

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

LIDIANE SILVA FRANQUI

**SÍNTESE DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR MAGNÉTICOS PARA
EXTRAÇÃO SELETIVA DE NICOTINA E COTININA EM URINA SEGUIDO DE
ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

Alfenas/MG

2015

LIDIANE SILVA FRANQUI

**SÍNTESE DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR MAGNÉTICOS PARA
EXTRAÇÃO SELETIVA DE NICOTINA E COTININA EM URINA SEGUIDO DE
ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG para obtenção do título de Mestre em Química.

Área: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Alfenas/MG

2015

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

Franqui, Lidiane Silva

Síntese de polímeros de impressão molecular magnéticos para extração seletiva de nicotina e cotinina em urina seguido de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. / Lidiane Silva Franqui. -- Alfenas/MG, 2015.

61 f.

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.

Bibliografia.

1. Impressão Molecular. 2. Separação magnética. 3. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas. 4. Nicotina. 5. Cotinina. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD-543.1

LIDIANE SILVA FRANQUI

**SÍNTESE DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR MAGNÉTICOS PARA
EXTRAÇÃO SELETIVA DE NICOTINA E COTININA EM URINA SEGUIDO DE
ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

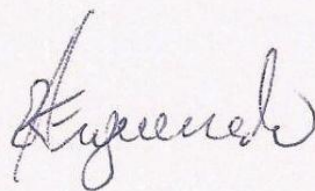
A banca examinadora abaixo assinada aprova o trabalho apresentado como parte dos requisitos para aprovação da defesa do curso de mestrado em Química da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Analítica.

Aprovado em: 02/02/2015

Prof^o. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

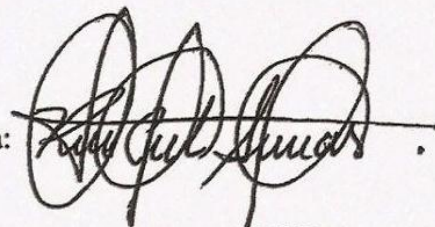
Assinatura:



Prof^a Dr^a. Rosineide Costa Simas

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

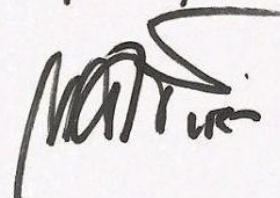
Assinatura:



Prof^o. Dr. Marcello Garcia Trevisan

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Dedico esta dissertação aos meus pais Valter Franqui e Liliane Aparecida da Silva Franqui pelo apoio incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e ao Programa de Pós-graduação em Química pela oportunidade oferecida.

Em especial, ao Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo por toda dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

A Dra. Patrícia Penido Maia, técnica do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF) pelo suporte técnico e pelo apoio e amizade em todos os momentos.

A todos do LATF, professores, técnicos e alunos, em especial as discentes Carla Brigagão Pacheco da Silva, Lailah Cristina de Carvalho Abrão, Mariane Gonçalves Santos e Taila Kawano, pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso pelas discussões e ensinamentos sobre nanopartículas.

Ao técnico Gabriel de Oliveira Isac Moraes pelo apoio técnico e por sempre estar disposto ajudar na resolução de problemas.

As discentes Maria Luiza de Carvalho Noronha, Luana Aparecida dos Reis Giusto e Bianca Santos Pinheiro, pela amizade, companheirismo, grupos de estudos e ajuda em diversos aspectos.

Aos meus pais Valter Franqui e Liliane Aparecida da Silva Franqui e meu namorado Fernando Gustavo Oliveira, por me apoiarem e incentivarem sempre e por compreenderem minhas inúmeras ausências.

Ao Núcleo de Controle de Qualidade da UNIFAL-MG, em especial a farmacêutica Olímpia Maria Martins Santos Viana e a discente Jennifer Jacon pelas análises de FT-IR.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Química (LabiQ) da UNIFAL-MG, em especial a discente Gabriela Bozza, pelas análises de TGA.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e ao Instituto de Química da Unicamp pelas análises de AFM e MEV/EDS, respectivamente.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar o desempenho de um polímero de impressão molecular magnético (MMIP – *magnetic molecularly imprinted polymers*) na extração seletiva de nicotina e cotinina em amostras de urina, com posterior análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Para tal, nanopartículas de Fe₃O₄ foram preparadas pelo método de co-precipitação com posterior modificação da sua superfície por silanização, que envolve a estabilização com tetraetilortosilicato (TEOS) seguida da funcionalização com 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate (MPS). O MIP foi sintetizado sobre as nanopartículas magnéticas pelo método de polimerização por precipitação, empregando-se nicotina, ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, ácido 4,4'-azobis(4-cianovalérico), e acetonitrila como molécula modelo, monômero funcional, agente de ligação cruzada, iniciador radicalar e solvente de síntese, respectivamente. As partículas sintetizadas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, Microscopia de Força Atômica – AFM, Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - FT-IR, Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X - EDS e Análise Termogravimétrica – TGA. O MMIP foi empregado na extração em fase sólida dispersiva de nicotina e cotinina em urina, empregando-se um ímã externo para separar as partículas da amostra. O extrato foi analisado por GC-MS, operado no modo SIM e as relações *m/z* monitoradas foram 84, 133 e 162 para a nicotina e 98, 147 e 176 para a cotinina. A faixa analítica foi de 0,1 a 3,0 mg L⁻¹ (*r* >0,99), com limite de quantificação (LQ) de 0,1 mg L⁻¹ para ambos analitos. As precisões intra e interdia (na forma de desvio padrão relativo) foram menores que 20 % para o LQ e menores que 15% para os demais pontos; e as exatidões intra e inter dia (na forma de erro relativo) ficaram compreendidas entre ± 9%. O método foi empregado na análise de nicotina e cotinina em quatro amostras de urina de fumantes. Os valores obtidos para cotinina encontram-se na faixa de 0,19 a 0,28 mg L⁻¹, enquanto que a nicotina foi detectada em concentrações menores que o LQ. Assim, o método mostrou-se adequado para monitorização da exposição ao tabaco, já que a cotinina é o bioindicador mais indicado para esta finalidade.

Palavras-chave: MMIP. Reconhecimento molecular. Susceptibilidade magnética. GC-MS. Nicotina. Cotinina.

ABSTRACT

In this study, a magnetic molecularly imprinted polymer (MMIP) was synthesized, characterized and used in the selective extraction of nicotine and cotinine from urine samples followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. Fe₃O₄ nanoparticles were prepared by the co-precipitation method using FeCl₃·6H₂O, FeCl₂·4H₂O and ammonia. After, the particles were silanized/stabilized with tetraethyl orthosilicate (TEOS), and functionalized with 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate (MPS). The MIP has been prepared on the magnetic nanoparticles by the precipitation polymerization method, using nicotine, methacrylic acid, ethylene glycol dimethacrylate, 4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid) and acetonitrile as template, functional monomer, cross-linker, initiator and solvent, respectively. The materials were characterized by scanning electron microscopy, atomic force microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, energy dispersive X-ray spectrometry and thermogravimetry. All the characterization results confirmed the nature of the Fe₃O₄ nanoparticles, as well as their subsequent treatments with TEOS, MPS and the MIP synthesis. The particles were used to extract nicotine and cotinine from urine samples in a dispersive solid phase extraction procedure employing an external magnet to separate the particles from the sample. The extracts were analyzed by GC-MS. Selective ion monitoring (SIM) mode was used and three ions in a group at *m/z* 162, 84, 133, and *m/z* 176, 147, 98 were used to monitor nicotine and cotinine, respectively. The analytical range was 0.1 to 3.0 mg L⁻¹ (*r* > 0.99), with a limit of quantitation (LOQ) of 0.1 mg L⁻¹ for both analytes. The intra- and interday precision (as RSD) were less than 20% for the LOQ and less than 15% for other points; and intra- and inter day accuracies (as relative error) were within ± 9%. The method was employed to analyze nicotine and cotinine in four smokers' urine samples. The cotinine concentrations ranged from 0.19 to 0.28 mg L⁻¹, whereas the nicotine was detected in concentrations lower than LOQ. Thus, the method was suitable for tobacco exposure monitoring, once the cotinine can be considered the most suitable biomarker for this purpose.

Keywords: MMIP. Molecular imprinted polymers. Magnetic susceptibility. GC-MS. Nicotine. Cotinine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema genérico da síntese de MIP.....	15
Figura 2 – Processo de separação magnética.	19
Figura 3 – Etapas do preparo do MIP magnético.	20
Figura 4 – Estrutura química (a) nicotina, (b) cotinina.	24
Figura 5 – Método de silanização.....	31
Figura 6 – Sistemas de síntese.....	39
Figura 7 – Espectros de FT-IR das nanopartículas de (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ e (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-MPS}$	41
Figura 8 – Espectro de FT-IR do MMIP.	42
Figura 9 – Curvas TGA de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-MPS}$ e MMIP. A uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, de 17°C à 800°C e sob fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1}	43
Figura 10 – Curvas TGA de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-MPS}$. A uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, de 17°C à 800°C e sob fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1}	44
Figura 11 – Estrutura química do TEOS e MPS.	45
Figura 12 – Imagens de MEV de (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-MPS}$ e (d) MMIP.	46
Figura 13 – Análise qualitativa de EDS.	47
Figura 14 – Imagens de AFM.....	49
Figura 15 – Cromatograma de solução padrão de 1 mg L^{-1} de nicotina e cotinina em metanol.	50
Figura 16 – Espectros de massas de solução padrão de 1 mg L^{-1} de nicotina e cotinina em metanol.....	51
Figura 17 – Cromatogramas de (a) amostra de urina fortificada com 3 mg L^{-1} de nicotina e cotinina e (b) amostra de urina branco, extraídas com MMIP sem etapa de lavagem.....	52
Figura 18 – Curva de linearidade da nicotina em urina, utilizando extração por MMIP.	53
Figura 19 – Curva de linearidade da cotinina em urina, utilizando extração por MMIP.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da performance dos MMIPs obtidos com nanopartículas magnéticas dos protocolos A e B.....	40
Tabela 2 – Perda de massa em % com o aumento da temperatura para 200 e 800°C.	44
Tabela 3 – Análise qualitativa (%) de EDS (teste realizado em duplicata).....	48
Tabela 4 – Precisão e exatidão para nicotina e cotinina urinária extraídas por MMIP (n=5)	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCVA	–	Ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico)
ACN	–	Acetonitrila
AFM	–	Microscopia de Força Atômica
ALC	–	Agente de Ligação Cruzada
EDS	–	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X
EGDMA	–	Etilenoglicol dimetacrilato
FT-IR/ATR	–	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada
GC-MS	–	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
IE	–	Ionização por impacto de elétrons
IR	–	Iniciador Radicalar
LQ /LOQ	–	Limite de Quantificação
MAA	–	Ácido Metacrílico
MEV	–	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	–	Monômero Funcional
MFM	–	Microscopia de Força Magnética
MIP	–	Polímero de Impressão Molecular
MISPE	–	Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa
MM	–	Molécula Modelo
MMIP	–	Polímero de Impressão Molecular Magnético
MPS	–	(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate
MS	–	Espectrometria de Massas
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
RSD	–	Desvio Padrão Relativo
SIM	–	Monitoramento Seletivo de Íons
SPE	–	Extração em Fase Sólida
TEOS	–	Tetraetilortosilicato
TGA	–	Análise Termogravimétrica
TIC	–	Cromatograma de Íons Totais

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Polímeros de impressão molecular (MIPs)	14
2.2	Polímeros de impressão molecular magnéticos (MMIPs)	19
2.3	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	21
2.4	Monitorização da exposição ao tabaco	22
3.	OBJETIVOS	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Reagentes, padrões e solventes	27
4.2	Preparo de soluções	27
4.3	Equipamentos	28
4.4	Metodologia	28
4.4.1	<i>Síntese do polímero magnético molecularmente impresso</i>	28
4.4.1.1	Síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄	29
4.4.1.2	Síntese do MMIP	31
4.4.2	<i>Caracterização</i>	32
4.4.3	<i>Amostras</i>	33
4.4.4	<i>Processo de extração</i>	33
4.4.5	<i>Condições cromatográficas</i>	34
4.4.6	<i>Validação e aplicação do método</i>	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ ... 36	
5.2	Síntese do MIP magnético	38
5.3	Caracterização	41
5.3.1	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – FT-IR</i>	41
5.3.2	<i>Análise Termogravimétrica – TGA</i>	42
5.3.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (MEV/EDS)</i>	45
5.3.4	<i>Microscopia de Força Atômica – AFM</i>	48
5.4	Otimização das condições cromatográficas	49
5.5	Preparo da amostra	51

5.6	Figuras analíticas de mérito.....	53
5.7	Aplicação em amostras reais.....	55
6.	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, a Química Analítica vivenciou um grande avanço no que se refere ao desenvolvimento de instrumentação analítica, com consequente disponibilidade de equipamentos cada vez mais sofisticados para separação, identificação e quantificação de substâncias. No entanto a análise direta da amostra por estes sistemas ainda não é possível em grande parte dos casos. Isso porque a maioria das amostras apresentam matrizes complexas com um grande número de interferentes, o que dificulta ou impossibilita sua análise sem nenhum tratamento prévio. Desta forma, a etapa de preparo de amostras é um ponto crítico para a obtenção de resultados confiáveis e informativos, tendo recebido grande atenção nos últimos anos ¹.

Uma amostra pode ser inadequada para análise direta por apresentar outros componentes na matriz que interferem com a análise e/ou uma matriz incompatível com o sistema analítico, o que pode danificar o equipamento aumentando os gastos com a manutenção destes ². Além disso, os analitos podem estar presentes em quantidades muito pequenas impossibilitando sua detecção. Assim, o preparo de amostras tem como principais objetivos a eliminação de interferentes e o isolamento/concentração dos analitos de interesse ³.

A necessidade de se analisar amostras complexas em larga escala estimulou fortemente a exploração de métodos de preparo de amostra mais rápidos, simples e seletivos ³. Isso levou a uma grande evolução no desenvolvimento de novas técnicas, entre as quais podemos destacar o uso de polímeros de impressão molecular (MIPs), os quais tem atraído muita atenção nos últimos anos devido a sua alta seletividade ⁴.

Os MIPs são materiais poliméricos sintéticos que possuem cavidades seletivas para uma molécula alvo, envolvendo um mecanismo de retenção com base no reconhecimento molecular. Além da possibilidade de preparo de sorventes com seletividade pré-determinada para uma substância específica, ou grupo de análogos estruturais ⁵, os MIPs apresentam vantagens como facilidade e baixo custo de síntese, estabilidade química, física e térmica e potencial de aplicação a uma ampla variedade de moléculas-alvo. Devido a estas características os polímeros de impressão molecular tem sido amplamente utilizados em diversas técnicas analíticas, sendo sua principal aplicação como sorvente para extração em fase sólida (SPE) ^{4, 6}. Entretanto, a técnica convencional de SPE apresenta algumas

desvantagens, tais como a pobre transferência de massa, baixa capacidade de ligação e cinética lenta de ligação ⁷.

Diante do exposto, uma nova abordagem para o preparo de MIPs tem recebido crescente atenção: a combinação de nanopartículas magnéticas com os polímeros de impressão molecular, resultando em materiais que apresentam, não só elevada seletividade, como também características de susceptibilidade magnética. Com isso, o MIP magnético (MMIP) pode ser adicionado direto na amostra, sendo recuperado posteriormente por um ímã externo sem a necessidade de ser empacotado em um cartucho como na SPE convencional. Assim, reduz-se efetivamente o tempo de pré-tratamento, uma vez que a área superficial exposta aumenta e a capacidade de ligação e cinética são melhoradas. Além disso, evita-se o bloqueio do cartucho de SPE causado pela matriz da amostra ^{8,9}.

Desta forma, a associação entre separação magnética e impressão molecular mostra-se como uma ferramenta promissora para uso em técnicas de preparo de amostras complexas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir é descrita uma breve revisão de literatura sobre os principais temas deste projeto, que são: MIPs, MMIPs, GC-MS e monitorização da exposição ao tabaco.

