvel acetonitrila/0,02 mol trietilamina:tampão fosfato 0,75 mol pH 5,5 (35:65), vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, em sistema operado a temperatura ambiente. Nestas condições os picos cromatográficos dos cinco fármacos foram bem separados.

Alguns trabalhos relatam o uso de CLAE/espectrometria de massas na análise de ADT, além de outros grupos de antidepressivos (ALVES et al., 2007;

KIRCHERR, KÜHN-VELTEN, 2006; TITIER et al., 2007), sendo que nesta situação, a separação na coluna cromatográfica não é tão crítica quanto no uso do detector de UV em único comprimento de onda.

A utilização de acetonitrila na fase móvel neste e nos estudos citados indica a viabilidade deste solvente para análises cromatográficas de fármacos com estruturas químicas diversas. Tal fato pode ser justificado pela polaridade intermediária da acetonitrila cuja constante dielétrica é 37,5 (*n*-hexano 1,88; água 80). Para análise de ADT, compostos básicos, valores de pH ácido para fase móvel produz espécies ionizadas, cátions, o que pode melhorar a interação destas com grupos hidroxila da fase estacionária.

## 5.2 Polímeros de ácido metacrílico

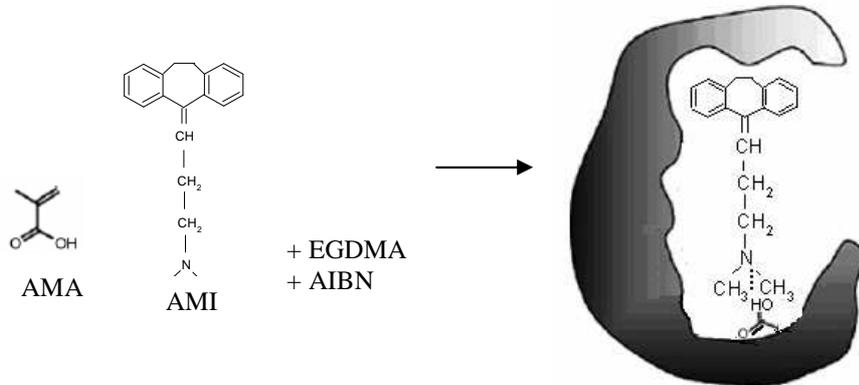
### 5.2.1 Síntese dos polímeros de ácido metacrílico (AMA)

O rendimento da síntese do MIP-AMI e MIP-IMI nas proporções citadas em 4.2.2.1 foi cerca de 600 mg.

O polímero de impressão molecular foi sintetizado a partir de um monômero funcional ácido. A escolha do AMA decorreu do seu largo emprego na síntese de polímeros para análise de grande variedade de moléculas, bem como pela sua disponibilidade pelo laboratório onde a síntese foi realizada. Este, tem sido o monômero mais citado para a síntese de MIP com fármacos de caráter básico (ANDERSSON, 2000b; PICHON, 2007; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a; THEODORIDIS; MANESIOTIS, 2002). Seu uso para estes fármacos é devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre seu grupo carboxílico e grupos funcionais ou átomos do analito que possibilitem esta ligação.

No caso da amitriptilina, as interações com o monômero funcional provavelmente ocorrem através do átomo de nitrogênio terciário terminal da molécula da AMI com o grupo funcional carboxila do monômero caracterizando a formação da ligação de hidrogênio; o restante da molécula molde formada somente

por átomos de carbono se ligaria por forças dipolo induzido à cadeia de 4 carbonos do ácido metacrílico, ligação considerada fraca. A Figura 10 representa a síntese do MIP-AMI.



**Figura 10** – Esquema da formação do polímero para a amitriptilina (AMI), usando-se o ácido metacrílico (AMA), etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN).

A análise estrutural dos sítios de ligação dos MIP não é possível devido à natureza amorfa do material e à distribuição heterogênea das estruturas dos sítios de ligações (SIMON; COLLINS; SPIVAK, 2007).

A síntese dos MIP foi feita usando-se a relação molécula-molde:monômero funcional na proporção de 1:4, sendo que o excesso de AMA objetivou garantir que o mesmo pudesse interagir com todos os sítios disponíveis no molde. Também é importante usar um “excesso” de monômero para deslocar o equilíbrio no sentido da formação do complexo, conforme citado por Martín-Esteban (2001) e Spivak (2005). Entretanto, esses autores alertam que o excesso de monômeros livres tendem a formar sítios de ligação não específicos.

Dos reagentes de ligação cruzada disponíveis, o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) foi o usado, pois é empregado em larga escala e com grande sucesso na síntese de MIP (AL-KINDY et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2007; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a). Este composto apresenta duas unidades vinílicas, uma em cada extremidade da cadeia (FIGURA 7) que provavelmente está envolvida no mecanismo de entrecruzamento das unidades do monômero. Cormack e Elorza (2004) descreveram as importantes funções do agente de ligação cruzada no processo de síntese de MIP: controlar a morfologia da matriz do polímero, estabilizar o sítio de ligação impresso e fornecer estabilidade mecânica a matriz do polímero.

A proporção 1:4:20 molécula molde: monômero funcional: reagente de ligação cruzada tem sido a mais empregada em impressão molecular (FIGUEIREDO et al., 2007; MULDOON; STANKER, 1997; TAMAYO; TURIEL; MARTIN-ESTEBAN, 2007; ).

Cormack e Elorza (2004) descrevem o processo como “polimerização por radical livre”. Normalmente é o método de escolha para preparação dos polímeros de impressão molecular, devido à possibilidade de ocorrência em condições reacionais brandas, isto é, temperatura e pressão atmosférica ambientes, além da disponibilidade comercial de muitos monômeros vinílicos a baixo custo. Este método forma polímeros do tipo adição através do rompimento de ligação  $\pi$ , sendo, portanto, essencial a presença de insaturação nas moléculas dos monômeros.

Para iniciar o processo de polimerização é necessário que haja radicais livres no meio reacional e a síntese ocorre por via radicalar. Para isso é adicionado o iniciador radicalar, o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) que dá início a reação de polimerização (FIGUEIREDO et al., 2007; KHASAWNEH; VALLANO; REMCHO, 2001; VALLANO; REMCHO, 2000; XIE et al., 2003). A razão e o modo de decomposição do iniciador em radicais podem ser desencadeados e controlados por numerosos caminhos, incluindo aquecimento, luz e meios químico-eletroquímicos. Por exemplo, o AIBN pode ser convenientemente decomposto sob condições térmicas ou fotólise (UV), fornecendo ao meio radicais livres capazes de iniciar o crescimento de uma estrutura macromolecular linear poli(vinílica) a partir de monômeros vinílicos, por exemplo (CORMACK; ELORZA, 2004).

O solvente do meio reacional apresenta papel importante na formação da estrutura porosa do MIP, sendo conhecido por polímero macroporoso. Spivak (2005) descreveu os efeitos do solvente no processo. As propriedades morfológicas de porosidade e área superficial são determinadas pelo tipo de solvente, citado como “porogênico”. A porosidade surge pela separação de fase do solvente porogênico do polímero em crescimento durante a polimerização. Porogênicos com baixa solubilidade separam-se do meio rapidamente tendendo a formar poros amplos e materiais com baixa superfície de contato. Ao contrário, porogênicos com alta solubilidade separam-se do meio após a polimerização, fornecendo materiais com poros de tamanho menor e maior superfície de contato. Entretanto, a seletividade e capacidade de ligação do MIP não dependem, em particular, da porosidade.

A acetonitrila foi o solvente usado nesta pesquisa que, apesar de não ser o mais adequado em função da polaridade, dissolveu bem o monômero e os analitos. Por outro lado, em aplicações futuras usando o plasma, seria de interesse usar um solvente na síntese que fosse o mesmo do carregamento da amostra no MISPE e a acetonitrila poderia satisfazer esta condição, por ser um bom precipitante de proteínas. O reconhecimento de uma molécula é maior se o mesmo solvente usado na síntese do MIP for o solvente da amostra (QIAO et al., 2006).

Outro fator comprometedor refere-se à presença de gás oxigênio que retarda o processo de polimerização por atuar como radical livre competidor da reação radicalar. Então, a fim de maximizar a razão de propagação do monômero ao longo da cadeia polimérica, o oxigênio deve ser removido. Isto pode ser alcançado por ultrasonicação ou por borbulhamento de gás inerte sobre a solução, como argônio e nitrogênio (CORMACK; ELORZA, 2004), este último o usado nesta pesquisa.

### 5.2.2 Dessorção da molécula molde

Esta etapa foi a mais trabalhosa e demorada dos trabalhos com o MIP-AMI. Após tentar a dessorção do molde do polímero colocando-o nos cartuchos e lavando-o exaustivamente com metanol:ácido acético nas proporções 9:1, 4:1 e 1:1 e não obter sucesso, passou-se a usar o extrator de Soxhlet e o solvente de extração o metanol:ácido acético (9:1). Este solvente foi o que mais removeu o molde, como atestado pelas maiores área absolutas da AMI na análise cromatográfica. A remoção da molécula molde por lavagem com solvente ácido é mais eficaz devido ao potencial de romper ligações que este apresenta, como aplicado por Farrington; Regan (2007) e Figueiredo et al. (2007).

Neste trabalho, mesmo após extrações sucessivas no Soxhlet, a última em até 72 h, a remoção do molde foi considerada insatisfatória, pois os MISPE preparados com 200 mg do polímero já extraído em Soxhlet e lavado e percolado com várias alíquotas de 10 mL de metanol:ácido acético (9:1) mostravam a presença do molde. Assim, mesmo com o uso de 80 mL do extrator no MISPE as áreas resultantes eram ainda em torno de 39.800.000, ou seja, ainda muito altas (uma massa de AMI de 200 ng mL<sup>-1</sup>, em metanol, injetada no mesmo dia resultou em área de 144.773).

Ainda que menos importante para muitas aplicações, a remoção quantitativa das espécies impressas é crucial para o uso do polímero impresso molecularmente em SPE, especialmente na análise de traços de analitos, como a AMI em plasma (50 – 500 ng mL<sup>-1</sup>). Quanto mais completa a remoção, mais existirão sítios disponíveis livres para o re-ligamento do analito quando da extração da amostra, e menor a possibilidade de lixiviação do molde remanescente no polímero durante as extrações. A completa extração pode requerer o uso de solventes com elevado poder de eluição como o etanol ou metanol contendo ácidos e/ou bases (ANDERSON, 2000a), e que foram testados nesta pesquisa. Na literatura são relatados períodos de 16 h (THEODORIDIS; MANISIOTIS, 2002) e de 72 h (XU *et al.*, 2006), para a remoção do molde (fármaco) de polímeros de ácido metacrílico ou de etilenodimetacrilato, em aparelho de Soxhlet, e usando metanol:ácido acético (9:1) como extrator, testando-se a eficiência em CLAE, com resultados considerados satisfatórios pelos autores. Raschid *et al.* (1997) tiveram de usar 2 x 250 mL de metanol:ácido acético (9:1) seguido de 9 x 100 mL de metanol:ácido acético (4:1) para a remoção do tamoxifeno do polímero, destinado ao MISPE para análise cromatográfica. Qualquer que seja o procedimento de lavagem exaustiva empregado, este não é capaz de remover completamente a molécula molde (SILVA; AUGUSTO, 2006), mas desde que o remanescente do molde não gere resposta (pico) de magnitude significativa para a finalidade da análise cromatográfica, o polímero poderia ser usado na extração em SPE.

Devido às dificuldades na remoção da AMI do polímero, foi feita uma tentativa de uso do um fármaco análogo estrutural da AMI como molde, a imipramina (FIGURA 2), artefato citado por alguns autores (ANDERSSON, 2002, 2004; BLOMGREN *et al.*, 2002; COBB; CARO, 2005; HU; WANG; HE, 2003; PICHON, 2007; THEODORIDIS *et al.*, 2003)

Nesta situação, mesmo que não haja completa dessorção do molde poderia haver liberação de cavidades seletivas suficientes para a adsorção da AMI, especialmente considerando os baixos teores de interesse. Na análise cromatográfica, os resíduos de IMI são separados dos analitos o que viabilizaria a aplicação deste material na pesquisa de AMI nas amostras.