2.1 Polímeros de impressão molecular (MIPs)

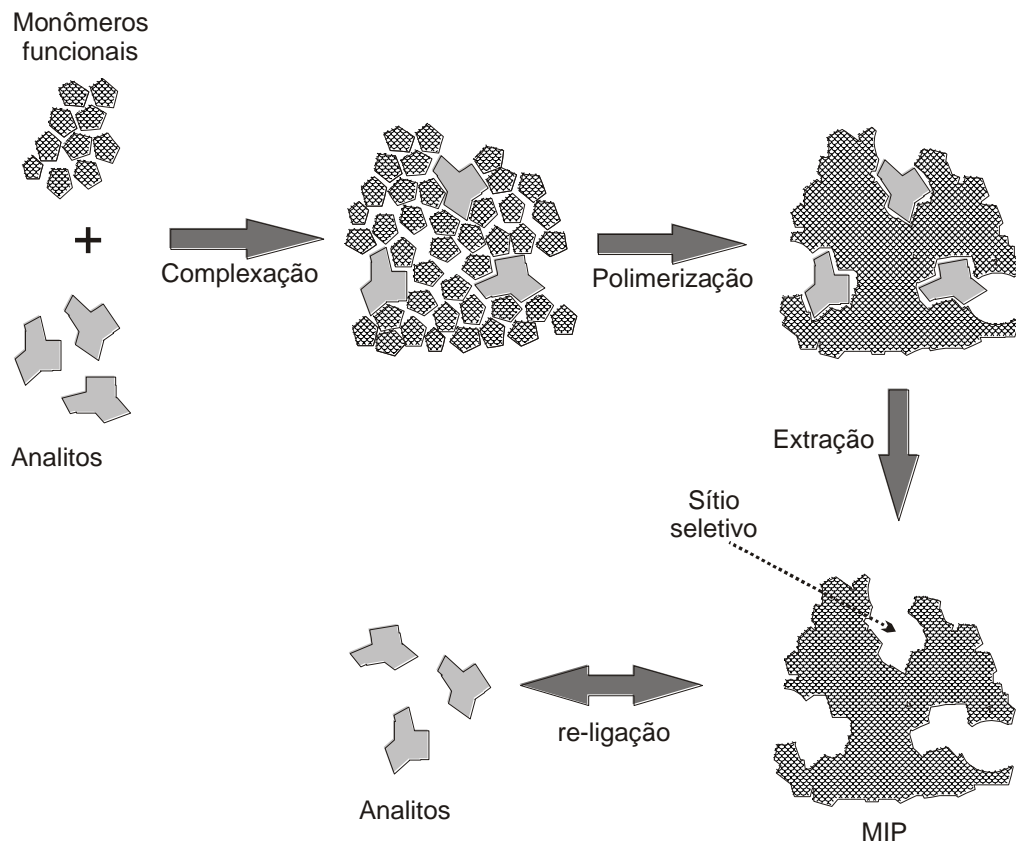
A seletividade inerente às interações biomoleculares tem despertado um grande interesse na biomimetização de tais interações. A partir deste ponto de vista, polímeros sintéticos com impressão molecular, mais conhecidos como MIP (do inglês, *molecularly imprinted polymer*), têm atraído considerável atenção na última década, pois aparecem como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de sistemas com reconhecimento biomimético semelhante aos sistemas específicos enzima-substrato, fármaco-receptor ou antígeno-anticorpo ⁷.

A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios específicos de reconhecimento, estereoquimicamente moldados a partir de uma molécula modelo¹⁰. Essa técnica tem como primórdio os experimentos de Polyakov¹¹ em 1931, o qual demonstrou a capacidade da seletividade molecular ser impressa em sílica gel. Anos depois, em 1949, Dickey expõe a possibilidade de utilização de absorventes específicos com memória inerente a um dado modelo, sendo capazes de se religar seletivamente ao mesmo ¹².

Somente em 1972 foi publicado o primeiro trabalho de MIP em química analítica, onde Wulf e Sarhan descreveram a síntese de um polímero com sítios seletivos para a separação enantiomérica de racematos de açúcares ¹³. Desde então, estes materiais têm recebido grande atenção por causa das vantagens, em relação aos materiais biológicos, que atuam no mecanismo de reconhecimento molecular. A facilidade de síntese, o baixo custo dos reagentes empregados, a estabilidade química, física e térmica do material por longos períodos de tempo, a capacidade de ser estocado sem perder sua especificidade e a possibilidade de reutilização do polímero, após a limpeza do mesmo, são algumas dessas vantagens ¹⁴, as quais se mostram altamente favoráveis à sua utilização em análises de rotina.

A síntese do MIP (FIGURA 1) consiste, inicialmente, na interação de uma molécula molde (MM) com moléculas de um ou mais monômeros funcionais (MF). Posteriormente, após as adições de solvente, agente de ligação cruzada (ALC), iniciador radicalar (IR) e realização de purga, seguida de aquecimento ou iluminação por radiação, ocorre a formação de uma matriz polimérica e rígida, em torno do complexo molde-monômero. Por fim, após a extração da molécula molde que é realizada por meio de um solvente adequado ou quando necessário, por meio de clivagem química, são reveladas cavidades complementares a este molde tanto em tamanho e forma, quanto a presença de grupos funcionais ¹⁵.

Figura 1 – Esquema genérico da síntese de MIP.



Fonte: do autor.

O ponto de partida para síntese do polímero é a escolha da molécula a ser utilizada como molde e do monômero funcional empregado. O molde não deve ser polimerizável, deve ser estável ao aquecimento e/ou radiação UV, conforme as condições de reação, devendo ainda, ser solúvel no solvente empregado. Outro fator limitante é o tamanho da molécula molde que, se for muito grande, compromete a seletividade do polímero ¹⁶. O monômero funcional deve permitir a formação de ligações químicas efetivas com o analito. Assim é necessário uma avaliação dos grupos funcionais presentes na molécula alvo para que o

processo de reconhecimento molecular seja bem sucedido. Uma regra básica a ser observada é que o monômero funcional deve ter complementaridade em relação ao molde utilizado. Assim, analitos contendo grupos funcionais básicos são melhores impressos com monômeros contendo grupos funcionais ácidos e vice-versa ¹⁶. Além disso, estudos demonstraram que o monômero deve ser empregado em uma quantidade superior em relação à molécula molde, em uma razão ótima de 4:1, a fim de deslocar o equilíbrio no sentido da formação do complexo MF-MM ^{15, 17}.

O tipo de interação estabelecida entre a MM e o MF determina o método de impressão molecular que pode ser covalente, não covalente, ou semi-covalente. No modo covalente são formadas ligações covalentes reversíveis e lábeis, entre a MM e MF, de modo que o analito possa ser extraído e novamente se ligar às cavidades seletivas do polímero através deste tipo de interação. No modo não covalente são formadas ligações dos tipos dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, eletrostática, hidrofóbica ou de transferência de carga entre o analito e o monômero funcional ¹⁸. Já o modo semi-covalente, conhecido como sacrifiação espacial, consiste de um híbrido dos dois primeiros métodos e neste caso são inicialmente formadas ligações covalentes durante a síntese do polímero e ligações não covalentes durante o processo de reconhecimento molecular do analito ^{19, 20}.

Polímeros preparados por ligação covalente possuem sítios mais seletivos devido a maior uniformidade das cavidades de reconhecimento, no entanto apresentam maior dificuldade de remoção do analito, a qual necessita de clivagem química, e sua aplicabilidade fica restrita a analitos que estabeleçam este tipo de ligação. Adicionalmente, estudos têm mostrado que tais polímeros apresentam uma cinética lenta de retenção dos analitos na cavidade do polímero ^{15, 19}. Já os MIP que utilizam interações não-covalentes (os mais encontrados na literatura) apresentam maior facilidade de preparo e de desligamento da MM do polímero. Além disso, o modo não covalente utiliza interações que são similares àquelas vistas em processos naturais, o que faz com que este método tenha maior aplicabilidade ¹⁶. Por outro lado, a sacrifiação espacial mostra-se como uma estratégia interessante para unir a maior seletividade alcançada pelo uso de ligações covalentes durante a síntese do polímero, com uma cinética rápida de retenção e facilidade de desligamento dos analitos durante o processo de reconhecimento molecular por interações não covalentes, entretanto, a síntese do polímero por sacrifiação espacial é mais trabalhosa uma vez que requer um tratamento prévio da molécula modelo ¹⁹.

Outro fator importante é o solvente empregado uma vez que, além de promover a solubilização do meio de síntese, ele também governa as interações estabelecidas entre o

analito e o sítio de ligação no polímero. Assim, quando estas interações são de natureza não covalente, solventes apolares com baixa constante dielétrica, tais como, tolueno e clorofórmio, são os mais adequados. Isso porque o solvente não pode atuar como competidor no meio reacional interferindo com a formação do complexo analito-monômero ²¹. Além disso, o solvente exerce influência nas características morfológicas que o material irá apresentar, como, por exemplo, sua porosidade, a qual é muito importante no que se refere à capacidade de reconhecimento do polímero, pois interfere na velocidade de difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos. Vale ressaltar ainda que, o reconhecimento molecular de um MIP ocorre preferencialmente em um meio similar aquele no qual foi sintetizado. Assim, para aplicação em amostras aquosas, os polímeros deveriam ser preparados em solventes polares, o que, como mencionado anteriormente, não é o ideal ¹⁵. Então, a escolha do solvente deve ser criteriosa para se obter uma adequada seletividade do polímero.

A seletividade do polímero também é assegurada pelo emprego do agente de ligação cruzada o qual é adicionado durante a síntese com a função de gerar uma matriz polimérica rígida, dar forma ao MIP e manter fixos os grupos funcionais presentes nas cavidades seletivas do material. Por isto, o ALC deve estar presente em excesso em relação à quantidade de monômero funcional para garantir maior estabilidade mecânica ao polímero além do que, altas proporções do ALC garantem a porosidade do polímero. E, por fim, o iniciador radicalar, que sofre clivagem em sua estrutura, ou por radiação UV ou por aquecimento, para gerar radicais que iniciam o mecanismo da reação de polimerização do ALC em torno do complexo molde-monômero funcional ^{7,16}. Desta forma, assim como o solvente, o ALC e IR a serem empregados durante a síntese do polímero, devem ser selecionados com cautela.

Atualmente são conhecidos vários métodos de síntese dos MIP. A escolha do método a ser empregado será influenciada pelas características de cada um deles em função da aplicação pretendida para o MIP. Para polímeros que objetivam o uso em cartuchos para SPE, a polimerização em “bulk” tem sido o modo de preparo mais utilizado ^{15,22}.

O método de polimerização em “bulk” consiste na adição consecutiva do molde, monômero, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar em um recipiente, com posterior desaeração do meio reacional, o que se faz necessário pelo fato de que o O₂ retarda a reação de polimerização. O recipiente é então selado e submetido ao aquecimento ou radiação UV. Como resultado obtêm-se um sólido duro que deve ser triturado, peneirado e, por fim lavado com solvente adequado para a eluição da molécula molde ¹⁵. Apesar de ser este o método mais popular e simples, o processo de quebra e trituração do polímero é laborioso e

produz partículas que são irregulares em forma e tamanho, provocando a perda de cerca de 70 % dos sítios de ligação, o que gera um material heterogêneo com aplicação cromatográfica reduzida ²³.

Com o intuito de se obter partículas com tamanhos mais uniformes, outros métodos de preparo de MIP têm sido reportados na literatura. Para MIP destinados a técnicas de extração temos a polimerização por suspensão, polimerização por precipitação e polimerização por enxerto ^{10, 15}.

Na polimerização por suspensão, procede-se a solubilização do molde, monômero, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar em um solvente orgânico apolar. Então, a mistura reacional é dispersa em uma fase polar imiscível, geralmente aquosa, formando uma emulsão que é estabilizada pela adição de um tensoativo. A emulsão é então aquecida sob agitação para que ocorra a polimerização, a qual se dá no interior das micelas, originando partículas uniformes do polímero ²⁴. Entretanto, a possibilidade de migração de moléculas de água da fase aquosa para mistura polimérica ou a possível partição dos constituintes reacionais da fase orgânica para fase aquosa, pode levar a obtenção de polímeros com baixa capacidade de reconhecimento molecular ²⁵.

A polimerização por precipitação difere da polimerização em “*bulk*” somente na quantidade de solvente empregado, o qual é cerca de 5 vezes maior, impedindo assim a formação de um monólito do polímero. Todos os reagentes são adicionados ao solvente e a polimerização é induzida por aquecimento ou radiação UV, na ausência de oxigênio. A reação de polimerização se dá até que a cadeia polimérica atinja uma densidade maior que a solução, ocorrendo então a precipitação das microesferas, as quais são posteriormente coletas por centrifugação ²⁴. As partículas obtidas são notadamente mais uniformes do que aquelas provenientes de polimerização em bulk.

A polimerização por enxerto consiste em utilizar um suporte com poros esféricos como molde para síntese do MIP. A polimerização se dá dentro dos poros do suporte e, as microesferas formadas são removidas do suporte por adição de água com forte agitação. Este método permite a obtenção de partículas uniformes com uma maior facilidade de procedimento ²⁶.

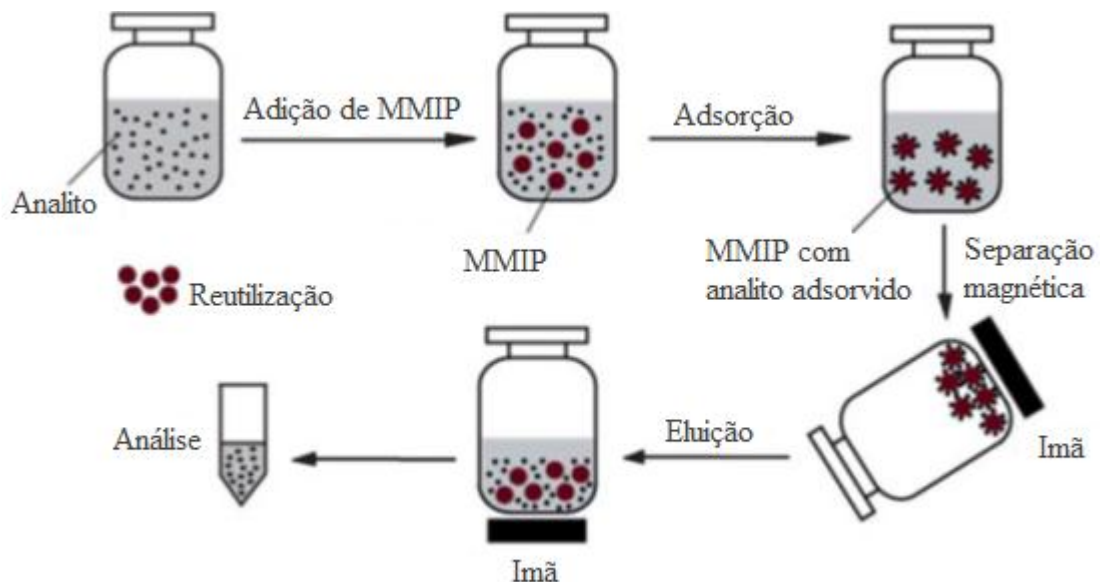
Por fim, cabe destacar a ampla faixa de aplicação da tecnologia MIP, como sensores, eletroforese capilar, eletrocromatografia capilar, separações enantioméricas, catálise e extração em fase sólida, microextração em fase sólida ¹⁵, e ainda como matrizes em sistemas de liberação controlada de fármacos ¹⁰. Contudo, o uso dos MIP em SPE, através de um método conhecido como extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE), é o

principal campo de aplicação destes materiais ^{18, 22}, direcionados à extração de fármacos, toxicantes e metabólitos em fluidos biológicos como urina ²⁷ e plasma ²⁸.

2.2 Polímeros de impressão molecular magnéticos (MMIPs)

Recentemente, outra tecnologia de separação baseada em materiais magnéticos tem recebido considerável atenção. Alguns compostos magnéticos são encapsulados com o MIP, resultando em um polímero que, além das características anteriormente citadas como a alta seletividade, apresenta susceptibilidade magnética. No processo de separação magnética (FIGURA 2) o MIP magnético é adicionado à amostra sob agitação, ocorrendo então a adsorção dos analitos por reconhecimento molecular. As partículas de MIP com os analitos ligados são recuperadas da amostra pelo uso de um ímã externo. Da mesma forma é feita a eluição dos analitos, com o solvente apropriado, sendo o eluato posteriormente analisado ⁸.

Figura 2 – Processo de separação magnética.



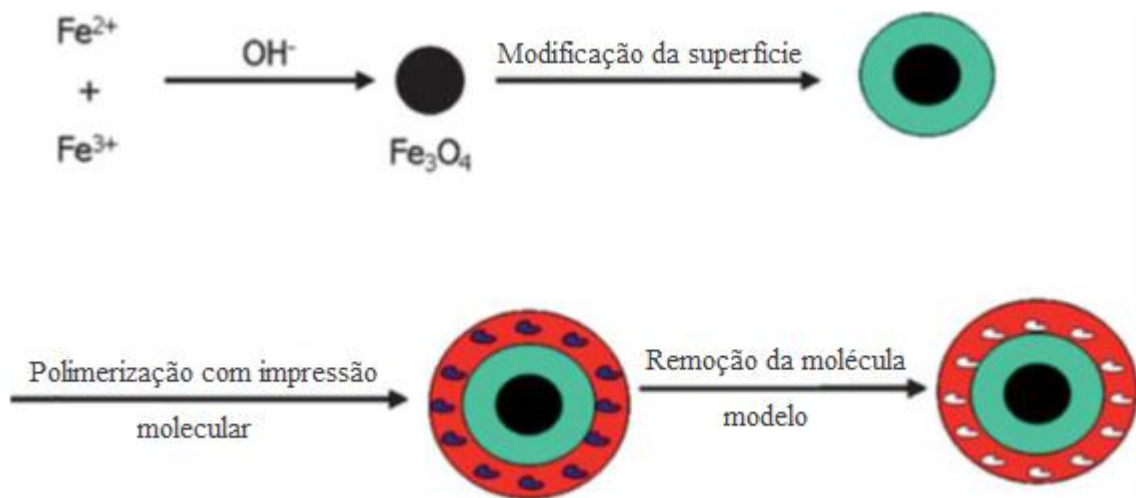
Fonte: CHEN; BIN LI, p. 2613, 2012 (tradução da legenda).

A síntese dos MMIPs tem sido realizada de diferentes maneiras. O processo mais comum (FIGURA 3) é dividido em quatro etapas. A primeira etapa consiste no preparo das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , o qual tem sido realizado pelo método de co-precipitação. Na segunda etapa é feita a modificação ou funcionalização da superfície das

partículas de Fe_3O_4 , o que se faz necessário pelo fato de que as partículas de Fe_3O_4 são pouco estáveis necessitando de uma camada de proteção para assegurar sua estabilidade química e melhorar sua capacidade de dispersão ²⁹. Na terceira etapa procede-se a polimerização do MIP utilizando as partículas magnéticas funcionalizadas como núcleo. Por fim, a quarta etapa, compreende a remoção das moléculas moldes do polímero ⁸.

A funcionalização das nanopartículas magnéticas geralmente é feita por silanização, onde as nanopartículas de Fe_3O_4 são revestidas com uma camada de SiO_2 e, posteriormente, modificadas com agente de acoplamento como o 3 - (trimetoxisilil) propil metacrilato ³⁰. No entanto, uma desvantagem significativa do revestimento à base de sílica é a instabilidade da ligação de siloxano sob condições extremas de pH ³¹. Desta maneira, outras abordagens para funcionalização do núcleo magnético têm sido descritas, como o uso dos surfactantes etileno glicol ³² e ácido oleico ³³.

Figura 3 – Etapas do preparo do MIP magnético.



Fonte: CHEN; BIN LI, p. 2613, 2012 (tradução da legenda).

Comparado com o método convencional de extração em fase sólida molecularmente impressa, os MMIPs apresentam características superiores como a maior área de superfície exposta com conseqüente rápida adsorção dos analitos ⁸. Além disso, é sabido que, na MISPE, a recuperação do analito pode ser diminuída quando o fluxo através do cartucho for muito alto devido a redução do tempo de interação entre os analitos e o sítio de ligação ⁹. Assim, considerando que um baixo fluxo aumenta o tempo de análise, o MMIP permite a obtenção de uma boa recuperação do analito com uma maior velocidade de análise. Desta

forma, a associação entre separação magnética e impressão molecular mostra-se promissora como técnica de preparo de amostras complexas.

Diante do exposto, os MMIPs têm sido aplicados com sucesso no preparo de amostras complexas como amostras biológicas, ambientais, de plantas e de alimentos⁸.

2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade)³⁴.

A cromatografia em fase gasosa é uma poderosa ferramenta analítica que pode analisar qualquer composto volátil, passível de ser volatilizado, ou convertido em outro composto (derivado) o qual possa ser vaporizado em temperaturas não muito elevadas, sem sofrer decomposição³⁵. Esta técnica desenvolveu-se rapidamente na década de 50 e, a partir da década de 60, passou a ser refinada e sofisticada, até que, no final dos anos 70, ocorreu o acoplamento com sucesso, robustez e praticidade do cromatógrafo a gás com o espectrômetro de massas³⁶.

O GC-MS consta de um cromatógrafo, usualmente com coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre a separação destes e um sistema para detecção dos íons, acoplado a um sistema de registro com um programa para interpretação dos dados obtidos³⁶.

O funcionamento de um espectrômetro de massas, resumidamente, consiste na ionização e fragmentação da molécula (método de ionização), sendo os íons separados na base da razão massa/carga (m/z) por um analisador de massas, e por fim, o número de íons que correspondem a cada “unidade” de m/z é registrado na forma de um espectro³⁷.

O método de ionização mais empregado em GC-MS é a ionização por impacto de elétrons (“*electron ionization*”) – IE. Na IE, o analito de interesse está em fase gasosa e é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é

aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron, gerando o íon molecular. Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos^{34, 38}.

O analisador de massas separa então a mistura de íons formados durante a etapa de ionização segundo seus m/z para gerar um espectro. Dentre os analisadores de massas existentes, o quadrupolo é o mais freqüentemente presente nos espectrômetros de massas, sendo estes projetados especialmente como detectores de cromatógrafos a gás³⁶.

O analisador de massas com quadrupolo é formado por quatro hastes metálicas paralelas sobre as quais se aplica um potencial elétrico constante e um potencial oscilante de rádio frequência. O campo elétrico estabelece trajetórias complexas para os íons, quando eles migram da câmara de ionização na direção do detector, permitindo apenas que íons com determinada razão m/z alcancem o detector. Os demais íons, com valores diferentes de m/z têm oscilações erráticas e colidem com um dos tubos e se perdem antes de alcançar o detector. Com a variação rápida dos potenciais elétricos aplicados, selecionam-se íons com massas diferentes para atingirem o detector³⁷.

Quando se faz o acoplamento da cromatografia com a MS, obtém-se o cromatograma de massas e o espectro de massas. O espectro de massas é um gráfico que apresenta as massas dos fragmentos positivos (incluindo o íon molecular) nas suas concentrações relativas, seguindo a sequência de fragmentação. O cromatograma de massas é assim denominado por se tratar de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este³⁹.

O cromatograma contendo todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é denominado “cromatograma de íons totais” (“*total ion chromatogram*”) - TIC. O cromatograma constituído apenas pelos íons de interesse pode ser obtido pelo monitoramento dos íons selecionados (“*selected ion monitoring*”) – SIM, ajustando-se o detector de massas para que sejam observados apenas os íons de razão m/z de interesse ou selecionando-os a partir de um banco de dados que contenha os espectros de massas completos³⁸.

2.4 Monitorização da exposição ao tabaco

Apesar do aumento das políticas públicas que visam combater o tabagismo, este ainda é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a principal causa evitável de

morbidade e mortalidade em todo o mundo⁴⁰, sendo apontado como a principal causa de câncer de pulmão e um importante fator para as doenças crônicas não transmissíveis mais prevalentes como as doenças cardiovasculares, doenças pulmonares inflamatórias e diabetes. Além disso, o ato de fumar provoca efeitos nocivos para saúde sexual e reprodutiva, saúde ocular, saúde oral e para o envelhecimento da pele⁴¹.

De acordo com dados recentemente publicados pela OMS no relatório “Epidemia Global do Tabaco 2013”⁴⁰, cerca de 6 milhões de pessoas morrem por ano no mundo devido ao uso de cigarro e, se essa tendência se mantiver, o número de mortes ligadas ao fumo deve aumentar para 8 milhões ao ano em 2030. O documento ressalta as tendências sobre o uso da substância, os avanços com relação ao seu combate pelo mundo e a urgente necessidade de se despender mais esforços no combate ao tabagismo. Neste sentido, são apontadas como principais medidas estratégicas a monitorização do uso do tabaco e das políticas de prevenção; a criação de ambientes 100% livres de fumo; o fornecimento de tratamento para dependentes; a presença de advertências sobre os riscos à saúde nas embalagens; a proibição da publicidade, promoção e patrocínio; e o aumento dos impostos sobre o tabaco.

A monitorização da exposição ao tabaco é realizada através da análise de biomarcadores específicos. Dentre as várias substâncias propostas para tal finalidade, a nicotina e alguns de seus metabólitos têm sido os mais empregados, uma vez que não sofrem influência de outras fontes ambientais além da fumaça do cigarro, sendo assim considerados biomarcadores específicos da exposição ao tabaco⁴².

A nicotina é um alcaloide do tabaco que representa sua substância farmacologicamente ativa mais abundante (98% do total de alcalóides) e é a responsável pela dependência ao tabaco devido as suas propriedades viciantes. Além disso, a nicotina apresenta-se como um agente tóxico altamente potente, sendo sua dose letal média para o homem em torno de 40 a 60 mg/Kg e, a DL50 para rato, de 50 a 60 mg/kg^{43, 44}.

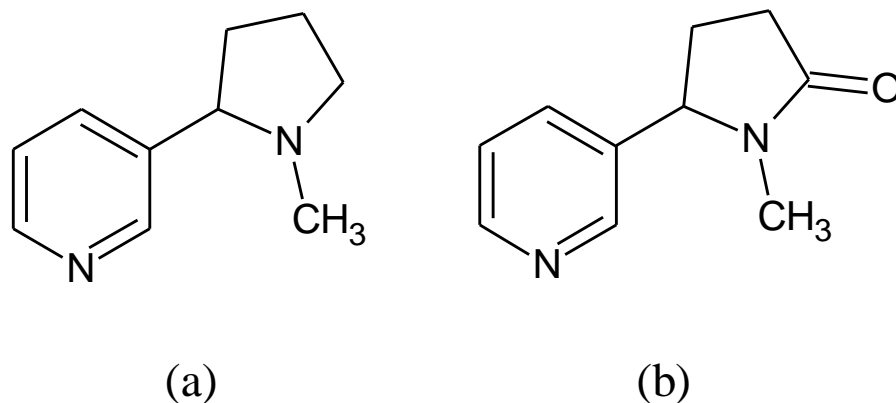
A nicotina é rapidamente absorvida pela pele, mucosas nasal e bucal e pelos pulmões. Uma vez na circulação, a nicotina é rápida e amplamente distribuída aos órgãos e tecidos do organismo, atingindo rapidamente o cérebro (entre 10 e 16s), onde se difunde prontamente e se liga aos receptores nicotínicos da acetilcolina produzindo efeitos psicoativos, como excitação, relaxamento e alteração do humor^{44, 45}. Além disso, atravessa a barreira placentária e é excretada no leite materno, constituindo risco potencial durante a gravidez e lactação⁴⁶.

Sua biotransformação é principalmente hepática, apresentando meia-vida de aproximadamente 2 horas. Seu principal produto de biotransformação é a cotinina, a qual é produzida por uma oxidação na posição 5 do anel pirrolidínico. A Figura 4 mostra as

estruturas químicas da nicotina e da cotinina. Estima-se que 70 - 80% da nicotina absorvida sejam biotransformados em cotinina, cuja meia-vida é mais longa, de cerca de 20h. Devido sua elevada meia-vida, a cotinina pode ser determinada em diferentes fluidos biológicos durante vários dias após a exposição à fumaça de tabaco, o que constitui um parâmetro mais adequado na avaliação do consumo total do que a nicotina.^{44, 47, 48}

A nicotina e a cotinina podem ser determinadas em vários fluidos biológicos como plasma, saliva e urina⁴⁹, e até mesmo no cabelo⁵⁰. Desta forma, a nicotina e a cotinina têm sido amplamente utilizadas como marcadores biológicos para determinação do tabagismo e/ou da exposição ambiental a fumaça do tabaco^{47, 51}. Para tal finalidade, a urina geralmente é a amostra biológica de escolha, uma vez que é uma amostra facilmente obtida por meio não-invasivo, sem risco ocupacional a saúde, além de ser menos viscosa apresentando maior facilidade de manipulação em comparação ao plasma e a saliva^{47, 48}.

Figura 4 – Estrutura química (a) nicotina, (b) cotinina.



Fonte: do autor.

Embora não exista um *cut-off* legalmente estabelecido para nicotina e cotinina em amostras biológicas, Machaceh e Jiang (1986)⁵² demonstraram que para cotinina plasmática valores médios de 2 ng mL⁻¹ e 140 ng mL⁻¹, foram encontrados para não-fumantes e fumantes (cerca de 10 cigarros por dia), respectivamente. Em outro estudo realizado mais recentemente, Kuo e colaboradores (2008)⁵³ definem que níveis de cotinina plasmática menores que 17,6 ng mL⁻¹ determina um fumante passivo; já, aqueles com níveis entre 17,6 e 113 ng mL⁻¹ são considerados fumantes moderados e, níveis de cotinina plasmática acima de 113 ng mL⁻¹ são encontrados em indivíduos que fumam 10 ou mais cigarros por dia. Para a cotinina urinária, Tapani *et al.* (1999)⁴⁷ demonstraram que valores acima de 100 ng mL⁻¹ qualificam uma pessoa como fumante ativo; enquanto que Jarvis *et al.* (1987)⁵⁴ determinaram que concentrações de 22,5 ng mL⁻¹ e abaixo de 5 ng mL⁻¹ indicam, respectivamente, fumantes

passivos e não exposição à fumaça do tabaco. Já, se tratando da nicotina, em um estudo realizado por Man *et al.* (2006)⁵⁵, no qual foram analisadas 242 amostras de fumantes, os autores concluíram que não é possível determinar o status de fumante a partir da nicotina urinária, uma vez que a nicotina apresenta meia-vida muito curta o que resulta em uma ampla faixa de níveis de nicotina urinária que não correlacionam com o hábito de fumar dos indivíduos.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar o desempenho de um MIP magnético na extração de nicotina e cotinina em amostras de urina humana com quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para tal, os objetivos específicos foram:

- a) Sintetizar MMIP para extração de nicotina e cotinina em urina;
- b) Caracterizar o material obtido por meio de microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, infravermelho e análise termogravimétrica;
- c) Avaliar o desempenho do MMIP em termos de separação e determinação dos analitos em urina humana;
- d) Otimizar as condições cromatográficas para análise de nicotina e cotinina em amostras de urina humana;
- e) Validar a metodologia de acordo com os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e recuperação;
- f) Avaliar a potencialidade do sistema para a quantificação dos analitos em amostras reais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são descritos os materiais, reagentes e equipamentos, bem como a metodologia empregada.

4.1 Reagentes, padrões e solventes

Padrões de nicotina e cotinina, cloreto de ferro(II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate (MPS), tetraetilortosilicato (TEOS), ácido metacrílico (MAA) como MF, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) como ALC, ácido 4,4'-azobis(4-cianovalérico) (ABCVA) como IR, metanol e acetonitrila (ACN) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi obtido da Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil). Hidróxido de amônio e álcool isopropílico foram obtidos da Isofar® (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido acético glacial e ácido clorídrico foram obtidos da Furlab® (São Paulo, Brasil) e Êxodo Científica (São Paulo, Brasil), respectivamente.