Assim, o MIP-IMI foi sintetizado e tratado de modo similar ao descrito para o MIP-AMI e também, neste caso, não houve dessorção completa do molde. O

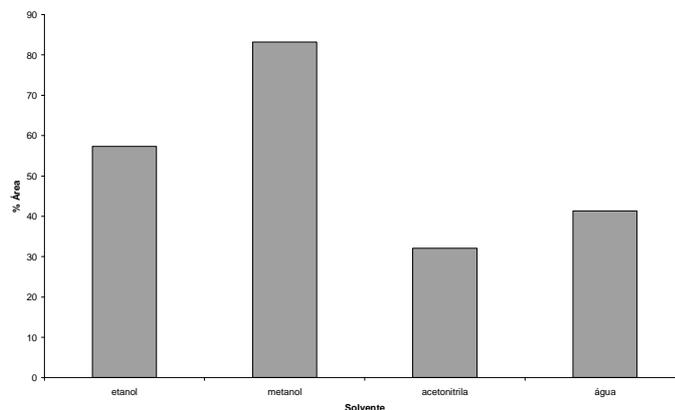
MISPE deste polímero foi então usado na extração de AMI e de NOR de soluções aquosas contendo  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito.

A análise das frações para conferência de limpeza dos cartuchos de NIP indicou a presença de picos significativos, provavelmente resultantes de resíduos da síntese deste polímero, e por isso o polímero não impresso também passou por lavagem no aparelho de Soxhlet, com resultados satisfatórios.

### 5.2.3 Otimização do desempenho da MISPE-IMI

#### *Condicionamento*

Os resultados obtidos, em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE, em função do solvente de condicionamento do cartucho, são mostrados na Figura 11.



**Figura 11** – Efeito do solvente de condicionamento do cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) na extração da amitriptilina (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).

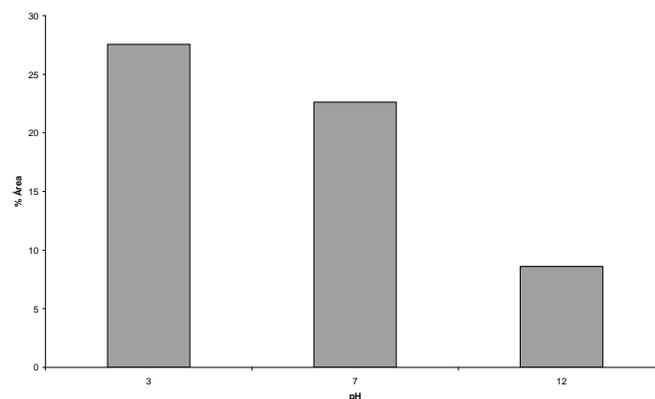
O condicionamento do cartucho é etapa necessária para umedecer e ativar a fase sólida preparando os sítios para se ligarem ao analito, como já mencionado. A exposição do MIP seco aos solventes polares provoca aumento substancial de seu volume. Este efeito provavelmente é devido à solvatação de grupos funcionais insaturados, localizados nas cavidades seletivas do material. A expansão prévia do polímero contribui para tornar a estrutura menos compactada, com poros maiores e

mais acessíveis que aumentam a capacidade de carregamento do material (MAIER et al., 2004).

Dos solventes testados, o metanol apresentou a melhor resposta, ou seja, possibilitou maior extração do analito. Resultado similar foi descrito por Maier et al., (2004), que encontrou um aumento do volume do polímero maior usando este solvente. Assim, espera-se que o material previamente expandido não sofra aumento posterior de volume ao entrar em contato com outros solventes.

#### *Carregamento da amostra*

A amostra utilizada foi solução aquosa de amitriptilina na concentração de 400 ng mL<sup>-1</sup>, variando-se seu pH: 3,0; 7,0; 12,0. A Figura 12 mostra estes resultados.

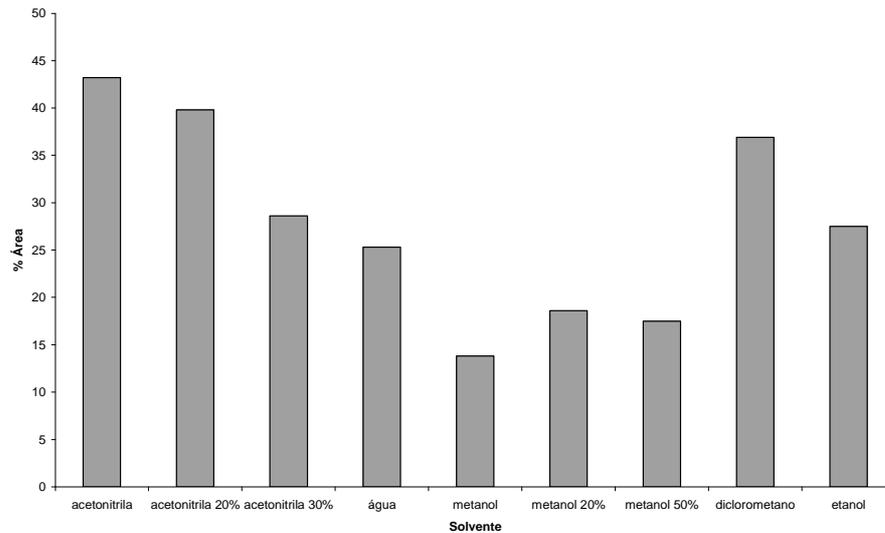


**Figura 12** – Efeito do pH da amostra na extração da amitriptilina de cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).

O pH 3,0 foi o mais adequado, provavelmente por promover maior retenção do analito no polímero. O valor de pH da amostra influencia na capacidade de retenção do analito pelo MIP sendo a permanência da molécula de interesse na forma não-ionizada fundamental para o reconhecimento molecular. No pH mais ácido deve ocorrer a protonação do nitrogênio terminal do analito favorecendo a interação com o grupo carboxila do monômero, ácido metacrílico.

#### *Solvente de limpeza*

Dos solventes de limpeza avaliados, o metanol, no volume de 5 mL, foi o que menos afetou a remoção do analito retido no polímero (FIGURA 13) .

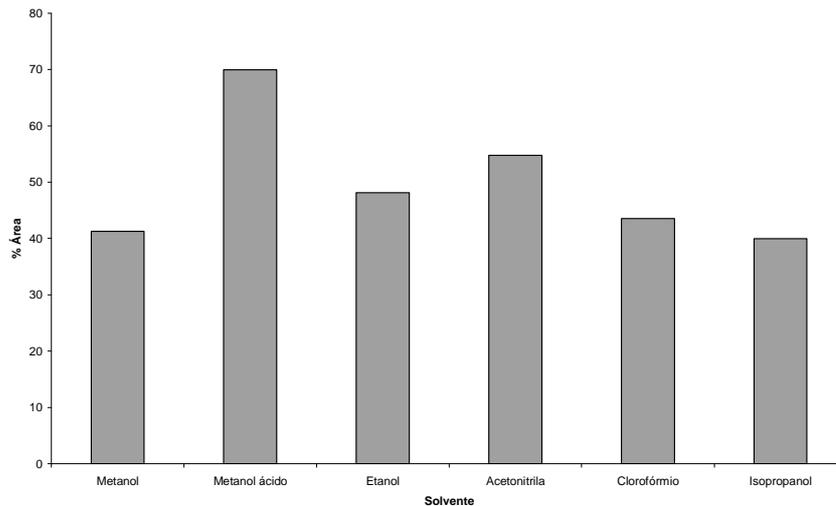


**Figura 13** – Efeito do solvente de limpeza do cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) na extração da amitriptilina (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).

Nesta etapa pretende-se remover do cartucho possíveis interferentes, ligados por interações não-específicas, com mínimo efeito nas interações mais específicas do analito (HE et al., 2007). Também visa promover a dessorção do analito retido por ligações não-específicas, pois a seletividade do MIP às vezes é conseguida com a dessorção seletiva mais de que pela adsorção seletiva (BAGGIANI et al., 2007). O metanol foi o solvente que menos removeu o analito do polímero, provavelmente pelo efeito da repulsão hidrofóbica que favorece a retenção do analito, fato observado por Zhu et al., (2005).

#### *Solvente de eluição*

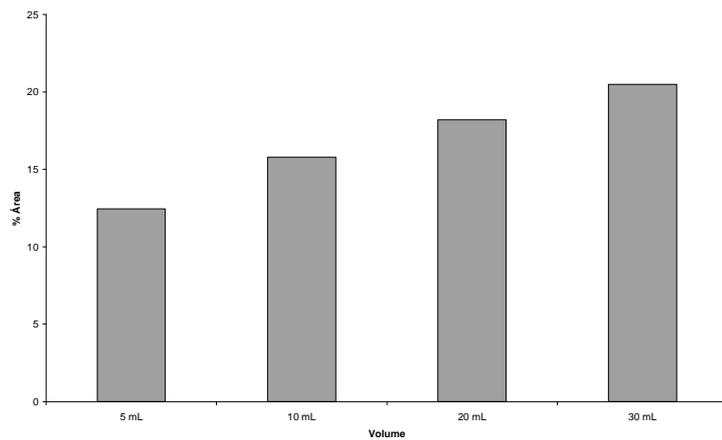
Baseando-se na afinidade preferencial do analito pelo solvente em relação aos sítios de ligação do polímero, verificou-se que metanol:ácido acético (9:1) forneceu o maior sinal analítico (FIGURA 14).



**Figura 14** – Efeito do solvente de eluição na extração da amitriptilina de cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).

Para que ocorra eluição, o solvente deve apresentar afinidade pelo analito maior de que a fase sólida. O metanol:ácido acético (9:1), que forneceu melhor resposta, já tinha mostrado a capacidade de dessorver o molde quando usado no extrator de Soxhlet. Entretanto, como mencionado anteriormente, a remoção do molde não foi completa. Na eluição dos analitos, agora presentes em baixas quantidades, o aumento do volume do solvente teve um efeito positivo na eluição, isto é, quanto maior o volume, maior a quantidade de analito extraída (FIGURA 15). Entretanto, devido à dificuldade de se concentrar volumes elevados antes da introdução no sistema cromatográfico, o volume de 20 mL foi o selecionado para estudos futuros.

Vale ressaltar ainda que o solvente apresenta um limite de eluição, independente do volume que se aplica, não sendo necessário, portanto, o emprego de grandes volumes. O volume usado não afeta o enriquecimento da técnica, como descrito para outras aplicações do polímero (HE et al., 2007), pois os extratos são levados à secura e ressuspensos em pequeno volume (100 µL) de fase móvel antes da injeção no CLAE.



**Figura 15** – Efeito do volume do solvente de eluição (metanol:ácido acético, 9:1) na extração da amitriptilina de cartucho contendo o polímero de ácido metacrílico e molécula molde imipramina (MISPE-IMI) (em % de área do pico de AMI nos extratos com relação à área de mesma massa do analito injetada diretamente no CLAE).

Uma vez otimizadas as condições para uso do MISPE-IMI, foram realizados experimentos, ainda com amostras aquosas, para avaliar a repetitividade do método. Mesmo após várias tentativas, não se conseguiu resultados precisos, e CV tão elevados quanto 84,3% para a NOR e 100,5% para a AMI foram observados, o que impossibilitou a continuidade dos estudos com este polímero. Talvez a baixa precisão seja ocasionada, em parte, por variações na disposição das cavidades seletivas expostas para ligação do analito, especialmente considerando a reutilização dos cartuchos por diversas vezes.

Também por este motivo, ensaios da seletividade MIP x NIP, isto é, capacidade de retenção do analito no polímero impresso e no não impresso, (fator de impressão), não mostraram resultados coerentes que pudessem ser usados para discussão deste tópico.

### 5.3 Polímeros de 3-aminopropiltrimetoxissilano

Não tendo sido obtidas condições adequadas para uso do polímero de ácido metacrílico, nas condições em que foi possível sintetizá-lo, e havendo sido recentemente publicado um trabalho mostrando as vantagens do uso de ormosil como monômero na síntese de polímeros de impressão molecular para uso em

SPE (SILVA; AUGUSTO, 2006), houve interesse de se usar este polímero na síntese do MIS. Inicialmente usou-se a amitriptilina e, posteriormente, a nortriptilina como molécula molde nesta síntese. Os resultados e a discussão para estes dois polímeros serão apresentados em conjunto para evitar repetições de informações, como também para facilitar a leitura do texto.

### 5.3.1 Síntese dos ormosils

O rendimento aproximado da síntese dos polímeros, realizada conforme descrito em Silva e Augusto (2006), foi de 1200 mg.

A escolha do APTMS deve-se à sua disponibilidade pelo laboratório onde a síntese foi realizada. Por outro lado, possibilita a formação de ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio ligados ao grupo amina primária terminal da cadeia lateral  $(CH_2)_nNH_2$  do polímero e átomos de nitrogênio presentes na cadeia lateral dos analitos, nos casos da amitriptilina e nortriptilina. Os trialcóxidos silanos, como o APTMS, são frequentemente usados como modificadores de rede, por fornecerem propriedades específicas, como hidrofobicidade, reatividade e flexibilidade, à matriz inorgânica (COLLINSON, 1998).

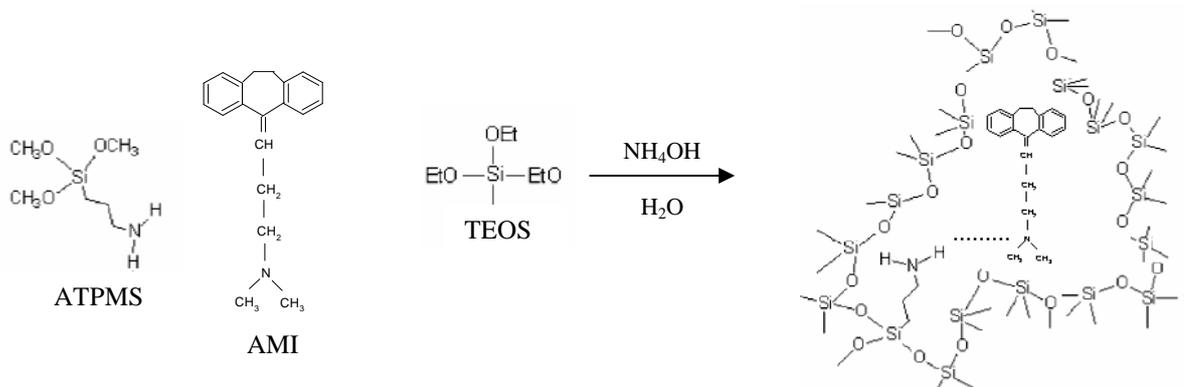
Neste estudo, o APTMS foi hidrolisado e condensado com um precursor siliconado, TEOS, na proporção 1:4. A adição de TEOS é justificada pelo aumento de conectividade da rede.

De acordo com Cummins, Duggan e Mcloughlin (2005), a típica preparação sol-gel consiste em dois estágios. Primeiramente a hidrólise dos monômeros na ausência da molécula molde, seguido pelo passo da condensação na presença da molécula molde. Por isso a importância da ordem de adição dos reagentes. A hidrólise é promovida entre 2 a 3 h (COLLINSON; WEI, 1999; CUMMINS; DUGGAN; MCLOUGHLIN, 2005), dependendo do tamanho dos precursores organosiliconados. Neste estudo, que partiu de dois precursores - APTMS e TEOS - de cadeias relativamente pequenas, foi feita a adição simultânea dos reagentes e da molécula molde, em uma só etapa. Por outro lado, há dificuldade em se separar claramente as duas etapas, sendo freqüente o início da condensação antes da hidrólise completa (COLLINSON, 1998; WEN; WILKES, 1996).

O processo sol-gel foi usado sob condições básicas, conforme descrito em 4.2.3.1, o que implica na formação de materiais mais porosos, segundo Collinson (1998).

O mecanismo de polimerização sol-gel não utiliza a via radicalar, e sim a hidrólise e condensação; portanto, a presença de oxigênio não compromete a formação do polímero, como nos sintetizados a partir de acrilatos.

Na Figura 16 é sugerida a formação do polímero com a amitriptilina como molde.



**Figura 16** – Esquema da formação do polímero para a amitriptilina (AMI), usando-se o 3-aminopropiltrimetoxissilano (ATPMS) e tetraetilortosilicato (TEOS).

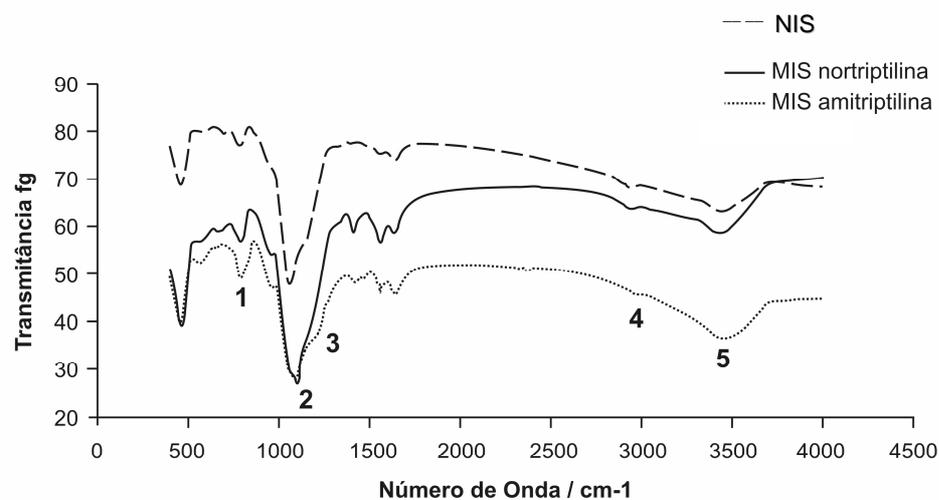
### 5.3.2 Dessorção da molécula molde

Todo conteúdo obtido no processo de síntese do MIS-AMI e do MIS-NOR, foram submetidos a extração exaustiva para remoção das moléculas molde no aparelho de Soxhlet. O solvente extrator foi metanol:ácido acético (9:1) em um tempo total de extração de 72 h. Para monitoramento da presença de molécula molde residual no cromatógrafo a líquido, 200 mg do MIS foram colocadas em cartucho de polipropileno e submetidas a lavagem com alíquotas de 10 mL de metanol:ácido acético (9:1). Os resultados obtidos indicaram a eficácia do processo para a remoção dos moldes o que tornou viável o uso dos MIS para os experimentos em SPE. Na síntese de MIS usando a cafeína como molde, Silva e Augusto (2006) relataram que 12 h de extração em Soxhlet foram suficientes para remoção satisfatória da cafeína.

### 5.3.3 Caracterização dos polímeros

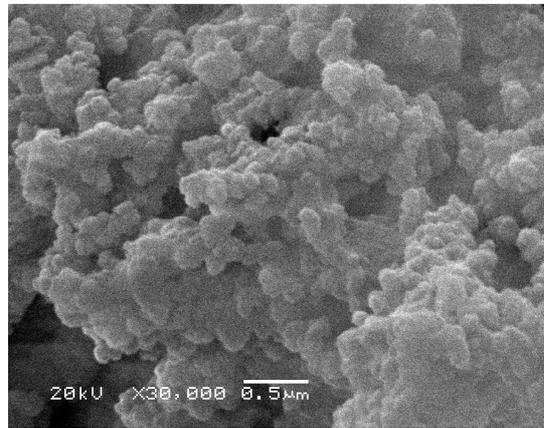
Como sólidos insolúveis, os polímeros de impressão molecular não podem ser caracterizados por métodos geralmente usados para polímeros comuns, que requerem o preparo de uma solução do material. Mesmo assim, alguns testes podem ser feitos para auxiliar a caracterização química e morfológica do material: a caracterização química por análise micro elementar, infravermelho e ressonância magnética nuclear do estado sólido; a morfológica pode ser obtida através de microscopia de varredura eletrônica, porosimetria de sorção de nitrogênio e porosimetria de intrusão de mercúrio (CORMACK; ELORZA, 2004).

Nesta pesquisa foi utilizada a espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier na caracterização química dos polímeros MIS-AMI, MIS-NOR e NIS (FIGURA 17). Pelo espectro de infravermelho pode-se perceber que não há diferença significativa entre as moléculas do polímero impresso e do não impresso. Isso já era esperado, uma vez que foram sintetizadas com os mesmo reagentes (APTMS e TEOS), exceto pela adição da molécula molde no polímero de controle. Pode-se observar, porém, que na banda 3, a absorção é maior para o MIS de que para o NIS, uma vez que a análise espectrofotométrica do MIS foi feita antes da remoção do molde. A banda é maior devido ao nitrogênio presente nas moléculas molde usadas.

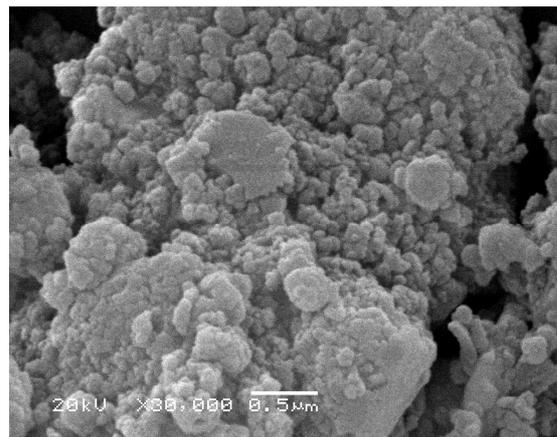


**Figura 17** – Espectro de absorção infravermelho (KBr) do MIS e NIS. Bandas de absorção: (1)  $810\text{ cm}^{-1}$  (metil C-H), (2)  $1107\text{ cm}^{-1}$  (Si-O), (3)  $1273\text{ cm}^{-1}$  (N-C), (4)  $2969\text{ cm}^{-1}$  (metil C-H) e (5)  $3428\text{ cm}^{-1}$  (-OH).

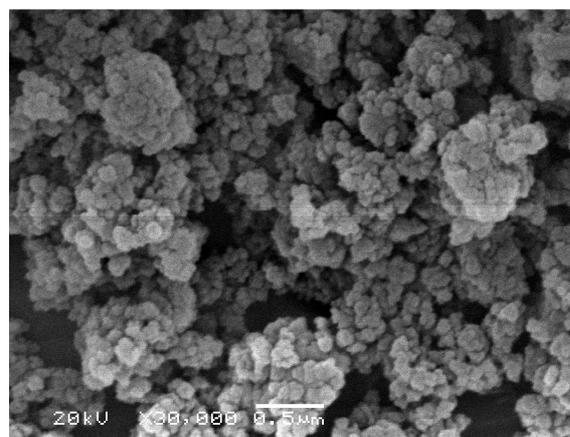
A caracterização morfológica dos polímeros MIS-AMI, MIS-NOR e NIS foi realizada pela microscopia de varredura eletrônica e os polímeros aparecem como agregados de partículas irregulares (FIGURAS 18, 19 e 20).



**Figura 18** - Microscopia eletrônica de varredura da MIS – Amitriptilina. (aumento de 30000 vezes)



**Figura 19** - Microscopia eletrônica de varredura da MIS- Nortriptilina. (aumento de 30000 vezes)



**Figura 20** - Microscopia eletrônica de varredura da NIS. (aumento de 30000 vezes)

Estas irregularidades são causadas pela trituração dos materiais, necessária para pulverizar o monólito obtido na síntese. No uso de polímeros em SPE, a irregularidade das partículas não tem sido apontada como um problema, ao contrário de quando sua finalidade é o empacotamento de colunas cromatográficas, o que seria causador dos picos largos e assimétricos (CUMMINS; DUGGAN; MCLOUGHLIN, 2005; QIAO et al., 2006).