4.2 Preparo de soluções

As soluções estoque de nicotina $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e cotinina $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foram preparadas em metanol grau HPLC, acondicionadas em frasco âmbar, armazenadas a -20°C e utilizadas por um prazo máximo de seis meses. Já as soluções de trabalho de nicotina $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e cotinina $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas por diluição da solução estoque, em metanol grau HPLC, acondicionadas em frasco âmbar, armazenadas a -20°C e utilizadas por um prazo máximo de um mês.

4.3 Equipamentos

Para síntese do MMIP foram utilizados o banho ultrassônico, modelo USC2800A (Unique, São Paulo, Brasil); chapa aquecedora, modelo NT103 (Novatécnica, São Paulo, Brasil); agitador mecânico, modelo TE-099 Unidade Potter (Tecnal, São Paulo, Brasil); banho-maria (Frigomix B) acoplado com termostato Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemanha); agitador de tubos horizontal (Glas-Col, Washington, EUA); e estufa à vácuo (Novatécnica, São Paulo, Brasil). A extração foi processada com auxílio de um agitador de tubos Vibrax VXR basic (IKA®, São Paulo, Brasil); agitador vórtex Lab Dancer S25 (IKA®, São Paulo, Brasil); e um ímã ferromagnético. Para o preparo das soluções utilizou-se balança analítica (Shimadzu®, Kyoto, Japão); e sistema de purificação de água MILLI-Q. A análise cromatográfica foi realizada por meio de um cromatógrafo a gás modelo GC-2010 com detector de massas GCMS QP 2010 plus e autoinjeter AOC 20i+s (Shimadzu®, Kyoto, Japão). Para a caracterização dos materiais utilizou-se um espectrofotômetro de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), modelo IS50 (Thermo Scientific, Waltham, EUA); Termobalança, modelo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, EUA); microscópio eletrônico de varredura LV-JSM, modelo 6360 (JEOL, Tokyo, Japão); e microscópio de força atômica NanoScope IIIa (Veeco Instruments, Nova Iorque, EUA).

4.4 Metodologia

Nesta seção são descritas todas as metodologias testadas para cada fase de desenvolvimento do projeto.

4.4.1 *Síntese do polímero magnético molecularmente impresso*

A síntese do MMIP foi realizada em três etapas. Na primeira etapa foi realizada a síntese das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ pelo método de co-precipitação. Em seguida,

foi realizada uma etapa de modificação da superfície das nanopartículas magnéticas, a fim de se impedir a agregação dessas nanopartículas, possibilitando assim sua boa dispersão em solução, além de inserir em sua superfície grupamentos vinílicos necessários para execução da próxima e última etapa que é a polimerização molecularmente impressa.

4.4.1.1 Síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4

Foram testados dois protocolos para a síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas. O primeiro deles (protocolo A) foi realizado em duas etapas: síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 seguido da sua funcionalização com MPS. Já o segundo protocolo (protocolo B) envolveu três etapas: síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 seguida da sua estabilização com TEOS e, por fim, a funcionalização com MPS. Além do número de etapas, os protocolos diferiram também nas quantidades dos reagentes e nas condições empregadas durante as reações.

Protocolo A:

O primeiro protocolo foi realizado de acordo com o trabalho de Bouri *et al.* (2012)⁵⁶, o qual foi escolhido inicialmente por envolver um menor número de etapas, o que implicaria em preparo mais rápido e com menor gasto de reagentes e solventes.

A síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 foi realizada pelo método de coprecipitação conforme se segue: 180 mL de uma solução aquosa contendo 11,2 mmol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 5,6 mmol de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foi aquecida a 50°C. Então, 12,5 mL de solução de hidróxido de amônio 28% foram adicionados sob agitação vigorosa, sendo em seguida aquecida e mantida a 90°C por 30 min sob fluxo de N_2 . Este último procedimento se faz necessário uma vez que a magnetita (Fe_3O_4) é instável na presença de O_2 , sendo oxidada à maguemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$)⁵⁷. Terminada a reação, o precipitado foi coletado pelo uso de um ímã externo, lavado várias vezes com água até que o sobrenadante ficasse límpido, e em seguida lavado com etanol e seco em estufa à vácuo, à 60°C por 24h.

Posteriormente, foi realizada a etapa de funcionalização das nanopartículas obtidas com MPS inserindo-se, na superfície das nanopartículas magnéticas, grupamentos vinílicos necessários para etapa de polimerização. Para tal, 50 mg de nanopartículas magnéticas de

Fe₃O₄ foram adicionadas em 25 mL de uma mistura de etanol e água (1:1, v/v) e submetidas ao banho ultrassônico até completa dispersão. Então, 4 mL de MPS foram gotejados e a reação foi mantida por 12h a 40°C, sob agitação constante. Por fim, o produto da reação foi coletado pelo uso de um imã externo, lavado várias vezes com água até que o sobrenadante ficasse límpido, em seguida lavado com etanol e seco em estufa à vácuo, à 60°C por 24h.

Protocolo B:

No segundo protocolo as nanopartículas de Fe₃O₄ também foram sintetizadas pelo método de co-precipitação, mas com algumas alterações em relação ao protocolo A, de acordo como trabalho de Chen *et al.* (2013)⁵⁸. Conforme descrito no referido artigo, 15 mmol de FeCl₃.6H₂O e 10 mmol de FeCl₂.4H₂O foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada, previamente aquecida à 80°C, sob fluxo de N₂ e agitação vigorosa. Em seguida, gotejou-se 50 mL de solução de hidróxido de amônio 28%. A reação foi mantida por 30 min, sob agitação constante e fluxo de N₂. Terminada a reação, coletou-se o precipitado negro, o qual foi lavado com água deionizada até que o pH do sobrenadante ficasse neutro. Por fim, o material foi seco em estufa à vácuo à 60°C por 24h.

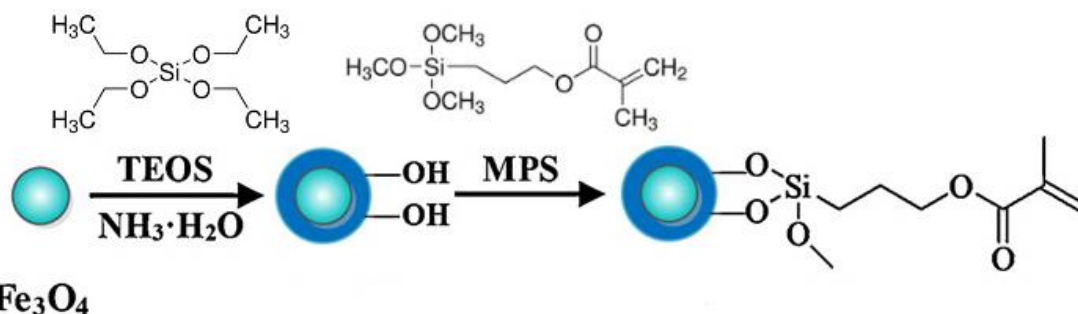
Em seguida procedeu-se a etapa de modificação da superfície das nanopartículas de Fe₃O₄ pelo método de silanização, o qual envolve duas etapas subsequentes: primeiro a estabilização das nanopartículas com TEOS, seguida da sua funcionalização com MPS (FIGURA 5).

A estabilização com TEOS foi realizada de acordo com o trabalho de Zeng *et al.*, (2012)⁵⁹. Para tal, adicionou-se 600 mg de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ em 60 mL de uma mistura isopropanol-água deionizada (5:1, v/v) e sonicou por 20 min para promover a dispersão das nanopartículas. Então, adicionou-se rapidamente 10 mL de solução de hidróxido de amônio 28% e 4 mL de TEOS, sob agitação mecânica constante. A reação foi mantida por 12h, à temperatura ambiente e agitação constante. Então, as nanopartículas de Fe₃O₄@SiO₂ foram coletadas com imã externo, lavadas com água deionizada até o sobrenadante atingir pH neutro e secas em estufa à vácuo, à 60°C por 24h.

Por fim procedeu-se a funcionalização com MPS seguindo o trabalho de Kong *et al.* (2012)⁶⁰, com algumas modificações. Assim, 200 mg de nanopartículas de Fe₃O₄@SiO₂ foram dispersas em 50 mL de metanol e sonicadas por 30 min. Em seguida, gotejou-se 3 mL de MPS sob agitação vigorosa. A reação foi mantida à temperatura ambiente e agitação constante por 48h. As nanopartículas de Fe₃O₄@SiO₂-MPS obtidas foram então coletadas

com imã externo, lavadas com metanol até que o sobrenadante ficasse límpido e secas em estufa à vácuo, à 60°C por 24h.

Figura 5 – Método de silanização.



Fonte: CHEN; XIE, SHI, p. 113, 2013 (editado pelo autor).

4.4.1.2 Síntese do MMIP

A síntese do MIP foi conduzida de acordo com os trabalhos de Figueiredo *et al.* (2009)²⁷ e Chen *et al.* (2013)⁵⁸, com algumas adaptações, adotando-se a metodologia de polimerização por precipitação. Para tal, 0,4 mmol de nicotina (MM) e 2,0 mmol de MAA (MF) foram adicionados em 20 mL de acetonitrila (solvente de síntese) em um frasco a parte e, 489 mg de nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -MPS foram adicionadas à ampola de síntese contendo mais 20 mL de acetonitrila. Ambos os frascos foram colocados simultaneamente no banho ultrassônico por 1h. Em seguida, a solução contendo MM e MF, foi vertida na ampola de síntese, e então adicionou-se 12,0 mmol de EGDMA (ALC) e 80,0 mg de ABCVA (IR). A mistura reacional foi submetida ao ultrassom por mais 30 minutos e purgada com nitrogênio por 15 minutos, a fim de eliminar o oxigênio presente no meio reacional. Posteriormente, a ampola foi selada e imersa em banho-maria a 75 °C, sob agitação mecânica por 24 h, tempo este requerido para a completa reação de polimerização. O material resultante foi coletado com um imã externo e lavado várias vezes com uma mistura de metanol:ácido acético (9:1, v/v) para completa remoção da MM. Em seguida, procedeu-se a lavagem com metanol puro a fim de se remover resquícios de ácido acético. Por fim, as partículas obtidas foram secas a 60°C sob vácuo por 24h.

4.4.2 Caracterização

O tamanho médio e a morfologia das partículas sintetizadas foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). A verificação da eficácia das diferentes etapas de revestimento das nanopartículas magnéticas procedeu-se através de análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS) e análise termogravimétrica (TGA).

Para obtenção dos espectros de infravermelho empregou-se espectrofotômetro FT-IR com refletância total atenuada (ATR), por contato direto da amostra sob o feixe de IV, com resolução 4 cm^{-1} , 128 scan e limites entre $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ para análise das nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$; e $4000\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$ para análise do MMIP.

A análise termogravimétrica foi realizada em uma termobalança, empregando-se uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, iniciando à temperatura ambiente até 800°C e sob um fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1} .

Para as análises de MEV/EDS, as amostras foram previamente recobertas por uma fina camada de platina e empregou-se uma voltagem de aceleração de elétrons de 15 kV .

Nas análises por AFM as amostras foram dispersas em álcool isopropílico, agitadas em vórtex e submetidas ao ultrassom por 5 min . Então, uma gota da dispersão foi adicionada sob a mica previamente clivada, a qual foi colocada em dessecador para secagem das amostras. Então, as amostras secas foram analisadas empregando-se uma ponteira magnética (silício revestida com cobalto), frequência de ressonância de 75 kHz e constante de força de $2,8\text{ N m}^{-1}$. Foram realizadas as análises de topografia e de força magnética. Ambas foram realizadas empregando-se a ponteira magnética, no entanto para a obtenção da topografia o AFM é operado no modo contato onde a ponteira é colocada em contato com a amostra e a imagem vai se formando devido às forças atrativas e repulsivas do tipo Van der Waals, entre a ponteira e a amostra. Já para a obtenção das imagens de força magnética é utilizado o modo de não-contato, onde a ponteira varre a amostra a uma distância mínima (de $10 - 500\text{ nm}$), sendo a imagem formada devido à força magnética entre a ponteira e o material.

4.4.3 Amostras

As amostras de urina destinadas à formação do *pool* ($n = 5$) para o desenvolvimento da metodologia foram obtidas de voluntários adultos sadios não fumantes, na faixa etária entre 20 e 50 anos. Já, as amostras de urina ($n = 4$) destinadas a determinação de nicotina e cotinina, foram obtidas de voluntários adultos que relataram ser fumantes, na mesma faixa etária. A urina foi coletada diretamente em frasco de polietileno, quimicamente limpo. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração ($2-6^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise. Ressalta-se que as amostras de fumantes foram processadas no mesmo dia da coleta. A coleta das amostras foi realizada mediante aprovação no Comitê de Ética em pesquisa da Unifal-MG, protocolo nº 18026513.8.0000.5142.

As amostras foram previamente filtradas em papel de filtro, fortificadas com nicotina e cotinina, e submetidas ao banho ultrassônico por 10 minutos.

4.4.4 Processo de extração

O processo de extração constituiu-se basicamente em duas etapas, a saber: carregamento da amostra e dessorção dos analitos. Ambas as etapas foram processadas da mesma forma, conforme descrito anteriormente: a amostra ou solvente (de acordo com cada etapa) foi adicionado ao tubo de ensaio contendo o MMIP, o tubo foi agitado em agitador de tubos e, em seguida, as partículas de MMIP foram recuperadas por um ímã externo na parede do tubo, e a amostra/solvente foi descartado entornando-se o tubo.

Assim, 20 mg do MIP magnético foram adicionados em 2 mL de amostra de urina, deixando sob agitação por 20 min para ocorrer a adsorção dos analitos. Em seguida, foi realizada a eluição dos analitos com 3 mL de metanol e 25 μL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, agitando-se por 20 min. Então, 2,7 mL do eluato foi coletado em tubo de ensaio e seco à vácuo à 60°C em um secador de amostras. O resíduo foi ressuscitado em 200 μL de metanol, filtrado em membrana de PVDF (0,45 μm de poro e 13 mm de diâmetro) e 2 μL foram injetados e analisados por GC-MS.

4.4.5 Condições cromatográficas

A nicotina e cotinina foram determinadas por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, empregando-se uma coluna RTX5-MS Restek[®] (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e utilizando-se hélio como gás de arraste em um fluxo de 1,6 mL min⁻¹, com velocidade linear de 47,4 cms⁻¹. O injetor foi operado a 250 °C no modo splitless. A seguinte programação do forno foi utilizada: temperatura inicial de 120°C, seguido de aumento de 40°C min⁻¹ até 280°C, mantendo a 280°C por 4 min. Portanto o tempo total da corrida foi de 8 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo SIM (monitoramento seletivo de ions) com ionização por impacto de elétrons (70 eV). A temperatura da interface foi 280 °C e a temperatura da fonte de íons foi de 250 °C. As relações m/z monitoradas foram 84, 133 e 162 para a nicotina e 98, 147 e 176 para a cotinina. A quantificação baseou-se na integração das áreas dos picos de m/z 84 (nicotina) e 98 (cotinina).

Para fins de otimização das condições cromatográficas foram empregadas inicialmente as condições descritas por Man *et al.* (2006)⁵⁵. Os parâmetros alterados foram temperatura inicial e final do forno, bem como a taxa de aquecimento, com consequente alteração do fluxo e pressão do gás de arraste. Além disso, empregou-se um maior volume de amostra. Os critérios de otimização foram eficiência de separação dos analitos, tempo de corrida e sensibilidade do método. A escolha das relações m/z a serem monitoradas para cada um dos analitos foi feita mediante a obtenção do espectro de massas dos respectivos padrões, tendo sido selecionadas as três relações m/z mais abundantes para cada analito.

4.4.6 Validação e aplicação do método

Os parâmetros de validação avaliados foram linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão, adotando-se como guia a Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA⁶¹. Para tal, utilizou-se um pool de urina obtido pela mistura de cinco amostras de indivíduos não fumantes, com o intuito de compensar o efeito da matriz nos processos de extração das amostras de urina.