As partículas do NIS são menores com relação às do MIS, provavelmente devido a diferenças na velocidade de reações no início da síntese: não usando a solução saturada do analito mas apenas água, a condensação do reticulócito da sílica cresceria mais rapidamente ao redor do núcleo de condensação inicial suspenso na fase sol para o NIS.

Geralmente, os polímeros impressos apresentam maior área superficial de que os não impressos (FARRINGTON; REGAN, 2007). Por outro lado, a superfície do NIS mostrou-se mais escamada quando comparada com o polímero impresso o que reforça as diferentes morfologias dos dois polímeros.

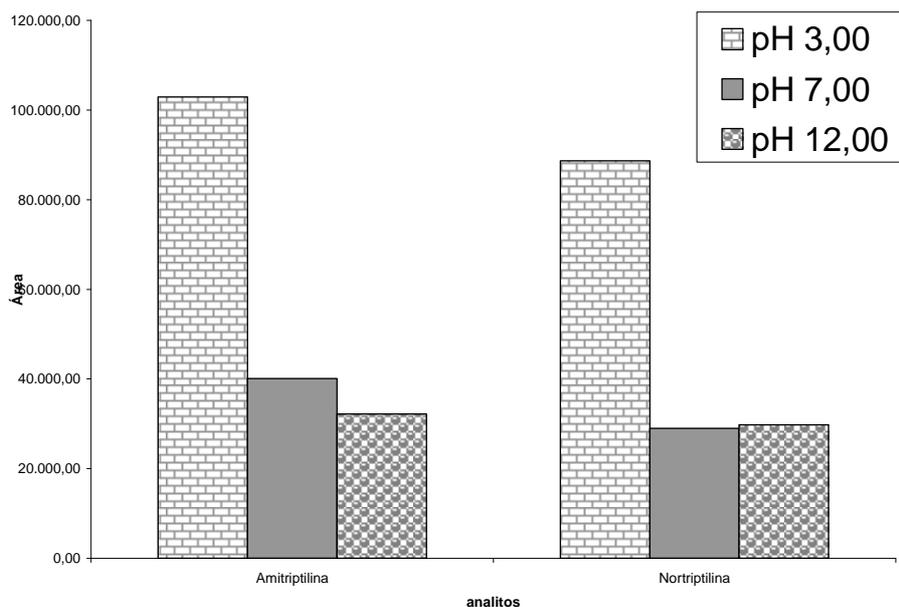
#### 5.3.4 Otimização do desempenho do MISPE

O empacotamento dos cartuchos foi realizado com 200 mg do polímero, quantidade duas vezes maior de que a usada por Silva e Augusto (2006) quando do desenvolvimento do MIS para a cafeína, uma vez que a amostra de interesse na pesquisa é mais complexa, o plasma, ainda que com concentrações menores dos analitos (cerca de 20 vezes menor), com relação às amostras de água e de urina utilizadas por aqueles autores.

O condicionamento dos cartuchos foi realizado como preconizado por Silva e Augusto (2006), com a finalidade de umedecer e ativar sítios do polímero.

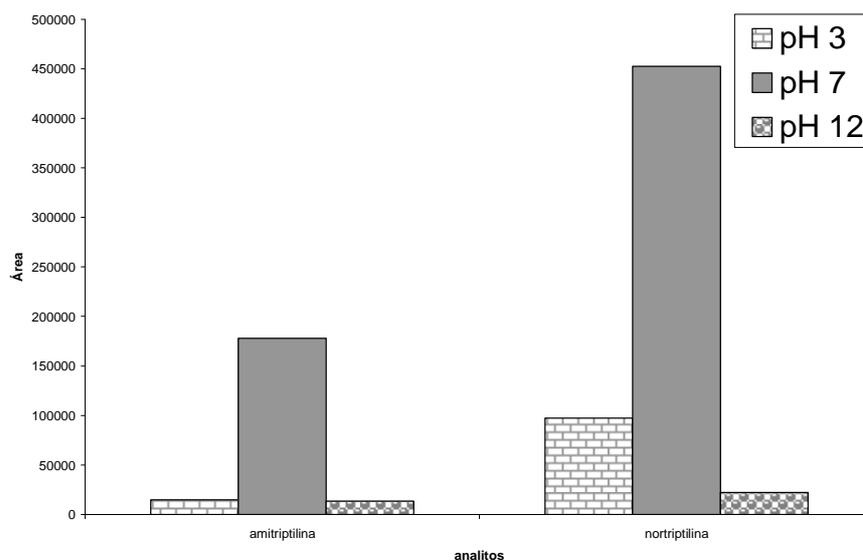
As amostras usadas na otimização das variáveis do MIS foram amostras aquosas de AMI e NOR, 400 ng mL<sup>-1</sup> e usando-se 1 mL, mesmo volume que seria usado, posteriormente, de plasma.

Considerando-se a estrutura dos analitos e dos sítios de ligação dentro das nanocavidades, provavelmente aminoácidos que podem ser protonados e desprotonados na dependência do pH, este efeito foi avaliado nos pH 3,0; 7,0 e 12,0. As Figuras 21 e 22 mostram os resultados para o MIS-AMI e o MIS-NOR.



**Figura 21** – Efeito do pH da amostra na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos)

A natureza das interações entre os analitos e os sítios ligantes do polímero, eletrostáticas, faz predizer que a carga nos sítios de ligação pode ser um fator importante na capacidade do material para reter espécies. Por outro lado, os analitos também podem apresentar características afetadas pelo pH do meio que interferem em suas retenções no polímero.



**Figura 22** - Efeito do pH da amostra na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).

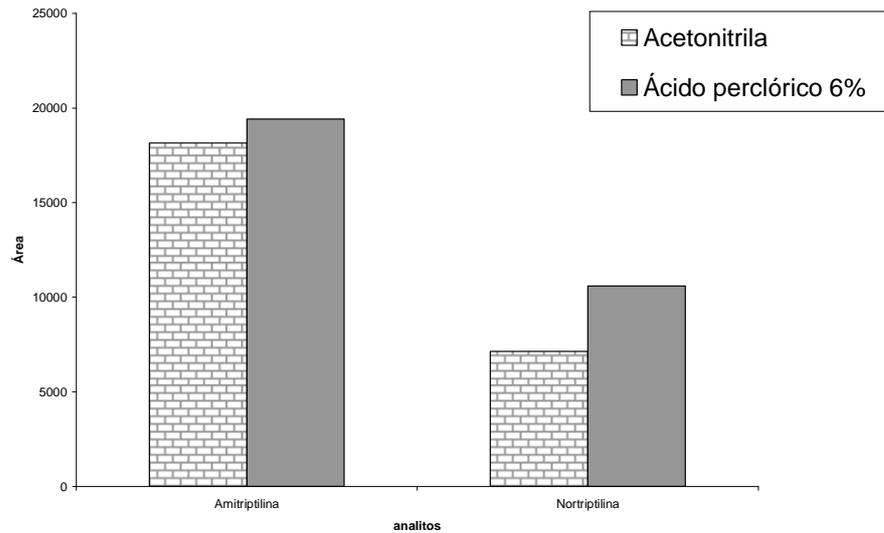
Pode-se observar que usando-se o MIS-AMI, o pH que mais favoreceu a retenção foi o ácido e com o MIS-NOR, o neutro. Talvez no pH 3,0, o nitrogênio do grupo ativo do polímero estando protonado favoreça a interação do N terminal dos analitos de interesse. No pH 7,0, provavelmente é o N dos analitos que estará protonado, favorecendo a interação.

O efeito final resultante do pH sobre a eficiência da extração poderá ser resultante de efeitos simples sobre a carga dos analitos e sobre os sítios ativos. Considerando a complexidade envolvida na estimativa de todas as tendências, a otimização do pH deverá ser essencialmente empírica (Silva; Augusto, 2006).

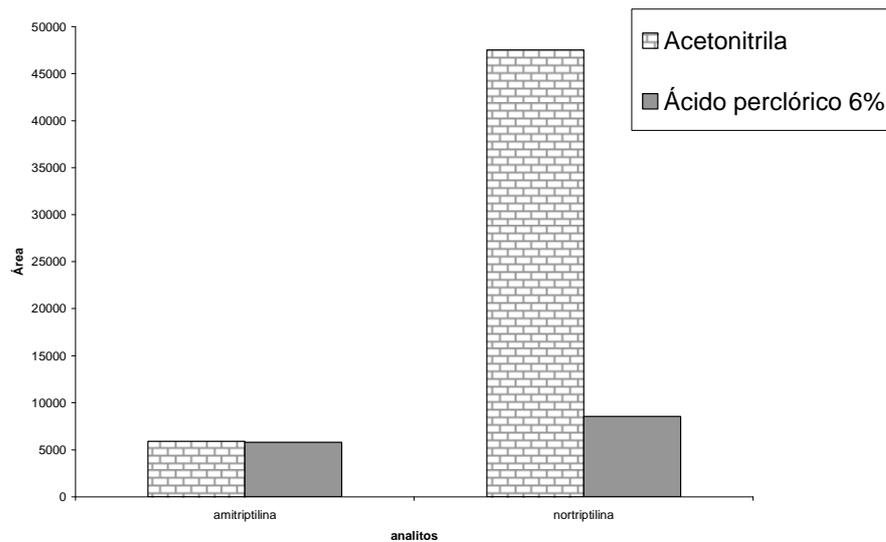
O tratamento prévio do plasma antes de uma extração em MISPE é necessário uma vez que a presença de grandes quantidades de proteínas diminui a vida útil do cartucho de MIS, podendo afetar a retenção dos analitos nas cavidades, além de danificar o sistema cromatográfico. Por outro lado, tanto a AMI quanto a NOR apresentam elevadas taxas de ligação protéica, o que poderia afetar suas retenções nas cavidades-sítio do polímero.

Assim, foram testados dois agentes precipitantes de proteínas para o prévio tratamento de amostras de plasma: o ácido perclórico 6% (peso/volume) e a acetonitrila. O  $\text{HClO}_4$  foi usado na proporção de 0,8:1 mL de amostra e a acetonitrila na proporção de 2:1 de amostra, quando se espera precipitação acima de 99% das proteínas presentes (FLANAGAN et al., 2006). Infelizmente, quando da precipitação, sempre ocorre perda parcial dos analitos. Após a precipitação, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante obtido foi usado para o carregamento dos cartuchos. As Figuras 23 e 24 denotam estes resultados.

O tratamento da amostra de plasma com ácido perclórico 6% ofereceu as melhores condições para posterior extração usando-se o MIS-AMI, ainda que as diferenças não tenham sido elevadas. O pH do sobrenadante fica em torno de 2,0, valor próximo ao observado como ótimo na avaliação do pH da amostra (FIGURA 21). A acetonitrila revelou-se o reagente mais adequado para uso com o MIS-NOR na extração de nortriptilina, porém sem diferença do  $\text{HClO}_4$  na extração da AMI. O sobrenadante desta precipitação (~2,5 mL) foi também totalmente usado no carregamento dos cartuchos, e seu pH estava em torno de 8,0, portanto, próximo ao tido como adequado no uso deste polímero (FIGURA 22).



**Figura 23** – Efeito do agente precipitante de proteínas do plasma na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de polímero de 3-aminopropiltrimetoxisilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos).



**Figura 24** – Efeito do agente precipitante de proteínas do plasma na extração de amitriptilina e nortriptilina de cartuchos de polímero de 3-aminopropiltrimetoxisilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).