O estudo da linearidade foi feito por meio da análise em quintuplicata de amostras de urina fortificadas com soluções padrões de nicotina e cotinina nas concentrações de 0,1; 0,5;

1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹. O limite de quantificação (LQ) foi determinado como o menor valor passível de ser quantificado com precisão e exatidão. A precisão e exatidão intra e interdias foram avaliadas por meio de amostras de urina fortificadas com nicotina e cotinina nas concentrações de 0,1; 1,0; e 3,0 mg L⁻¹ analisadas também em quintuplicata, no mesmo dia e em dias consecutivos. A recuperação foi obtida comparando-se o resultado analítico de amostra extraída, com o resultado obtido com solução padrão não extraída, que representa 100% de recuperação.

A metodologia foi empregada na análise de quatro amostras de urina de fumantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em seguida são discutidos os resultados obtidos.

5.1 Síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4

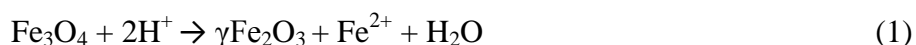
Dois protocolos (A e B) foram testados para a síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 . O protocolo A apresentou-se mais rápido, com uma etapa a menos, o que além de economizar tempo, reduz as quantidades de reagentes e solventes empregados. No entanto, o material final obtido apresentou dificuldade para ser separado pelo uso de um ímã externo, quando disperso em solventes aquosos e/ou orgânicos, o que levou a um baixo rendimento ($\pm 11\text{mg}$) devido à perda do material durante a etapa de lavagem.

Ainda assim, testou-se a síntese do polímero molecularmente impresso utilizando este material como núcleo magnético. Entretanto, o polímero obtido também apresentou essa dificuldade de separação, tornando-o impróprio para a finalidade a qual se propõe. Isso porque, além de necessitar de um tempo demasiado longo em contato com o ímã, o que aumenta o tempo gasto na extração, essa dificuldade de separação compromete também a reprodutibilidade e a sensibilidade do método. Esse comprometimento ocorre devido à perda do polímero durante as etapas da extração, uma vez que, a quantidade perdida era nitidamente grande e heterogênea entre os tubos e que, com o polímero, perde-se também o analito ligado a ele. Neste sentido, um segundo protocolo (B) foi testado.

No protocolo B, o método de co-precipitação foi mantido uma vez que este é o método clássico de obtenção de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , com as vantagens de ser mais simples e mais eficiente no que se refere ao rendimento e tempo de reação⁵⁷. Além disso, é o método mais comumente empregado para obtenção de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 para fins de associação aos polímeros molecularmente impressos.

Em comparação ao protocolo A, foi empregada uma maior concentração de sais de ferro e um volume 5 vezes maior de solução de hidróxido de amônio. Essas alterações provavelmente contribuíram para a melhora na performance do material obtido, já que a concentração dos sais de ferro e o pH do meio são fatores que interferem fortemente nas

propriedades das nanopartículas finais. De acordo com Laurent *et al.* (2008)⁵⁷, uma maior concentração dos sais de ferro promove a redução do tamanho e da distribuição do tamanho de partícula, produzindo um material mais homogêneo, o que é coerente uma vez que um meio concentrado favorece a etapa de nucleação na síntese das nanopartículas. Conforme dito anteriormente, a magnetita é muito instável, sendo facilmente oxidada à maguemita na presença de O₂. Além da oxidação pelo ar, a magnetita também pode ser transformada em maguemita através da reação com o excesso de H⁺ presente no meio, conforme a equação 1⁵⁷. Assim, o emprego de um excesso de solução de hidróxido de amônio assegura a produção de um material mais puro, ou seja, com mínima formação de maguemita durante a reação.



No protocolo B, optou-se por realizar a etapa de modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ pelo método de silanização, uma vez que este é o método mais reportado na literatura. Embora este método seja mais longo, com uma etapa a mais, resultando em maior gasto de reagentes e solventes, o material obtido apresentou melhor performance, separando-se da dispersão de forma rápida e completa quando submetido à presença do imã externo, tanto em solvente aquoso quanto em solvente orgânico. Assim, obteve maior rendimento do material final (± 169 mg) por ocorrer perda mínima durante as etapas de lavagem.

Além disso, comparando-se as etapas de funcionalização dos dois protocolos testados, pode-se observar que foi possível empregar menor quantidade de MPS para uma maior massa de nanopartículas magnéticas (protocolo A: 4 mL de MPS para 50 mg de nanopartículas; protocolo B: 3 mL de MPS para 200 mg de nanopartículas). Assim, embora tenha sido acrescentado um reagente (TEOS), em contrapartida reduziu-se a quantidade empregada de outro reagente (MPS), tendo como saldo final a redução do custo da síntese já que o MPS é bem mais caro que o TEOS (25 mL de MPS $\geq 98\%$ custa R\$ 215,00 enquanto que 1 L de TEOS $\geq 99\%$ custa R\$ 470,00; cotação realizada no site da Sigma Aldrich, em 15-04-2014).

Adicionalmente, os polímeros de impressão molecular magnéticos obtidos utilizando as nanopartículas magnéticas deste protocolo como núcleo, apresentaram também separação imediata e praticamente completa com o emprego do imã, sem perda visível de material. Importante ressaltar também que, os polímeros assim obtidos apresentaram rendimento

significativamente superior aos polímeros obtidos com as nanopartículas magnéticas do protocolo A, conforme será discutido posteriormente (TABELA 1, p. 40).

Acredita-se que essa melhora na performance do material se deva principalmente à inserção da etapa de modificação da superfície com o TEOS e, uma possível explicação seria o ganho considerável de massa das nanopartículas após a reação com TEOS. Nesta etapa, conforme já mencionado, foram adicionados 600 mg de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , sendo obtido como rendimento final $\pm 1,67\text{g}$ de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Esse ganho de massa prediz o conseqüente aumento do tamanho de partícula, o que pôde ser confirmado posteriormente por técnicas de caracterização. Assim, uma possível explicação para a separação mais eficiente do material em dispersão, é que partículas muito pequenas formam dispersões coloidais muito estáveis. Então o aumento do tamanho de partícula proporcionou uma redução da estabilidade do sistema coloidal, permitindo uma rápida separação das partículas quando submetidas ao campo magnético pelo uso de um imã externo.

Desta forma, o protocolo B foi selecionado como metodologia para a obtenção das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$.

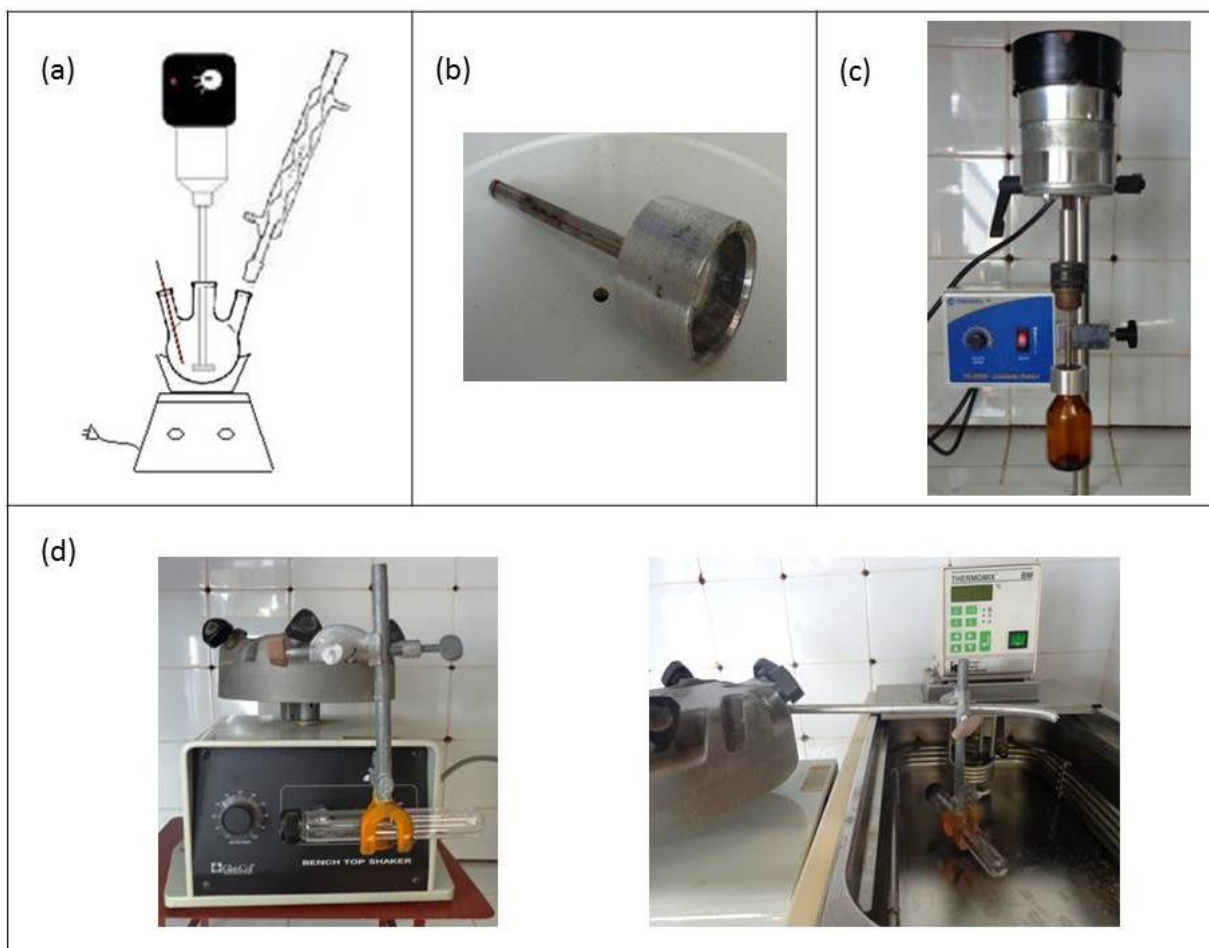
5.2 Síntese do MIP magnético

Inicialmente tivemos certa dificuldade em acertar a síntese do MMIP devido à impossibilidade de se utilizar agitação com barra magnética, uma vez que o material é magnético e seria atraído pela barra de agitação. Assim foi necessário utilizar agitação mecânica, o que não seria um problema se o ambiente reacional não precisasse ser isento de O_2 . Lembrando que o O_2 interfere na reação de polimerização radicalar por consumir os radicais livres responsáveis por iniciar a polimerização, o meio reacional deve estar livre de O_2 durante todo o tempo de síntese (24h). Vale ressaltar ainda que, a agitação é um fator imprescindível para a obtenção do polímero devido à presença das nanopartículas magnéticas, as quais devem estar dispersas para que a polimerização ocorra na sua superfície, produzindo assim um material homogêneo.

Desta forma, foi testada a síntese em ambiente aberto, com fluxo contínuo de N_2 , utilizando um agitador mecânico com movimento rotacional na vertical (FIGURA 6a). Isso porque utilizando esse agitador mecânico não foi possível selar completamente o sistema, devido à necessidade de se ter um orifício para passagem da barra de agitação mecânica, o

que permitia também a entrada e saída de gases e/ou vapores. No entanto, considerando o tempo de reação longo (24h), o solvente de síntese evaporou, alterando a proporção dos constituintes e impedindo uma adequada reprodutibilidade da síntese. Adicionalmente, a síntese em sistema aberto tem a desvantagem de gastar uma grande quantidade de N_2 .

Figura 6 – Sistemas de síntese.



Fonte: do autor.

Notas: (a) síntese em ambiente aberto, (b) suporte que encaixa na tampa do frasco de vidro âmbar, (c) síntese em ambiente fechado com agitação na vertical e (d) síntese em ambiente fechado com agitação na horizontal.

Em seguida, conseguimos desenvolver um suporte para o mesmo agitador mecânico (FIGURA 6b), que encaixa na tampa de um frasco de vidro âmbar, possibilitando assim a devida selagem do frasco e, portanto, a síntese em ambiente fechado (FIGURA 6c). Porém, com o movimento rotacional do frasco, as nanopartículas magnéticas ficaram aderidas na parede do frasco, assim apenas uma pequena fração polimerizou na superfície das nanopartículas magnéticas, ficando a maior parte do material polimérico sem o núcleo magnético. Desta forma, o rendimento de síntese foi muito pequeno e com um material bastante heterogêneo.

Por fim, testamos um sistema utilizando um agitador de tubos na horizontal com movimento de vai-e-vem que permitiu a obtenção de um material mais homogêneo e com maior rendimento. Assim, procedeu-se a síntese em um tubo de vidro que foi selado, imerso em banho de água e agitado na horizontal (FIGURA 6d).

Importante notar também que, durante a otimização destes sistemas, alguns componentes da síntese foram alterados. Por exemplo, iniciamos os testes utilizando o clorofórmio como o solvente de síntese, de acordo com o trabalho de Figueiredo *et al.* (2009)²⁷, no entanto devido à alta volatilidade do clorofórmio optamos por utilizar a acetonitrila como solvente, com o intuito de acertar a síntese em sistema aberto. Porém, mesmo a ACN sendo menos volátil e tendo evaporado em menor proporção, não foi possível realizar a síntese em sistema aberto. Outra alteração realizada foi a quantidade de nanopartículas magnéticas empregadas. Os testes iniciais foram realizados com 50mg de nanopartículas magnéticas, de acordo com o trabalho de Bouri *et al.* (2012)⁵⁶, mas como a maioria das partículas de polímero não ficavam magnéticas, fomos aumentando esta quantidade (de 50mg para 489mg) até obtermos um resultado satisfatório.

Simultaneamente a essas alterações e otimização do sistema de síntese, foram testadas as nanopartículas magnéticas obtidas pelos protocolos A e B, citados anteriormente. Como já foi dito, o MMIP obtido com as partículas do protocolo A apresentou grande dificuldade para ser separado pelo imã quando em dispersão, resultando em significativa perda do material durante as etapas de extração, enquanto que o MMIP obtido com as partículas do protocolo B apresentou melhor performance tanto em velocidade de separação quanto em quantidade de material perdido durante a extração. A tabela abaixo resume estes resultados.

Tabela 1 – Comparação da performance dos MMIPs obtidos com nanopartículas magnéticas dos protocolos A e B.

	MMIP obtidos com Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -MPS dos protocolos:	
	A	B
Rendimento médio	0,140g	1,3 g
Tempo de separação	60 a 120 s	Imediata
% de massa perdida após uma etapa de extração*	12,8 ± 1,4	3,14 ± 0,75

Nota: *Teste realizado em triplicata.

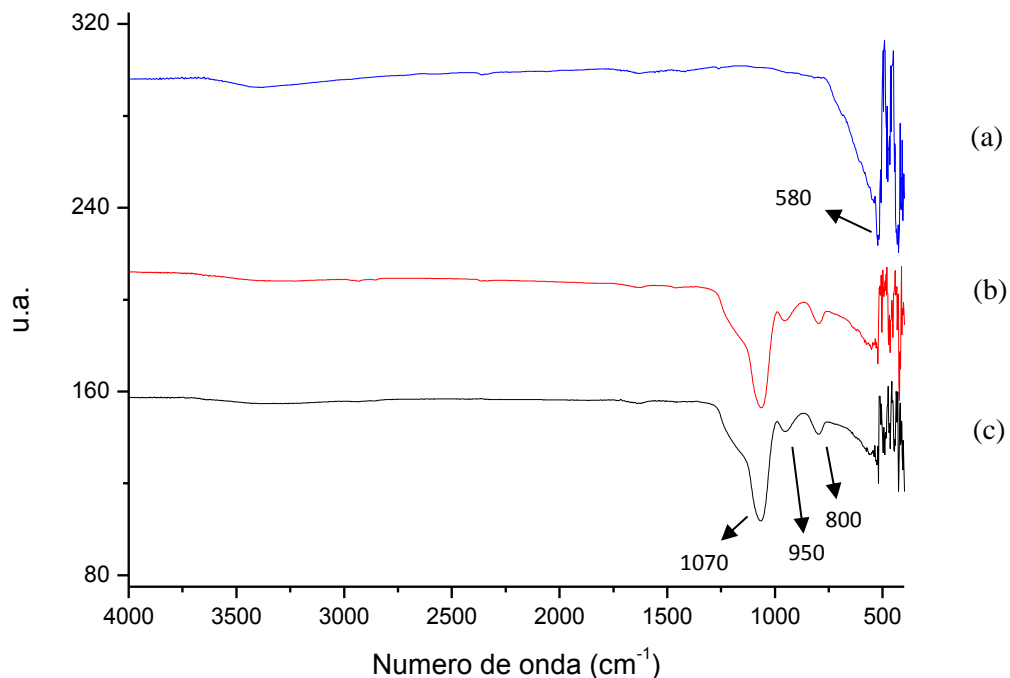
5.3 Caracterização

Abaixo são discutidos os resultados obtidos com as técnicas de caracterização.

5.3.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – FT-IR

A Figura 7 demonstra os espectros de infravermelho das nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-MPS}$. No espectro de FT-IR das nanopartículas de Fe_3O_4 o pico de absorção em aproximadamente 580 cm^{-1} é característico da vibração de estiramento da ligação Fe-O (FIGURA 7a). Nos espectros das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-MPS}$ (FIGURAS 7b e c) observa-se um forte pico de absorção em cerca de 1070 cm^{-1} e picos de absorção mais fraca em 950 e 800 cm^{-1} , referente às vibrações de estiramento das ligações Si-O-Si, Si-O-H e Si-O, respectivamente. Confirmando assim que as nanopartículas de Fe_3O_4 foram adequadamente revestidas com TEOS e MPS.

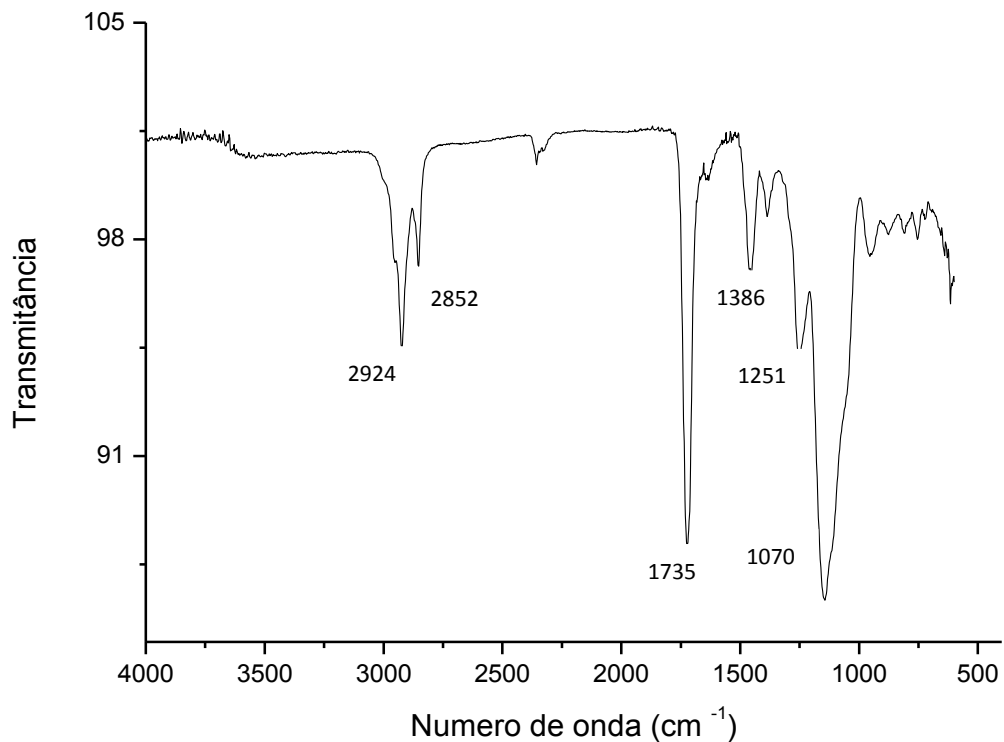
Figura 7 – Espectros de FT-IR das nanopartículas de (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ e (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-MPS}$.



Fonte: do autor.

Por fim, analisando o espectro de FT-IR do MMIP (FIGURA 8) é possível assegurar que ocorreu a polimerização na superfície das nanopartículas magnéticas pelo aparecimento dos picos de absorção intensos em 1735 cm^{-1} característico de vibração de estiramento de C=O de ésteres e, 1386 e 1251 cm^{-1} vibração de estiramento de C-O de ésteres, os quais se devem ao EGDMA. Adicionalmente, os picos em 2924 e 2852 cm^{-1} referentes à vibração de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H de carbono sp^3 , também confirmam a presença da camada polimérica na superfície das nanopartículas.

Figura 8 – Espectro de FT-IR do MMIP.



Fonte: do autor.

5.3.2 Análise Termogravimétrica – TGA

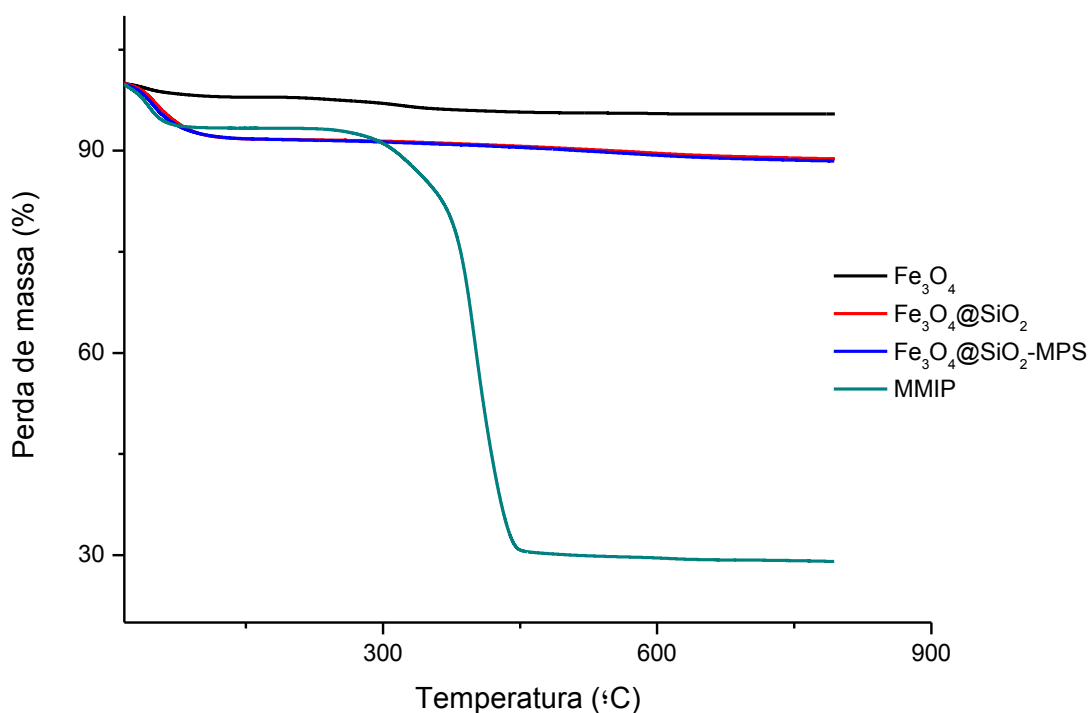
Com a análise termogravimétrica foi possível verificar não só a estabilidade térmica dos materiais como também a eficácia de encapsulação das nanopartículas magnéticas. Os resultados encontram-se na Figura 9 que demonstra a perda de massa em % de cada material,

com o aumento da temperatura. Na Figura 10 demonstramos os resultados apenas das nanopartículas de magnetita funcionalizadas com TEOS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) e com MPS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$) para facilitar a visualização da diferença no percentual de massa perdida, uma vez que estas apresentaram um comportamento muito parecido.

Conforme mostrado na Figura 9 e mais detalhadamente na Tabela 2, a pequena perda de massa das amostras em temperaturas inferiores à 200°C pode ser atribuída à eliminação de água para as quatro amostras.

As nanopartículas de magnetita apresentaram uma perda mínima de cerca de 4,54% em massa, o que é coerente uma vez que a magnetita é um material inorgânico, assim toda sua perda de massa pode ser atribuída à eliminação de água e, talvez, uma pequena porcentagem à presença de impurezas.

Figura 9 – Curvas TGA de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$ e MMIP. A uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, de 17°C à 800°C e sob fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1} .

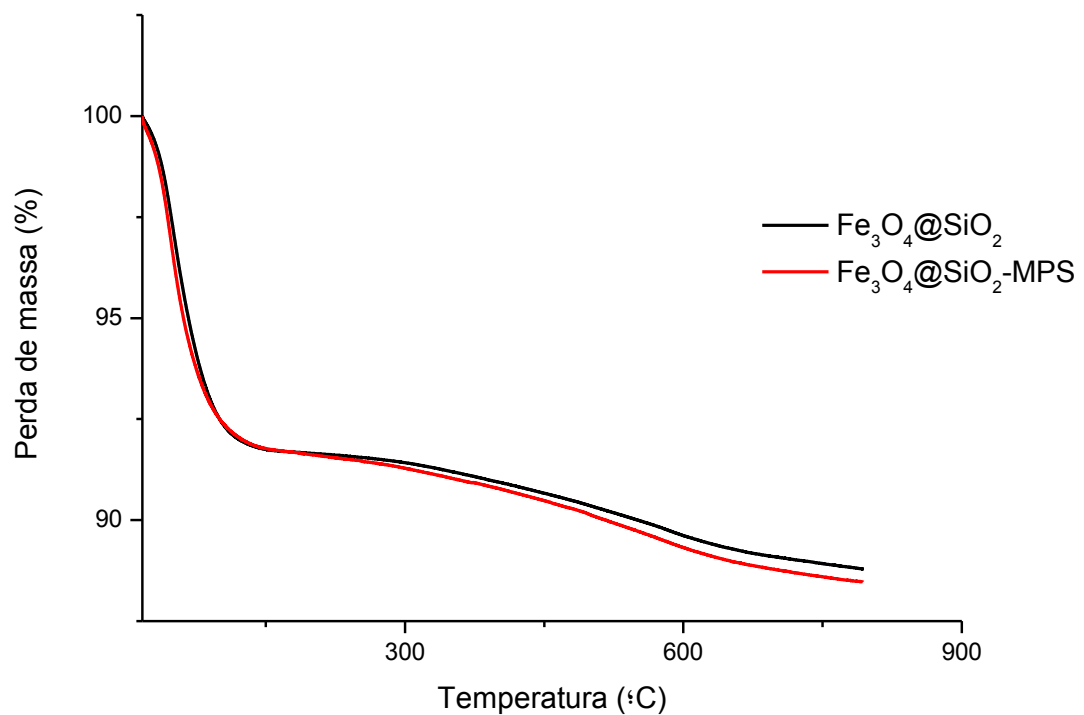


Fonte: do autor.

Além da perda de água, as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$ apresentaram uma perda de 2,86 e 3,15% respectivamente. No caso das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, essa perda de massa em temperaturas superiores a 200°C pode ser devido à condensação de grupamentos hidroxilas da sua superfície e/ou degradação de grupos etóxidos

residuais. Já para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$ provavelmente essa perda de massa se deve a decomposição da parte orgânica da molécula de MPS. Comparando-se as estruturas químicas dos dois reagentes (FIGURA 11), podemos concluir que a maior perda apresentada pelas nanopartículas recobertas com MPS é coerente, uma vez que o MPS apresenta uma maior cadeia carbônica.

Figura 10 – Curvas TGA de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$. A uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, de 17°C à 800°C e sob fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1} .

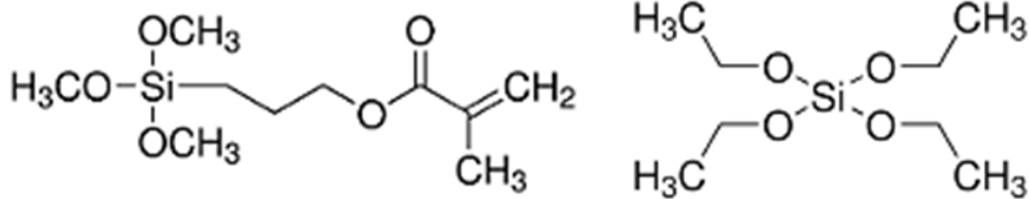


Fonte: do autor.

Tabela 2 – Perda de massa em % com o aumento da temperatura para 200 e 800°C .

	Perda de massa (%)	
	200 °C	800 °C
Fe_3O_4	2,11	4,54
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	8,35	11,21
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$	8,38	11,53
MMIP	6,68	70,94

Figura 11 – Estrutura química do TEOS e MPS.



3-(trimetoxisilil)propil metacrilato - MPS

Tetraetilortosilicato - TEOS

Fonte: do autor.

Por fim, a curva da análise termogravimétrica do MMIP mostra uma perda de massa significativamente superior em comparação aos outros materiais, o que assegura a presença de uma camada de polímero orgânico, sendo a decomposição desta camada a principal responsável por esta elevada perda (70,94%). Vale ressaltar ainda que esta análise comprova também a alta estabilidade térmica do MMIP (da ordem de 300 °C).

5.3.3 *Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (MEV/EDS)*

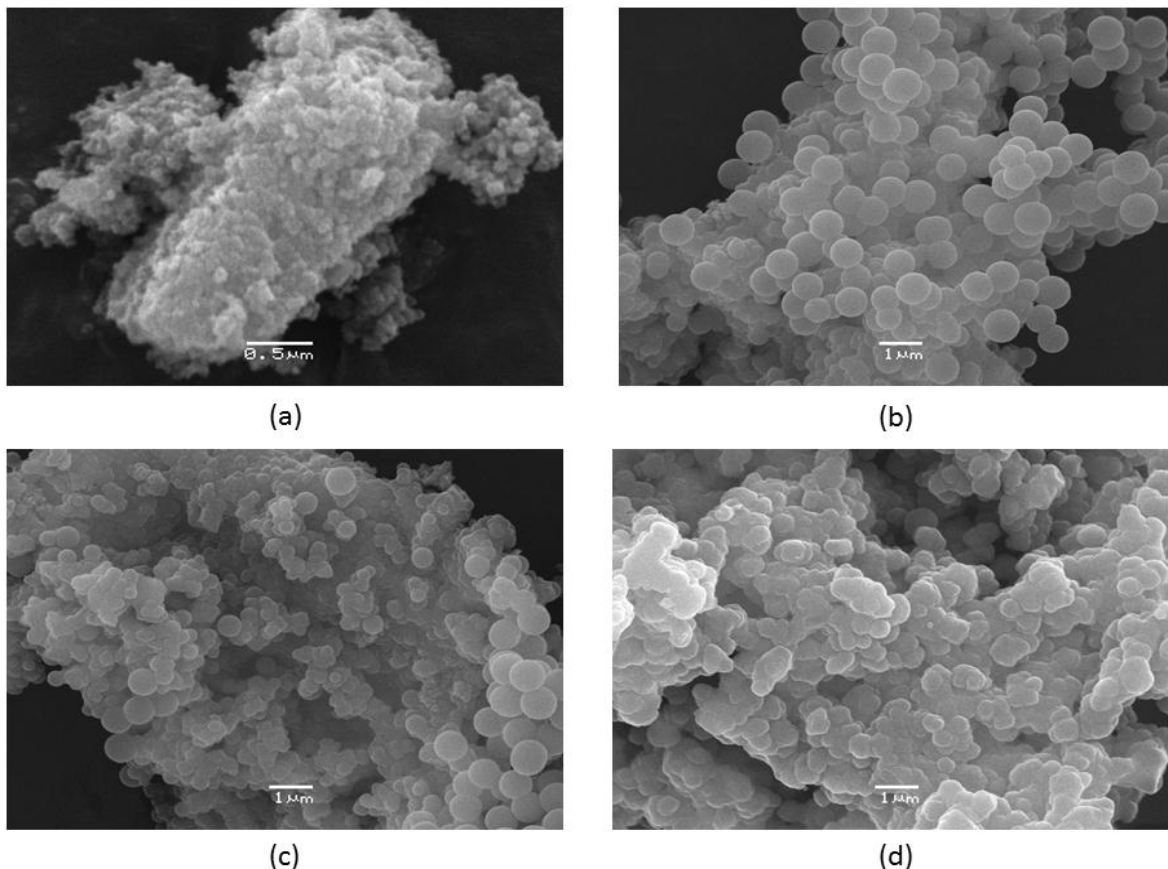
As imagens de MEV (FIGURA 12) permite a investigação da morfologia das partículas e, em alguns casos, uma noção do tamanho médio das partículas. Para as nanopartículas de magnetita não foi possível observar o formato das partículas, provavelmente devido às características do material, o qual forneceu imagens com baixa resolução. Já para as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com TEOS e MPS, foi possível observar nitidamente a predominância do formato esférico e, partículas com diâmetros variando de poucos nm até cerca de 600 nm. As imagens do MMIP, embora apresentem uma menor resolução, também sugerem um material com formato esférico.