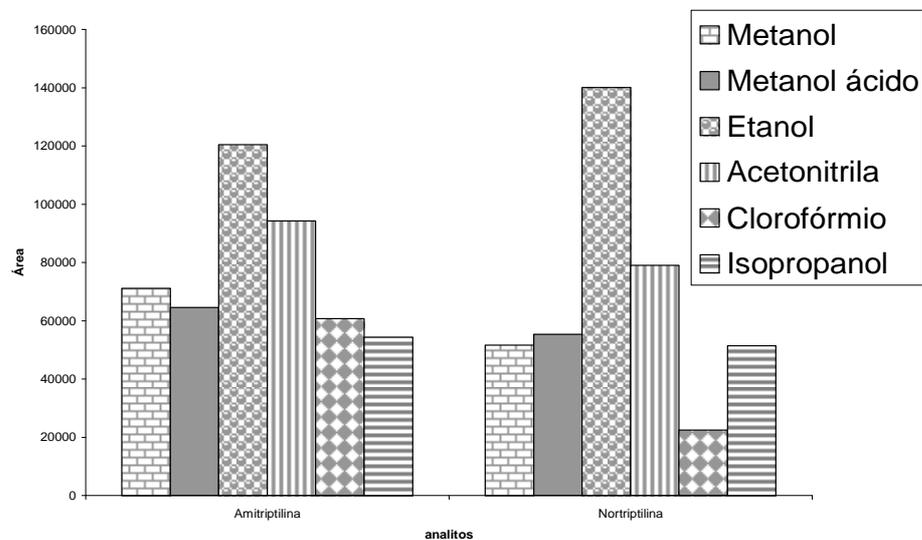
Na tentativa de melhorar o desempenho dos cartuchos para a extração de AMI e NOR nas amostras de plasma, também foi avaliado pré-tratamento da amostra por extração líquido-líquido, o que, entretanto, não melhorou a resposta. Por outro lado, seu valor prático seria questionável, se necessária, pois envolveria o uso de duas diferentes técnicas de extração (ELL e MISPE) o que tornaria o procedimento demorado e com maior consumo de solventes.

### Limpeza

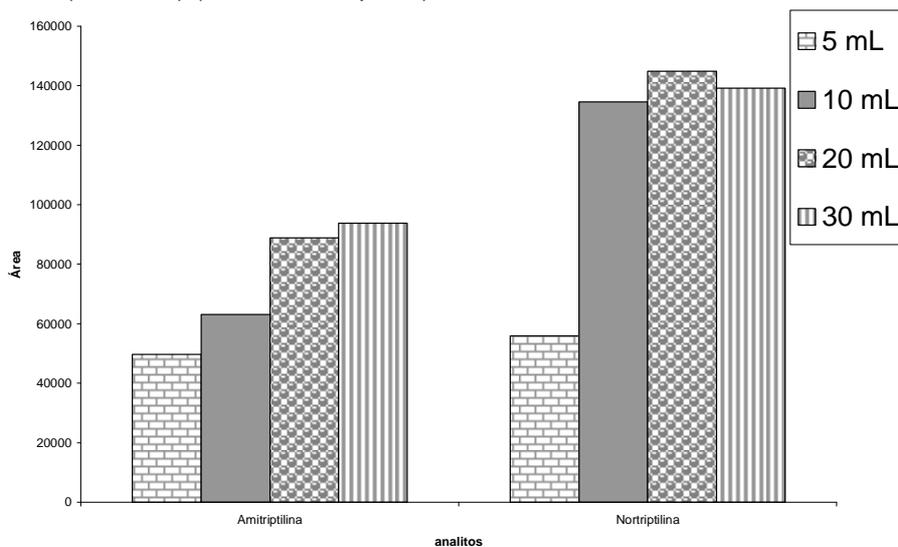
O solvente usado para remoção de interferentes, após o carregamento dos cartuchos, foi o preconizado por Silva e Augusto (2006), o metanol, no volume de 2 mL para o MIS-AMI e de 5 mL para o MIS-NOR.

### Eluição

O etanol foi o solvente de eluição que resultou em maior sinal analítico no uso do MIS-AMI (FIGURA 25), no volume de 10 mL (FIGURA 26).

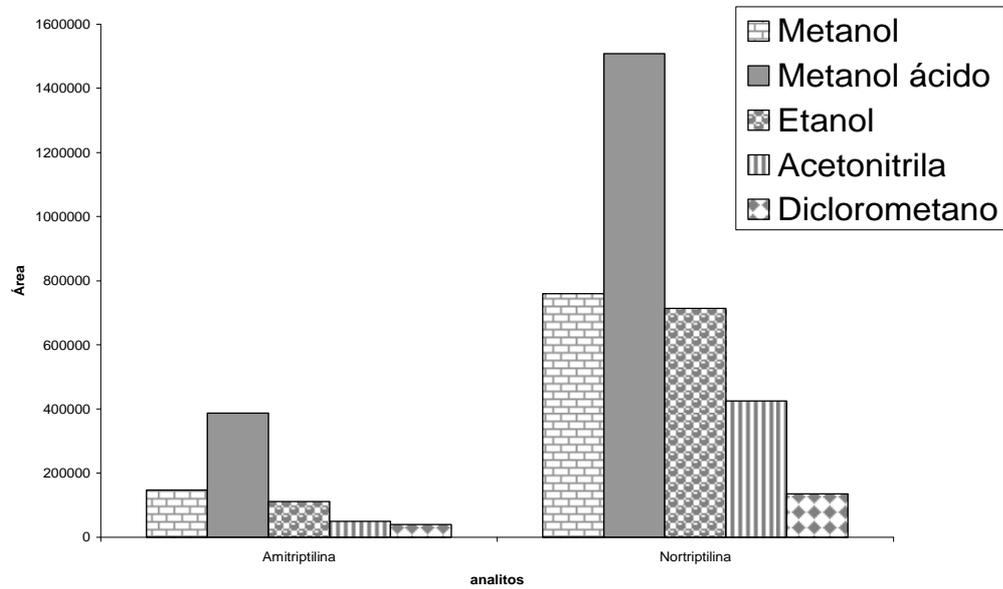


**Figura 25** – Efeito do solvente de eluição na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos).

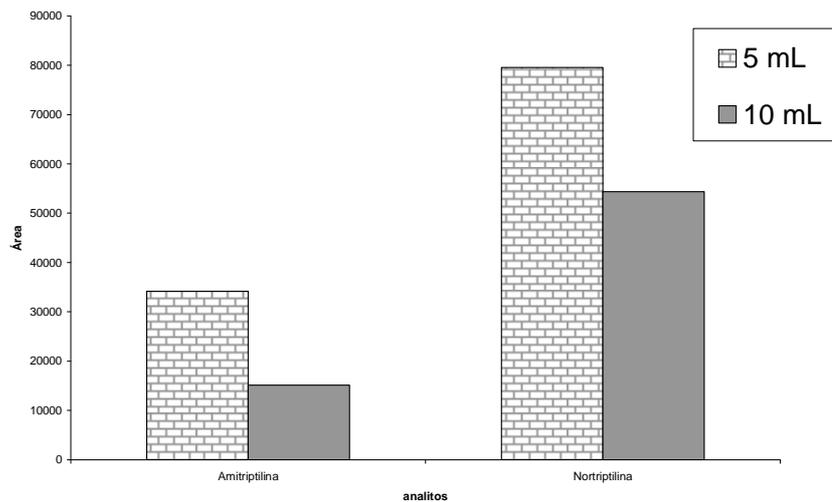


**Figura 26** - Efeito do volume do solvente de eluição (etanol) na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (MIS-AMI) (em área dos picos).

A Figura 27 mostra que para eluir os analitos nos cartuchos de MIS-NOR, o metanol:ácido acético (9:1), foi o solvente de melhor resposta, no volume de 5 mL (FIGURA 28).



**Figura 27** - Efeito do solvente de eluição na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxisilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).



**Figura 28** - Efeito do volume do solvente de eluição (metanol:ácido acético, 9:1) na extração da amitriptilina e nortriptilina de cartucho contendo o polímero de 3-aminopropiltrimetoxisilano e molécula molde nortriptilina (MIS-NOR) (em área dos picos).

Para que ocorra a eluição, o solvente deve apresentar afinidade pelo analito maior que a própria fase sólida. Consequentemente, o analito deve ser amplamente solúvel neste solvente.

O etanol é um solvente polar, mas não tão polar quanto o metanol ou metanol ácido, o que provavelmente contribuiu para que o nitrogênio terminal da AMI e o nitrogênio do monômero não ficassem polarizados, diminuindo assim a interação por cargas que se daria entre a molécula molde e o monômero MIS-AMI e facilitando a eluição. Um volume de 10 mL foi o escolhido para os testes posteriores, ainda que não seja o que resultou em maior extração de AMI; porém, considerado suficiente para gerar um sinal satisfatório nas análises, além de diminuir o gasto do N<sub>2</sub> para remoção do solvente.

Para o MIS-NOR, o metanol acidificado demonstrou melhores condições na eluição dos analitos, provavelmente por polarizar o nitrogênio da cadeia lateral dos analitos e o nitrogênio do monômero, estabelecendo cargas contrárias, gerando uma repulsão e favorecendo a eluição. O volume de 5 mL foi suficiente para remoção satisfatória dos analitos.

### 5.3.5 Seletividade dos polímeros

Os fatores de impressão (FI) para a AMI e a NOR foram avaliados pela extração de solução de igual concentração dos analitos em cartuchos de MIS e em cartucho contendo polímero não impresso (NIS). Testou-se também a seletividade para outros antidepressivos do grupo dos tricíclicos, como a clomipramina e imipramina para o MIS-AMI e, além desses, também para a desipramina para o MIS-NOR.

A Tabela 3 mostra os fatores de impressão para os compostos testados nos dois polímeros.

O polímero MIS-AMI revelou fatores de impressão decrescentes para a nortriptilina, amitriptilina, clomipramina e imipramina; para o MIS-NOR, clomipramina, nortriptilina, desipramina, imipramina e amitriptilina. Entretanto, as

diferentes seletividades MIS *versus* NIS não estão muito afastadas, o que era de se esperar para compostos estruturalmente semelhantes (FIGURA 2).

**Tabela 3** – Fatores de impressão (razão da resposta MIS *versus* NIS) dos fármacos antidepressivos tricíclicos nos dois polímeros testados (MIS-AMI e MIS-NOR)

Fármaco	MIS-AMI	MIS-NOR
Amitriptilina	2,5	1,7
Nortriptilina	2,6	3,5
Clomipramina	1,3	7,4
Imipramina	1,1	2,5
Desipramina	-	2,5

A diferença química estrutural predominante entre os compostos da classe dos ADT é a presença de um heterociclo central nas moléculas de CLOMI, DESI e IMI, sendo para as moléculas de AMI e NOR a presença de cadeia lateral insaturada. Pode-se destacar ainda a presença de grupo amina terminal terciário para AMI, CLOMI e IMI, sendo grupo amina terminal secundário para NOR e DESI. Os átomos de nitrogênio presentes no heterociclo e na cadeia lateral são relevantes na interação fármaco-polímero, por meio de ligação de hidrogênio. Ao restante da molécula predominam-se interações dipolo induzido.

Silva e Augusto (2006) relataram um fator estimado em 20,5 para a cafeína no MIS X NIS e sugeriram que a maioria da cafeína era retida por ligações específicas, o que não foi a situação observada nesta pesquisa, que demonstram que ligações inespecíficas devem predominar.

Infelizmente, o polímero MIS-AMI não apresentou resposta coerente satisfatória para continuidade dos experimentos. A variação dos resultados a cada teste comprometeu a repetitividade dos resultados destes materiais para aplicação de preparo de amostras. A síntese de MIS-NOR seria uma possível alternativa caso também não tivesse mostrado problemas de precisão nas medidas. Foi ainda feita tentativa de gerar curva analítica para este polímero, porém, sem sucesso, com valores de áreas de pico às vezes maiores para concentrações mais baixas. Somado a este fator comprometedor, vale destacar que a vida útil dos cartuchos de MIS, quando aplicados em amostras reais, após precipitação protéica, foi muito baixa, em torno de duas extrações. Para amostras teste, aquosas, os cartuchos foram usados em torno de oito vezes. O pequeno número de extrações foi

decorrente da resposta mais variável do polímero com o aumento do uso, como também da obstrução da fase sólida à passagem dos solventes, muitas vezes já observada em cartuchos novos. Silva e Augusto (2006) relataram o uso do cartucho em até vinte extrações em amostras de urina.

## 5.4 Extração em fase sólida octadecila

É aconselhável que um método desenvolvido e validado num laboratório em uma ocasião tenha de ser parcialmente revalidado após um período de tempo, mudanças de marcas de materiais, equipamentos, reagentes entre outros, que podem afetar o desempenho e, conseqüentemente, a validade de dos resultados por ele gerados. De fato, a revalidação seria a reavaliação de um método analítico validado em resposta a mudança de algum aspecto do mesmo (RIBANI et al., 2004).

Assim, o método de análise de AMI e NOR, descrito em 4.2.4, desenvolvido e validado no Laboratório de Análises Toxicológicas, foi revalidado para esta pesquisa. Os parâmetros de validação escolhidos para este estudo foram: linearidade, precisão, limite de quantificação e recuperação relativa.

### 5.4.1 Linearidade

As Figuras 29 e 30 denotam as curvas analíticas obtidas para a AMI e a NOR extraídas de plasma por SPE C18, as respectivas equações das retas e coeficientes de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $R^2$ ). O  $r$  está dentro valor preconizado pela Anvisa (BRASIL, 2003), de igual ou superior a 0,98. Pode-se observar, pelo coeficiente angular, que a sensibilidade do método para os dois analitos é semelhante. Esta faixa dinâmica é satisfatória para determinação dos analitos desde o limite inferior até o superior da faixa terapêutica, assim como em estudos de biodisponibilidade do fármaco.

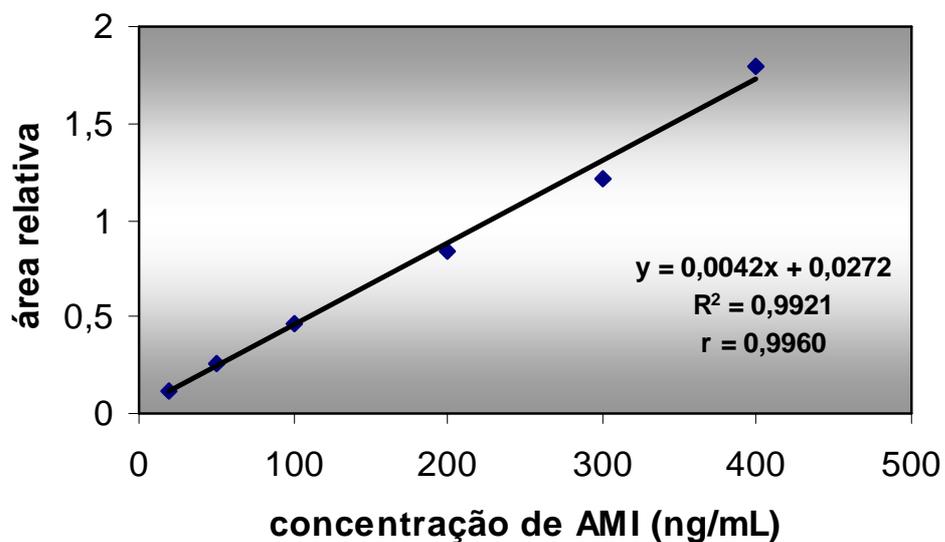


Figura 29 - Curva analítica para a amitriptilina, extraída em cartucho octadecila por SPE.

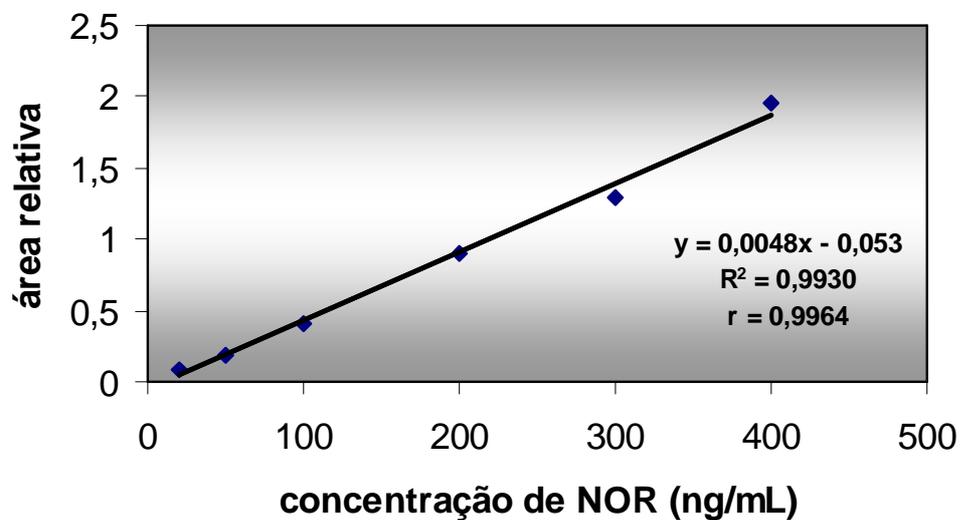


Figura 30 - Curva analítica para a nortriptilina, extraída em cartucho octadecila por SPE.

### 5.4.2 Precisão

A precisão é um critério importante na avaliação de um método, pois determina os erros aleatórios da análise. A precisão neste trabalho foi expressa como coeficiente de variação, cujos valores são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Precisão intra-ensaios e interensaios de amitriptilina (AMI) e nortriptilina (NOR) por SPE C18 e CLAE

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	% CV intra-ensaios		% CV interensaios	
	AMI	NOR	AMI	NOR
20	16,4	14,8	19,2	17,5
50	3,2	9,5	3,1	9,7
300	6,5	10,0	8,6	12,6

Os valores obtidos podem ser considerados satisfatórios, ou seja, % CV menores do que 20% no LQ e abaixo de 15% nas demais concentrações (ANVISA, 2003).

### 5.4.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação determinado foi de 20 ng mL<sup>-1</sup> para AMI e NOR.

No estudo de desenvolvimento deste método em época anterior, valor de 10 ng mL<sup>-1</sup> foram obtidos para ambos analitos, porém, usando-se cartuchos de C18 de marca/procedência diversa.

### 5.4.4 Recuperação

O estabelecimento da recuperação é essencial para avaliar a eficiência do método de extração, pois durante o preparo da amostra por SPE podem ocorrer

perdas por extração incompleta, em SPE, devido principalmente às perdas durante a lavagem e durante a eluição, ou ainda devido às vazões elevadas dos solventes no cartucho.

A Tabela 5 denota os percentuais de recuperação obtidos para as três concentrações estudadas evidenciando a boa recuperação dos analitos pelo método.

**Tabela 5** – Recuperação (%) do método de análise de amitriptilina (AMI) e nortriptilina (NOR) por SPE C18

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	
	AMI	NOR
20	98,2	89,5
50	96,1	97,8
300	103,2	94,3
média	99,1	93,8

O método foi aplicado na análise de amostras de dois pacientes em uso de amitriptilina, resultando num valor de 259,3 e de 178,0 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente para a amitriptilina e nortriptilina para o paciente A. O paciente B mostrou valores de 128,3 e de 117,3 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente para a amitriptilina e nortriptilina, em amostra coletada antes da ingestão da dose da manhã.

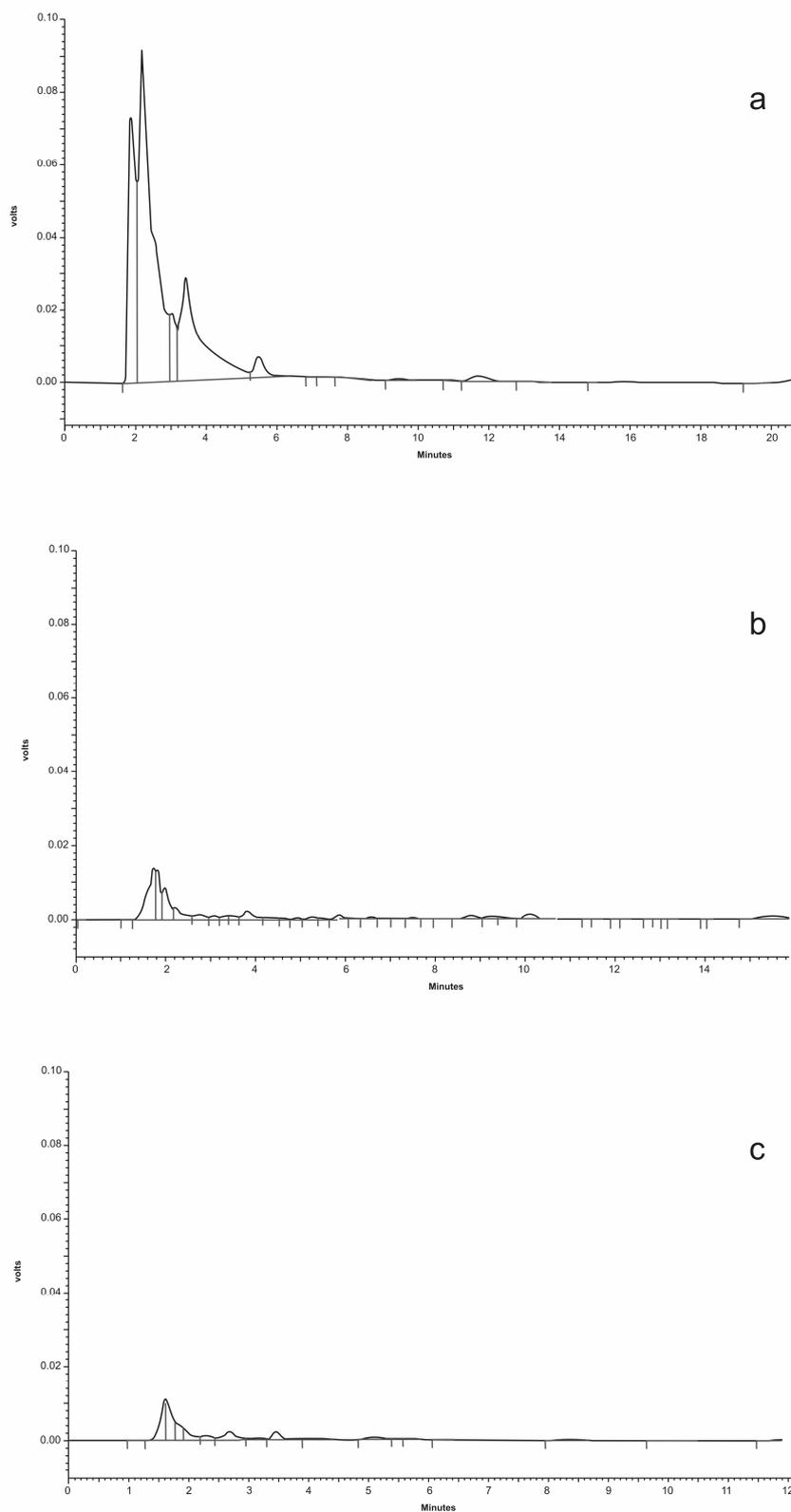
A extração líquido-líquido é ainda muito utilizada na análise dos ADT (LINDEN et al., 2007; MALFARÁ et al., 2007; TITIER et al, 2007). Alguns autores descrevem o uso de extração em fase sólida, geralmente para análise de vários antidepressivos simultaneamente. Jasinska, Starczewska (2003), aplicaram a técnica para extração de AMI em SPE C18 e da IMI e clorprotixina em SPE cicloexila em amostras de plasma, seguida de detecção espectrofotométrica, com recuperação entre 96 a 103%. Frahnert, Rao e Grasmader (2003) usaram a SPE em disco com sorvente de fase mista, para isolamento de antidepressivos, dentre eles a AMI e NOR, e antipsicóticos atípicos de amostras de plasma. Os parâmetros de validação obtidos foram linearidade entre 30 e 500 ng mL<sup>-1</sup> ( $r = 0,9993$ , para AMI, e  $0,9991$  para NOR), recuperação entre 91,2 e 107,2%, precisão intra-ensaio entre 1,1 e 9,4% e precisão interensaio entre 0,9 e 9,7%. 007, Samanidou, Nika, Papadoyannis (2007) usaram a SPE C18 para extração dos ADT: AMI, CLOMI, IMI

e doxepina em plasma (após precipitação de proteínas) e em urina, tendo obtido recuperações entre 91 e 114% e limites de detecção entre 0,1 e 0,6 ng mL<sup>-1</sup> para o plasma. Bakkali et al. (1999), avaliando vários sorventes para SPE – sílica octila, octadecila, etila, cicloexila, cianopropila e fenila – na extração de 5 antidepressivos de plasma (doxepina, DESI, IMI, maprotilina e da trazodona) encontraram melhores resultados usando a fenilsílica, com linearidades entre 5 e 2000 ng mL<sup>-1</sup>, CV < de 9% e recuperação entre 82 e 84%.