A espectrometria de energia dispersiva de raios-X permite realizar uma análise qualitativa (FIGURA 13) da composição das partículas. Isso porque, embora sejam dados numéricos, a análise é pontual, não refletindo, portanto a composição de cada elemento na amostra total. Desta forma é possível verificar a eficácia de encapsulamento de cada uma das quatro etapas da síntese. Na análise de EDS das nanopartículas de Fe₃O₄ (FIGURA 13a) observamos a presença de átomos de ferro e oxigênio em grandes proporções, uma pequena

quantidade de carbono, provavelmente devido à contaminação e, a platina, que em todas as amostras analisadas provém do recobrimento de platina.

Já, para a análise das nanopartículas recobertas com TEOS (FIGURA 13b), podemos observar uma redução da % de ferro nas amostras e um aumento da % de oxigênio, além do pico de silício em grande proporção; o que comprova o recobrimento das nanopartículas de Fe_3O_4 com TEOS. Ademais, vale-se ressaltar a quantidade considerável de carbono (41,62%), que pode ser atribuída a presença de grupamentos etóxidos residuais na superfície da partícula.

Figura 12 – Imagens de MEV de (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -MPS e (d) MMIP.



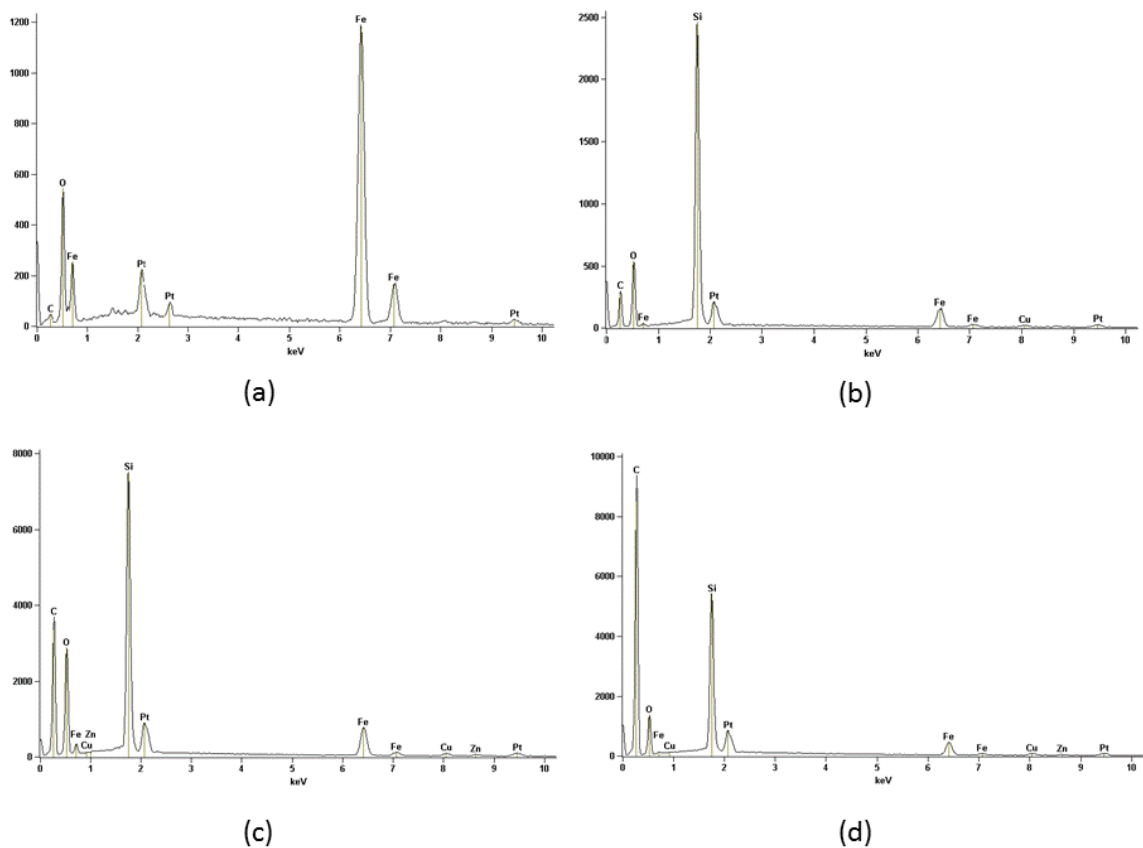
Fonte: do autor.

Da mesma forma, podemos comprovar a funcionalização com MPS (FIGURA 13c), verificando que a % de carbono na amostra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -MPS aumentou e a % de ferro diminuiu ainda mais. Importante notar que, embora o MPS contenha silício e oxigênio em sua estrutura, a % destes átomos reduziram em relação à amostra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$, o que se deve ao aumento da % de carbono (que agora representa mais de 50% da amostra – Tabela 3) e considerando que a parte orgânica da molécula de MPS está voltada para fora, enquanto que a

parte inorgânica faz a ligação com a partícula recoberta com TEOS; o que reforça a funcionalização da superfície das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ com MPS.

Seguindo a mesma lógica, verificamos um aumento significativo da % de carbono na amostra de MMIP (FIGURA 13d), o que é coerente uma vez que o carbono é o principal constituinte da cadeia polimérica, e a redução dos outros constituintes (oxigênio, silício e ferro). Assegurando assim que a polimerização ocorreu na superfície das nanopartículas magnéticas. Além disso, a presença de ferro, silício e oxigênio em pequenas proporções comprovam ainda a presença das nanopartículas magnéticas no interior do polímero. Vale ressaltar que a presença de cobre e zinco em quantidades muito pequenas provém de impurezas. Portanto, através da análise dos resultados de EDS podemos concluir que cada etapa de recobrimento das nanopartículas de Fe_3O_4 foi realizada com sucesso.

Figura 13 – Análise qualitativa de EDS.



Fonte: do autor.

Notas: (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ -MPS e (d) MMIP.

Tabela 3 – Análise qualitativa (%) de EDS (teste realizado em duplicata).

Elemento	Fe ₃ O ₄	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -MPS	MMIP
C	11,24	41,62	56,46	74,44
O	27,02	35,77	29,29	15,02
Si	–	10,60	6,27	4,02
Fe	54,02	4,79	3,54	2,40
Zn ¹	–	0,38	0,48	0,39
Cu ²	0,72	0,86	0,49	0,42
Pt ³	7,00	5,98	3,48	3,31
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

Notas: ^{1,2}Impurezas; ³Recobrimento das amostras com platina para permitir análise de MEV/EDS.

5.3.4 Microscopia de Força Atômica – AFM

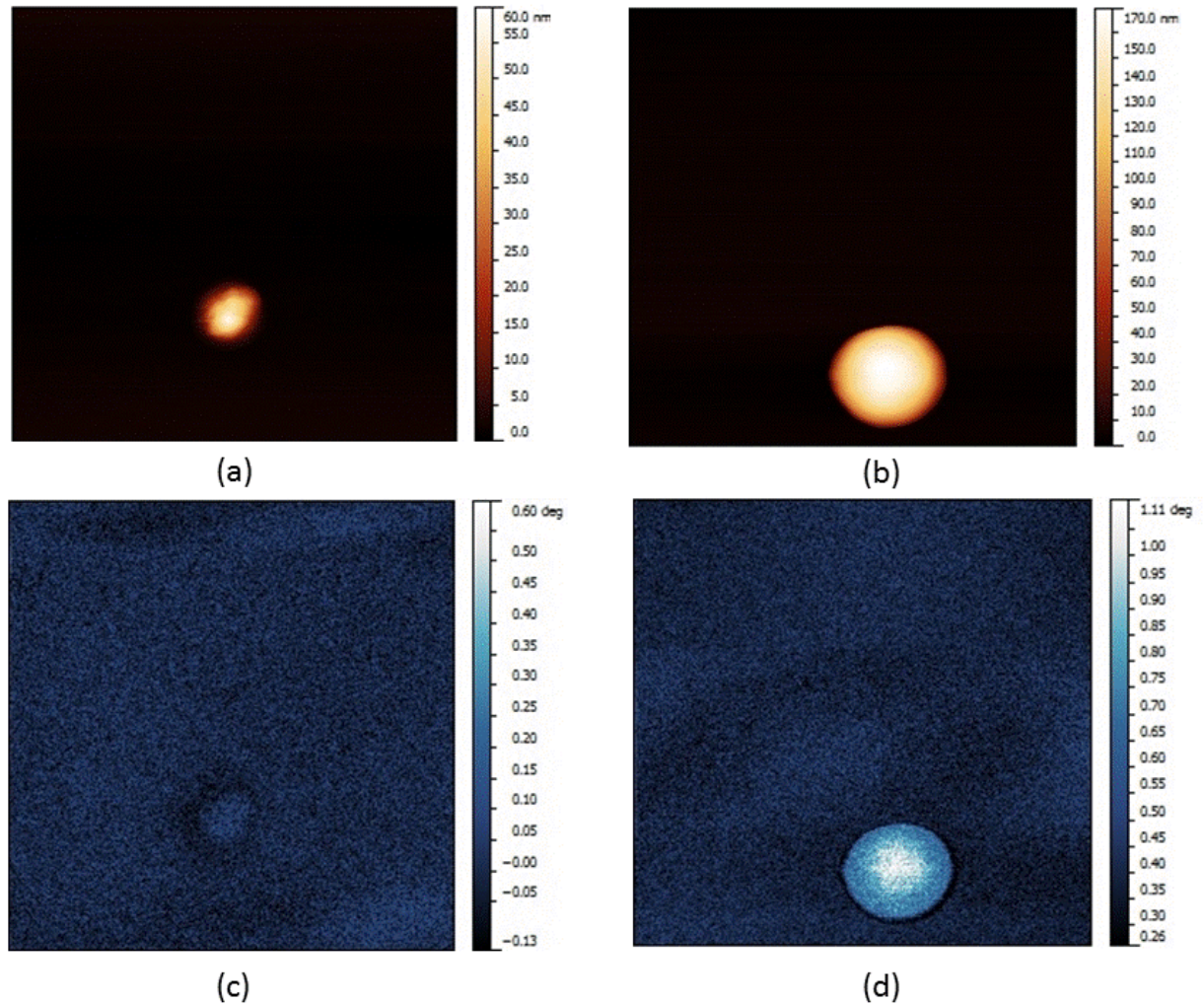
Os resultados obtidos por AFM (FIGURA 14) confirmaram a morfologia esférica das nanopartículas magnéticas recobertas com TEOS e, partículas com tamanhos aproximados entre 200 – 600 nm. Adicionalmente, esta técnica possibilitou a análise de partículas isoladas de magnetita, as quais também apresentaram formato arredondado e, com relação ao tamanho foram observadas desde partículas com cerca de 60 nm até grandes aglomerados. Foram analisadas somente as nanopartículas de Fe₃O₄ e Fe₃O₄@SiO₂, devido à falta de tempo hábil para realizar todas as análises.

Comparando-se os resultados obtidos por topografia e por MFM para mesma partícula, podemos verificar que a magnetita encontra-se no centro da partícula funcionalizada com TEOS. Isso porque, comparando as imagens (a) e (c) da Figura 14, que correspondem respectivamente à topografia e à MFM da magnetita, observamos que toda a partícula encontra-se magnética e, com a mesma intensidade de força já que a imagem magnética apresenta coloração uniforme em toda extensão da partícula.

Porém, quando comparamos as imagens (b) e (d) da Figura 14, observamos que ambas as imagens ilustraram a partícula inteira, o que não significa que a partícula seja toda magnética, uma vez que seu centro apresentou coloração mais clara na imagem magnética. Isso pode ser explicado pelo fato de que, a ponteira magnética é sensível não somente às forças magnéticas, mas também às forças elétricas. Desta forma, o centro da partícula representa a somatória da força magnética da partícula de Fe₃O₄ com as forças elétricas do material

(TEOS) que recobre a partícula magnética, por isso a coloração mais clara. Enquanto que, a superfície da partícula formada apenas pelo TEOS, apresenta coloração mais escura por ser devido apenas às forças elétricas e não à um somatório de forças elétricas com magnéticas.

Figura 14 – Imagens de AFM.



Fonte: do autor.

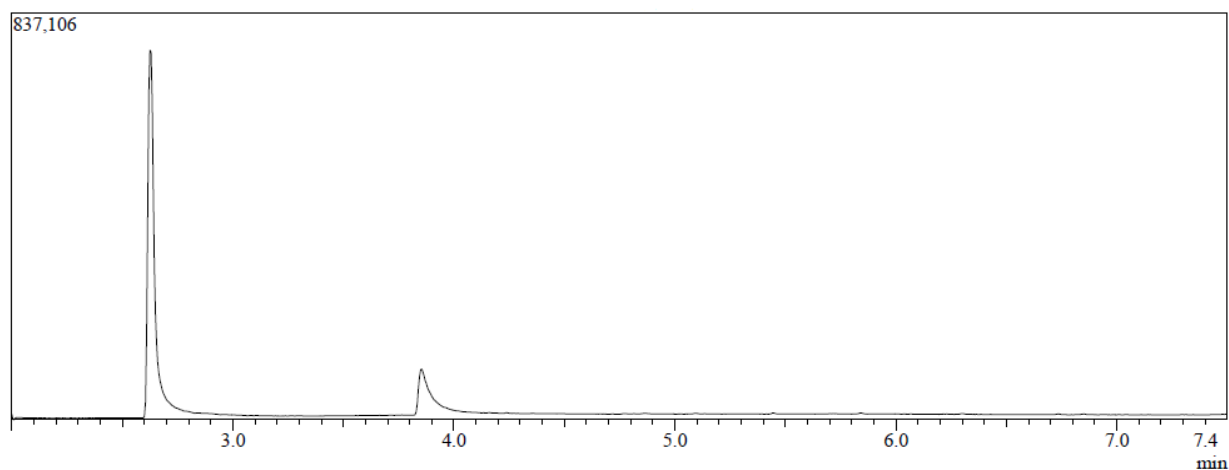
Notas: topografia de (a) Fe₃O₄, (b) Fe₃O₄@SiO₂; microscopia de força magnética (MFM) de (c) Fe₃O₄, (d) Fe₃O₄@SiO₂.

5.4 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram adaptadas da metodologia descrita por Man *et al.* (2006)⁵⁵. Assim, iniciamos os testes empregando uma rampa de temperatura de 70 à 230°C, mantendo em 230°C por 1 min, com uma taxa de aquecimento de 25°C min⁻¹. Nestas

condições obteve-se uma boa separação dos analitos de interesse, no entanto, considerando o tempo de retenção dos analitos (5 min para nicotina e 7 min para cotinina) alteramos a rampa de temperatura a fim de reduzir o tempo total da corrida. Neste sentido, iniciamos a corrida em 120°C com uma taxa de aquecimento de 40°C min⁻¹ até 280°C. Nestas condições a nicotina e a cotinina eluíram em 2,6 e 3,8 min, respectivamente, com satisfatória resolução dos picos (FIGURA 15). Vale ressaltar que a temperatura final da corrida foi aumentada com o objetivo de limpar a coluna para a próxima corrida. Além disso, a fim de se aumentar a sensibilidade, alteramos o volume de injeção de 1 µL para 2 µL. Os demais parâmetros foram mantidos conforme descrito por Man *et al.* (2006)⁵⁵.