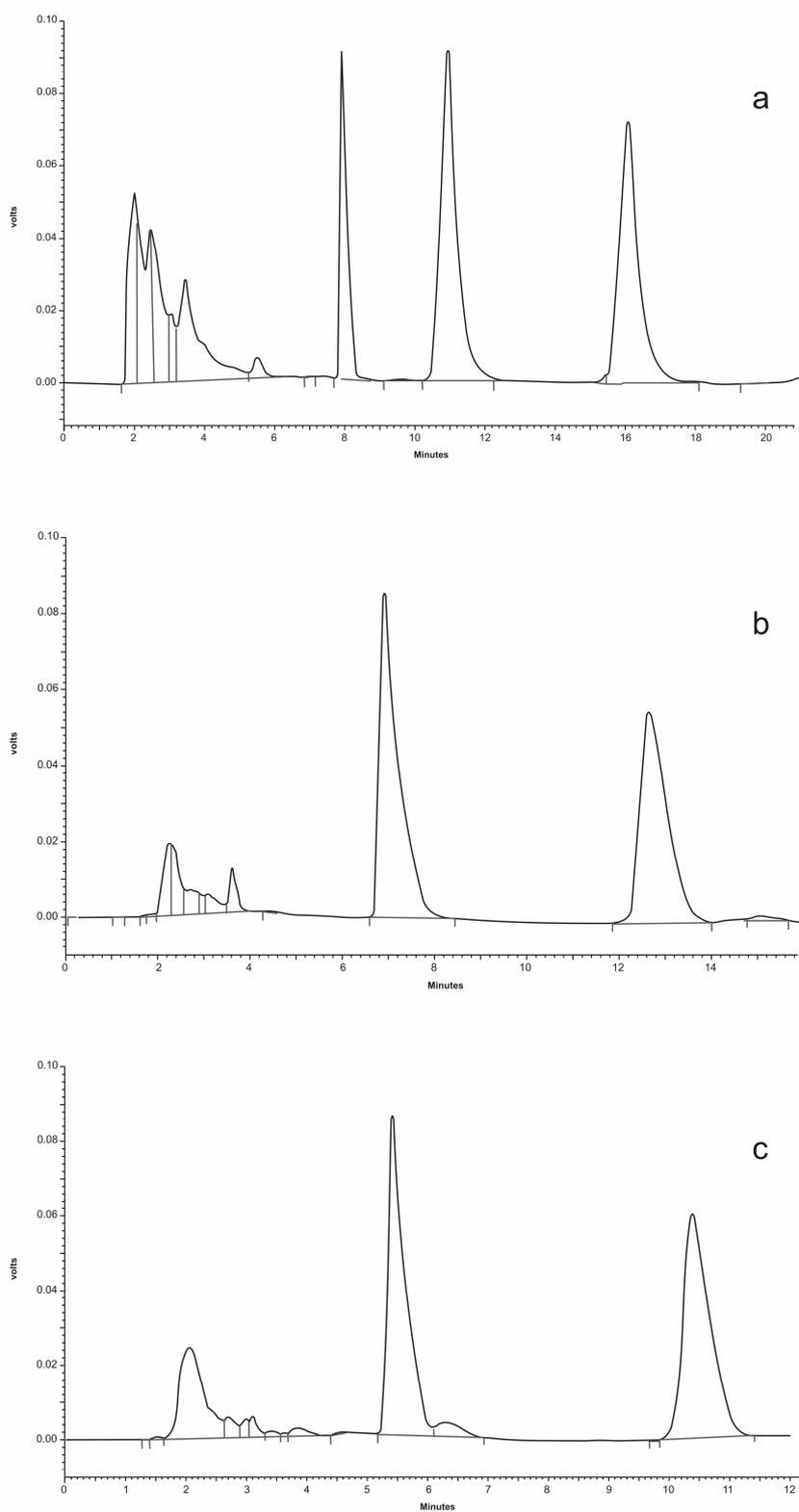
## 5.5 Perfis cromatográficos

As Figuras 31 e 32 mostram o perfil cromatográfico das análises de AMI e de NOR extraídas de branco de amostra e de amostras fortificadas, respectivamente, pelo SPE C18, MIS-AMI e MIS-NOR.

Pode-se verificar que o perfil dos brancos de amostra extraídos nos MISPE estão mais limpos de que os extraídos pelo SPE octadecila. O aumento na seletividade proporcionada pelo MIP tem sido descrita na literatura por comparação com cromatogramas obtidos com e sem o uso do MIP. Para amostras líquidas, os MIP têm sido frequentemente comparados a sorventes clássicos a fim de demonstrar a possibilidade de obtenção de uma linha de base mais limpa quando se usa MIP do que quando se usa sílicas C-18 ou polímeros hidrofóbicos (PICHON, 2007).



**Figura 31** - Cromatogramas de amostra de plasma branco extraída por C18 (a), polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde amitriptilina (b, MIS-AM) e polímero de 3-aminopropiltrimetoxissilano e molécula molde nortriptilina (c, MIS-NOR).



**Figura 32** - Cromatograma de amostra de plasma fortificado com  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  de desipramina (DESI), nortriptilina (NOR) e amitriptilina (AMI) extraída por C18 (a) e cromatogramas de amostra de plasma fortificado com  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  de NOR e AMI extraída por polímero de 3-aminopropiltrimetoxisilano e molécula molde AMI (b, MIS-AMI) e polímero de 3-aminopropiltrimetoxisilano e molécula molde NOR (c, MIS-NOR).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados, apresentados e discutidos, desta pesquisa permitem concluir que:

- As condições cromatográficas otimizadas para a análise da amitriptilina e nortriptilina foram satisfatórias com relação à eficiência e resolução cromatográficas e adequadas também para a análise de outros antidepressivos tricíclicos – desipramina, clomipramina e imipramina.
- O polímero de impressão molecular usando o ácido metacrílico como monômero e AMI como molécula molde, nas condições usadas em sua síntese, não mostrou condições satisfatórias de uso, vista a impossibilidade de dessorção da molécula molde em teores que permitissem sua aplicação na extração em fase sólida para a finalidade desta pesquisa.
- A utilização de molécula molde análoga estrutural do analito para a síntese do polímero, a imipramina, não demonstrou condições de repetitividade que permitissem sua aplicação no preparo de amostra por SPE visando a quantificação dos analitos.
- A polimerização sol-gel usando o aminopropiltrimetoxisilano como monômero e a AMI ou a NOR como moléculas molde, resultou em polímero que não mostrou repetitividade adequada para uso na análise cromatográfica da AMI e NOR. Porém, a dessorção do molde foi possível neste tipo de polímero e os cromatogramas resultantes da extração de amostras de plasma se mostraram mais limpos e livres de interferentes de outros constituintes da amostra que pudessem comprometer a identificação dos analitos.
- A extração em fase sólida usando octadecila como sorvente denotou condições satisfatórias de desempenho para emprego na análise cromatográfica da AMI e NOR em plasma, no intervalo de interesse para uso na monitorização terapêutica de pacientes tratados com estes fármacos.

- Assim, nenhum dos polímeros sintetizados nesta pesquisa, ou seja, os dois de síntese em “bulk” de ácido metacrílico (MIP-AMI e MIP-IMI) e os dois de síntese por processo sol-gel usando o APTMS (MIP-AMI e MIS-NOR) mostraram condições satisfatórias para uso na extração em fase sólida como processo de preparo de amostra para análise cromatográfica de amitriptilina e nortriptilina em plasma nos níveis pretendidos.
- Entretanto, o uso de sorventes com capacidade de reconhecimento molecular, principalmente a partir de materiais híbridos orgânico-inorgânico baseados em sílica modificada, parece promissor; porém, outros estudos devem ser realizados sobre as condições de síntese e otimização das variáveis da extração em fase sólida para avaliar a potencialidade destes materiais em análises de monitorização terapêutica dos antidepressivos tricíclicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-REHIM, M. et al. Microextraction in packed syringe online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry: molecularly imprinted polymer as packing material for MEPS in selective extraction of ropivacaine from plasma. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 29, p. 1725–1736, 2006.

AL-KINDY, S. et al. Molecularly imprinted polymers and optical sensing applications. **Critical Review in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 291-309, 2000.

ALVES, C. et al. Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography- mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1342-1347, 2007.

ANDERSSON, L. I. et al. Towards molecular-imprint based SPE of local anaesthetics. **Chromatographia**, v. 55, p. S65–69, 2002.

ANDERSSON, L. I. et al. Development of a molecularly imprinted polymer based solid-phase extraction of local anaesthetics from human plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 526, p. 147–154, 2004.

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

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

ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting for drug bioanalysis. A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. **Journal of Chromatography B**, v. 739, p.163-173, 2000a.

ANDERSSON, L. I.; PAPRICA, A.; ARVIDSSON, T. A highly selective solid phase extraction sorbent for preconcentration of sameridine made by molecular imprinting. **Chromatographia**, v. 46, p. 57-66, 1997.

ARIFFIN, M. M. et al. Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Diazepam and Its Metabolites from Hair Samples. **Analytical Chemistry**, v.79, p.256-262, 2007.

- BAGGIANI, C. et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction method for the high performance liquid chromatographic analysis of fungicide pyrimethanil in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 158-164, 2007.
- BAKKALI, A. et al. Solid-phase extraction with liquid chromatography and ultraviolet detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. **Talanta**, v. 49, p. 773-783, 1999.
- BALDESSARINI, R. J. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos da ansiedade. In: BRUNTON, L. L. (Ed.). **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2006. cap. 17, p. 383-416.
- BELTRAN, A. et al. Synthesis and application of a carbamazepine-imprinted polymer for solid-phase extraction from urine and wastewater. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 6–11, 2007.
- BERECZKI, A. et al. Determination of phenytoin in plasma by molecularly imprinted solidphase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 930, p. 8-31, 2001.
- BLOMGREN, A. et al. Extraction of clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 157–164, 2002.
- BOOS, K. S.; FLEISCHER, C. T. Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecularly imprinted polymers (MIP). **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, p. 16–20, 2001.
- BOYD, B. et al. Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1174, p. 63–71, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Visalegis**. Disponível em: <http://anvisa.gov.br> Acesso em: 10 mar. 2007

BRASIL. Ministério da saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos – **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME**. 5ª. ed. 2007. Disponível em: [http://bvms.saude.gov.br/bvs/publicações/07\\_M.pdf](http://bvms.saude.gov.br/bvs/publicações/07_M.pdf). Acesso em: 09 jun. 2008

BRINKER, J.; SCHERER, G. **Sol-gel science**. New York: Academic Press, 1989.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentos de química clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

CARO, E. et al. Application of molecularly imprinted polymers to solid phase extraction of compounds from environmental and biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, p. 143-153, 2006a.

CARO, E. et al. A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p.137–143, 2004.

CARO, E. et al. Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated quinolones from urine and tissue samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 145–151, 2006b.

CARO, E.; MARCE, R. M.; CORMACK, P. A. G.; Sherrington, D. C.; Borrull F. Synthesis and application of an oxytetracycline imprinted polymer for the solid-phase extraction of tetracycline antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 81–86, 2005.

COBB, Z.; ANDERSSON, L.I. Determination of ropivacaine in human plasma using highly selective molecular imprint-based solid phase extraction and fast LC/MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 645–650, 2005.

COBB, Z.; SELLERGREN, B.; ANDERSSON, L.I. Water-compatible molecularly imprinted polymers for efficient direct injection on-line solid-phase extraction of ropivacaine and bupivacaine from human plasma. **The Analyst**, v. 132, p.1262–1271, 2007.

COLLINSON, M. M. Analytical applications of organically modified silicates. **Mikrochimical Acta**, v. 129, p. 149-165, 1998.

COLLINSON, M. M.; WEI, H. Functional-group effects on the ion-exchange properties of organically modified silicates. **Analytica Chimica Acta**, v. 397, p. 113-121, 1999.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B**, v.804, p.173-182, 2004.

COSTA, J. L. Extração em Fase Sólida. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 16, p. 156-160.

CRESCENZI, C. et al. Determination of clenbuterol in bovine liver by combining matrix solid phase dispersion and molecularly imprinted solid phase extraction followed by liquid chromatography/electrospray ion trap multiple stage mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 2171–2177, 2001.

CUMMINS, W.; DUGGAN, P.; MCLOUGHLIN, P. A comparative study of the potential of acrylic and sol-gel polymers for molecular imprinting. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, p. 52-60, 2005.

DELUCIA, R. et al. **Farmacologia integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. Cap. 26, p. 226-232.

DZYGIEL, P. et al. Evaluation of water-compatible molecularly imprinted polymers as solid-phase extraction sorbents for the selective extraction of sildenafil and its desmethyl metabolite from plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 853, p. 346–353, 2007.

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

FIGUEIREDO, E. C. et al. On-line molecularly imprinted solid phase extraction for the selective spectrophotometric determination of catechol. **Microchemical Journal**, v. 85, p. 290-296, 2007.

FIORI, M. et al. Evaluation of two different clean-up steps, to minimise ion suppression phenomena in ion trap liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of beta-agonists in calves urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 207–210, 2005.

FLANAGAN, R. J. et al. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 530-538, 2006.

FRAHNERT, C.; RAO, M. L.; GRASMADER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 794, p. 35-47, 2003.

FULLER, D. C.; ORSULAK, P. J. Therapeutic monitoring of antidepressants. **Clinical Chemistry**, v. 36, p. 80-89, 1999.

GELENBERG, A. J.; BASSUK, E. L.; SCHOONOVER, S. C. **The Practitioner's guide to psychoactive drugs**. 3. ed. London: Plenum Medical Book, 1991.

GORESTEIN, C.; SCAVONE, C. Antidepressivos. In: DELUCIA, R. et al. **Farmacologia integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. Cap. 26, p. 226-232.

HARNISH, B. et al. UV-Cross-Linked Poly(vinylpyridine) Thin Films as Reversibly Responsive Surfaces. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 4092-4096, 2005.

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

HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing. **Biochemical Society Transactions**, v. 27, p. 344-350, 1999.

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

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

HU, S. G.; LI, L.; HE, X. W. Comparison of trimethoprim molecularly imprinted polymers in bulk and in sphere as the sorbent for solid-phase extraction and extraction of trimethoprim from human urine and pharmaceutical tablet and their determination by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, p. 215-222, 2005.

HU, S. G.; WANG, S. W.; HE, X. W. An amobarbital molecularly imprinted microsphere for selective solid-phase extraction of phenobarbital from human urine and medicines and their determination by high-performance liquid chromatography. **The Analyst**, v. 128, p. 1485–1489, 2003.

HUANG, Z. F.; TANG, Y. W. An investigation on clean-up of cephalosporins in biomedical sample by molecular imprinting technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 33, p. 1424–1426, 2005.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. Cap. IX, p. 273-297.

JASINSKA, A.; STARCZEWSKA, B. The use of the new SPE methods for isolation of some tricyclic antidepressant drugs from human serum. . **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 795-799, 2003.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 232-244, 2003.

KHASAWNEH, M. A.; VALLANO, P. T.; REMCHO, V. T. Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents II. Covalent imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 922, p. 87-97, 2001.

KIRCHHERR, H.; KUHN-VELTEN, W. N. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. **Journal of Chromatography B**, v. 843, p. 100-113, 2006.

KEMPE, M. Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1948-1953, 1996.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C.; CUNHA, B. C. A.; **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 3.12-3.23.

KRUG, F. J. II Workshop on methods of sample decomposition. Piracicaba: CENA-USP, 1998. Apostila.

LAI, E. P. C.; WU, S. G. Molecularly imprinted solid phase extraction for rapid screening of cephalexin in human plasma and serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, p. 165–174, 2003.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004.

LAVIGNAC, N.; ALLENDER, C. J.; BRAIN, K. R. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 510, p. 139-145, 2004.

LEKE, R. et al. Antidepressivos tricíclicos: uma revisão sobre os aspectos farmacológicos e a importância do monitoramento terapêutico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.17, Supl. 2, p. 51-59, 2004.

LINDEN, R. et al. Determination of Amitriptyline and its Main Metabolites in Human Plasma Samples using HPLC-DAD: Application to the Determination of Metabolic Ratios after Single Oral Dose of Amitriptyline. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 19, n. 1, p. 35-41, 2008.

LINDER, M. W.; KECK, P. E. Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1073-1084, 1998.

MAIER, N. N. et al. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 103-111, 2004.

MALFARÁ, W. R. et al. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 955-962, 2007.

MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, p. 795-805, 2001.

MARTIN, P. D. et al. Comparison of extraction of a beta-blocker from plasma onto a molecularly imprinted polymer with liquid–liquid extraction and solid phase extraction methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1231–1239, 2004.

MARTIN, P. D. et al. Comparison of normal and reversed-phase solid phase extraction methods for extraction of betablockers from plasma using molecularly imprinted polymers. **The Analyst**, v. 128, p. 345–350, 2003.

**MARTINDALE: The complete drug reference.** 33. ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. p. 273-279.

MASQUÉ, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, p. 384-394, 1998.

MASQUÉ, N. et al. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from environmental water. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4122–4126, 2000.

MATSUI, J. et al. Solid-phase Extraction of a Triazine Herbicide Using a Molecularly Imprinted Synthetic Receptor. **Analytical Chemistry**, v. 34, p. 85-87, 1997.

MAYES, A. G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers: Useful materials for analytical chemistry? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, p. 321-332, 1997.

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

MULDOON, M. T.; STANKER, L. H. Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 803-808, 1997.

NAVARRO-VILLOSLADA, F. Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol a. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 149-162, 2004.

OLIVEIRA, A. M. et al. Extraction and pré-concentration techniques for chromatographic analysis. IN: Arruda, M.A.Z. **Trends in sample preparation.** New York: Nova Science Pub., 2007. p. 136-164.

PILETSKY, S.; ALCOCK, S.; TURNER, A. P. F. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 9-12, 2001.

PICHON, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, 2007.

POOLE, C. F. Principles and practice of solid-phase extraction. In: PAWLISZYN, J. **Sampling and sample preparation for field and laboratory: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. p. 341-387

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

PRESKORN, S. H.; FAST, G. A. Therapeutic drug monitoring for antidepressants: efficacy, safety, and cost effectiveness. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 52 (Supl.3), p. 23-33, 1991.

QIAO, F. et al. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. **Chromatographia**, v. 6, p. 443-448, 2006.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 613-626.

RASHID, B. A. et al. Preliminary evaluation of a molecular imprinted polymer for solid-phase extraction of tamoxifen. **Analytical Communications**, v. 34, p. 303-305, 1997.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SAMANADIOU, V. F. NIKA, M. K. PAPADOYANNIS, I. N. Development of a HPLC method for the monitoring of tricyclic antidepressants in biofluids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2391-2400, 2007.

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

SCIFINDER Scholar. **American Chemical Society**. Copyright@2005. Versão 2006.

SELLERGREN, B. Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.164-169, 1999.

SILVA, R. G. C.; AUGUSTO, F. Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 216-223, 2006.

SIMON, R.; COLLINS, M. E.; SPIVAK, D. A. Shape selectivity versus functional group pre-organization in molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, p. 7-16, 2007.

SONG, S. et al. Development and application of molecularly imprinted polymers as solid-phase sorbents for erythromycin extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 2141–2150, 2008.

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

STEIMER, W. et al. Pharmacogenetics: a new tool in the management of antidepressive drug therapy. **Clinical Chemistry**, v. 308, p. 33-41, 2001.

SUEDEE, R. et al. Temperature sensitive dopamine-imprinted (N,N-methylene-bis-acrylamide cross linked) polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 239–249, 2006.

TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32-40, 2007.

TANG, Y. W. et al. The characteristic and application of molecularly imprinted polymer: efficient sample preconcentration of antibiotic cefathiamidine from human plasma and serum by solid phase extraction. **Analytical Letters**, v. 38, p. 219–226, 2005.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005a.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: Preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087-1101, 2005b.

THEODORIDIS, G. et al. Preparation of a molecularly imprinted polymer for the solid-phase extraction of scopolamine with hyoscyamine as a dummy template molecule. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 103–109, 2003.

THEODORIDIS, G.; MANESIOTIS, P. Selective solid-phase extraction sorbent for caffeine made by molecular imprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 948, p. 163-169, 2002.

TITIER, K. et al. Quantification of tricyclic antidepressants and monoamine oxidase inhibitors by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in whole blood. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 200-207, 2007.

TONEY, G. B.; ERESHEFSKY, L. Cyclic antidepressants. In: SCHUMACHER, E. G., editor. **Therapeutic Drug Monitoring**. Norwalk: Appleton Lange, p. 411-440, 1995.

TORRE, B. R. et al. Serum levels and cardiovascular effects of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors in depressed patients. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 23, p. 435-440, 2001.

TRIPATHI, K. D. **Farmacologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 358.

**US FDA - United States Food and Drug Administration**. Guidance for industry. Reviewer guidance validation of chromatographic methods. Rockville: FDA Centre for drug evaluation and research, 1994.

**USP - United States Pharmacopeia**. National Formulary. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007. p.1393-2783.

VALLANO, P. T.; REMCHO, V. T. Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents I. Demonstration of feasibility. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 23-34, 2000.

VAN HOOFF, N. et al. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2801–2808, 2005.

VAN HOUT, M. W. J. et al. Ion suppression in the determination of clenbuterol in urine by solid-phase extraction atmospheric pressure chemical ionisation ion-trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 245–250, 2003.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.

WALSHE, M. et al. The preparation of a molecular imprinted polymer to 7-hydroxycoumarin and its use as a solid-phase extraction material. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 319-325, 1997.

WELLS, M. J. M. Principles of extraction and the extraction of semivolatiles from liquids. In: MITRA, S. (Ed.) **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. p. 78-113.

WEN, J.; WILKES, G. L. Organic/inorganic hybrid network materials by the sol-gel approach. **Chemistry of Materials**, v. 8, p. 1667-1681, 1996.

WIDSTRAND, C. et al. Evaluation of MISPE for the multi-residue extraction of beta-agonists from calves urine. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 85–91, 2004.

WU, S. G.; LAI, E. P.C.; MAYER, P. M. Molecularly imprinted solid phase extraction-pulsed elution-mass spectrometry for determination of cephalexin and alpha-aminocephalosporin antibiotics in human serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 483–490, 2004.

WULFF, G.; SARHAN, A. Über die Anwendung von enzymanalogen gebauten Polymeren zur Racemattrennung. **Angewandte Chemie**, Int. Ed., v. 84, p. 364-372, 1972.

XIE, J. et al. Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2,2-bis(hydroxymethyl)butanol trimethacrylate. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 233-242, 2003.

YANG, J. et al. A new molecularly imprinted polymer for selective extraction of cotinine from urine by solid-phase extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 761-768, 2006.

YE, L.; MOSBACH, K. The technique of molecular imprinting - Principle, state of the art, and future aspects. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 41, p. 107-113, 2001.

ZHU, X. et al. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, p. 161-169, 2005.