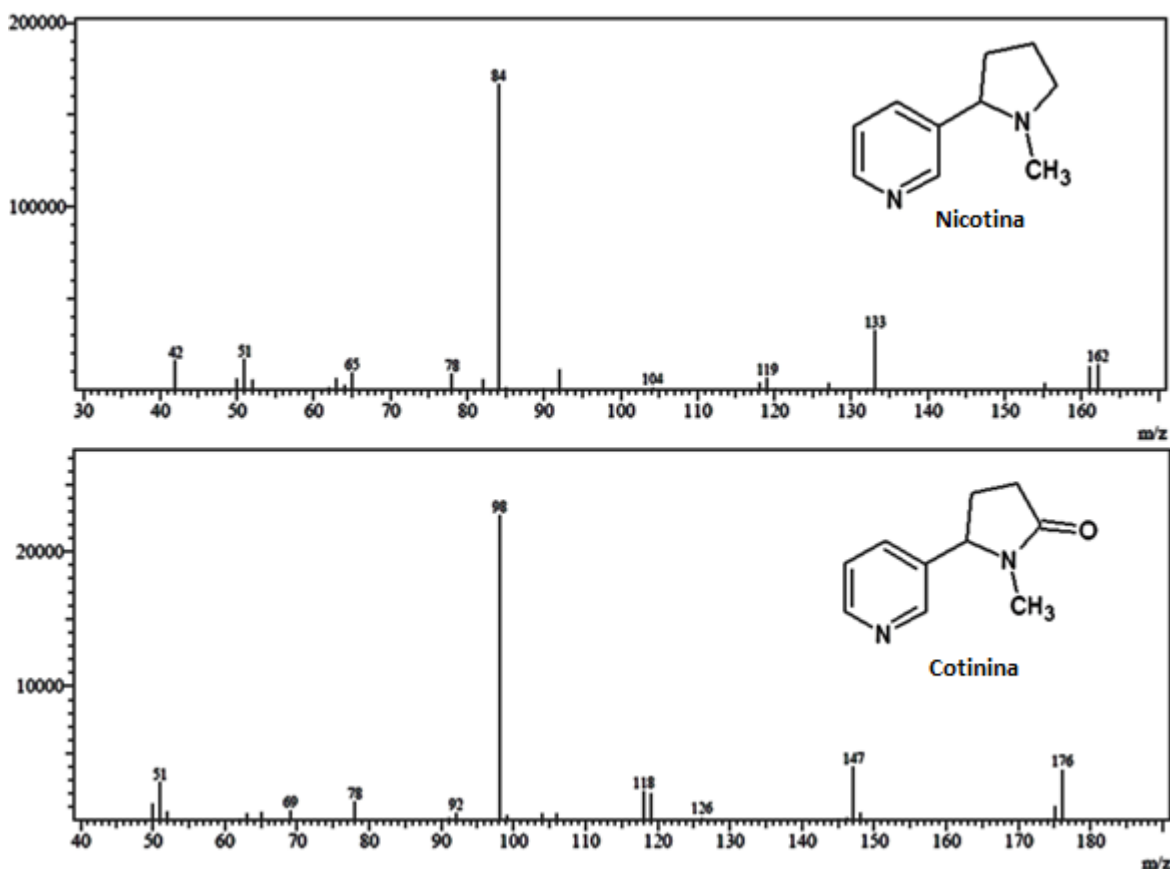
Figura 15 – Cromatograma de solução padrão de 1 mg L⁻¹ de nicotina e cotinina em metanol.



Fonte: do autor.

As corridas foram executadas no modo SIM com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a seletividade do método. As relações *m/z* monitoradas foram 84, 133 e 162 para nicotina e 98, 147 e 176 para cotinina, por apresentarem os picos mais intensos para cada analito, de acordo com seus respectivos espectros de massas (FIGURA 16). A quantificação baseou-se na integração das áreas dos picos base de cada analito, ou seja, 84 para nicotina e 98 para cotinina.

Figura 16 – Espectros de massas de solução padrão de 1 mg L⁻¹ de nicotina e cotinina em metanol.



Fonte: do autor.

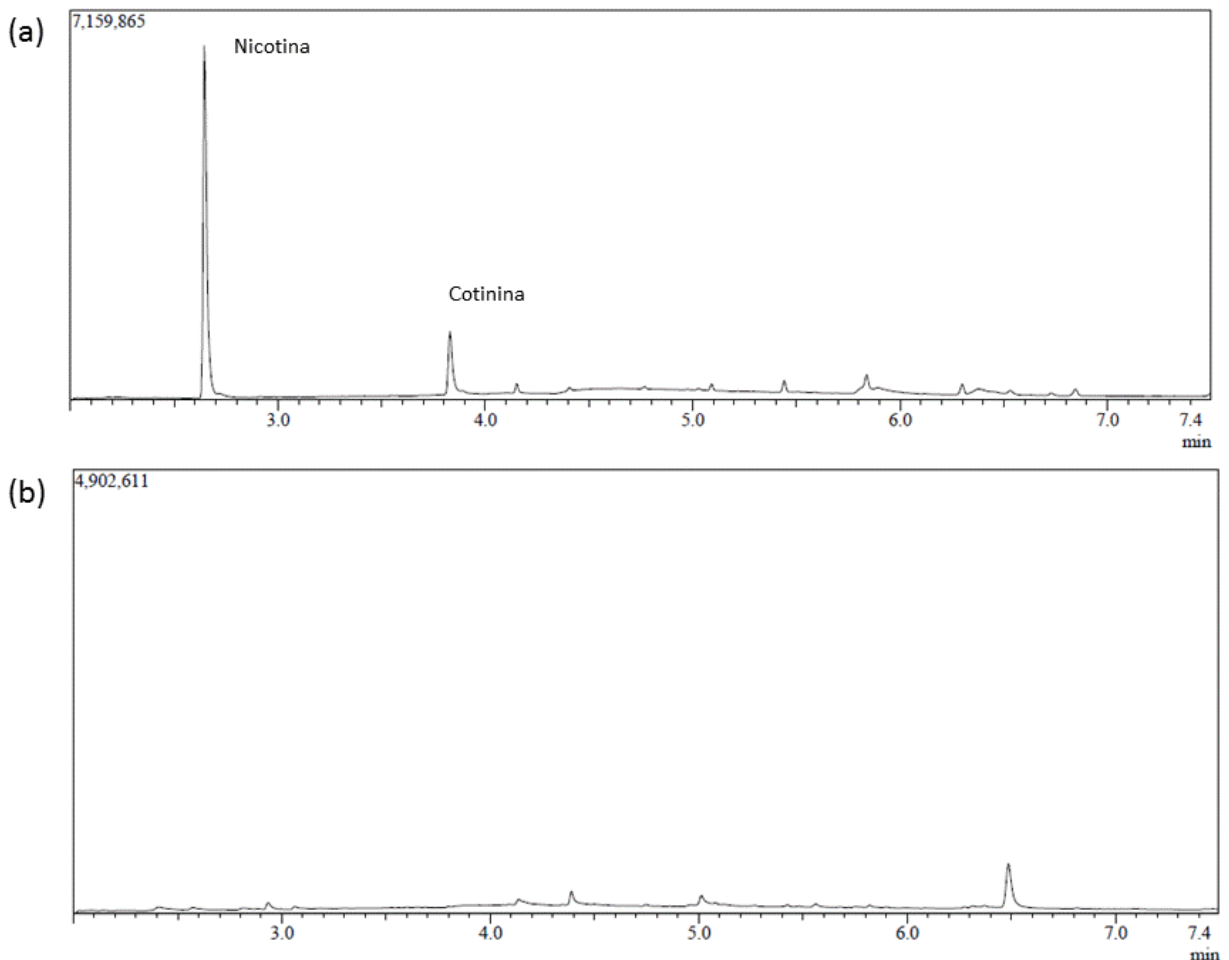
5.5 Preparo da amostra

O preparo da amostra foi realizado em apenas duas etapas, o carregamento da amostra seguido da eluição dos analitos; diferentemente da SPE convencional a qual é realizada em quatro etapas, a saber: condicionamento do sorvente, carregamento da amostra, lavagem e eluição dos analitos de interesse.

Não foi realizada a etapa de condicionamento do MMIP uma vez que esta tem como principal objetivo umedecer o sorvente na SPE convencional, a fim de evitar a formação de leitos preferenciais, o que prejudica a reprodutibilidade do método. Assim, como o MMIP é utilizado em uma extração em fase sólida dispersiva, não se justifica a realização desta etapa, reduzindo assim o número de etapas da extração e, conseqüentemente, o tempo gasto no preparo da amostra.

Uma etapa de lavagem antes da eluição dos analitos de interesse tem como objetivo remover interferentes que se ligam mais fracamente ao sorvente (MMIP). Esta etapa não foi realizada uma vez que o cromatograma de amostra de urina extraída sem a etapa de lavagem (FIGURA 17) apresentou-se limpo, com poucos interferentes. Portanto, não houve a necessidade de execução de uma etapa de lavagem, o que aumentaria o tempo gasto na extração e poderia causar alguma perda dos analitos de interesse.

Figura 17 – Cromatogramas de (a) amostra de urina fortificada com 3 mg L⁻¹ de nicotina e cotinina e (b) amostra de urina branco, extraídas com MMIP sem etapa de lavagem.



Fonte: do autor.

Desta forma o MMIP foi adicionado direto na amostra de urina, seguido da eluição dos analitos com uma mistura de metanol e HCl. O HCl foi adicionado ao solvente de eluição uma vez que a nicotina é muito volátil e se perderia durante a etapa de secagem. Assim, com a adição do HCl, a nicotina é transformada em cloridrato, que é menos volátil que a base livre.

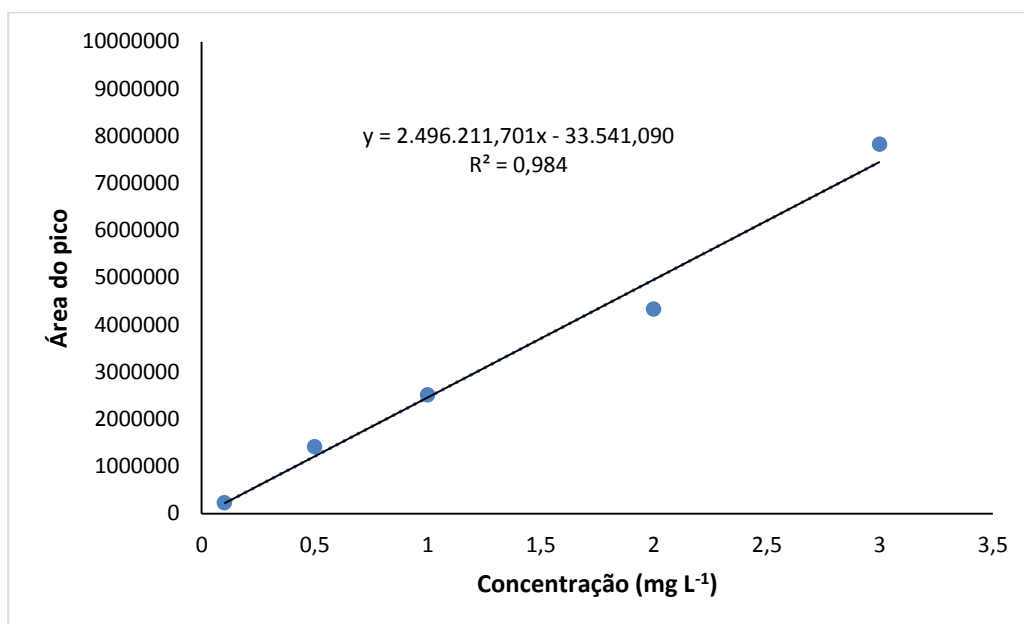
Os parâmetros de massa de sorvente, volume de amostra, volume e tipo de solvente de eluição, bem como os respectivos tempos de adsorção e dessorção dos analitos não foram

otimizados devido à falta de tempo hábil. No entanto ressalta-se que com as condições empregadas, foi possível o desenvolvimento de um método para monitorização da exposição ao tabaco.

5.6 Figuras analíticas de mérito

O método mostrou-se linear para ambos os analitos na faixa de 0,1 a 3,0 mg L⁻¹, com coeficiente de correlação $r > 0,999$ (FIGURAS 18 e 19). A recuperação foi de 20,9% para nicotina e 20,6% para cotinina, este teste foi realizado comparando-se o resultado analítico de amostra extraída, com o resultado obtido com solução padrão não extraída, que representa 100% de recuperação.

Figura 18 – Curva de linearidade da nicotina em urina, utilizando extração por MMIP.

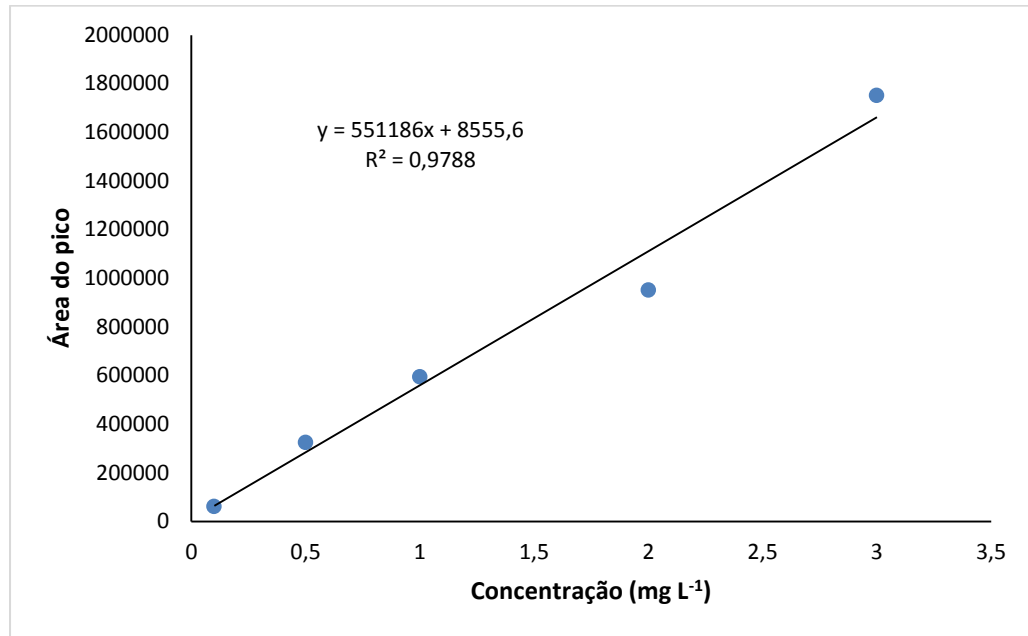


Fonte: do autor.

O limite de quantificação (LQ) obtido para ambos os analitos foi o de 0,1 mg L⁻¹. Os resultados da precisão e exatidão intra e interdias são apresentados na forma de desvio padrão relativo e erro relativo, respectivamente (Tabela 4). Como pode ser visto, a precisão intra e interdias foram menores que 20% para o LQ e menores que 15% para os demais pontos e, a exatidão intra e interdias ficou compreendida em $\pm 8,8\%$. Desta forma, os resultados obtidos

asseguram que o método proposto é suficientemente exato, preciso e seletivo para a determinação de nicotina e cotinina em amostras de urina.

Figura 19 – Curva de linearidade da cotinina em urina, utilizando extração por MMIP.



Fonte: do autor.

Tabela 4 – Precisão e exatidão para nicotina e cotinina urinária extraídas por MMIP (n=5).

		Nicotina			Cotinina		
Intradia	CN ^a	0,10	1,00	3,00	0,10	1,00	3,00
	CA ^b	0,10	1,02	3,15	0,09	1,06	3,16
	Precisão (CV ^c /%)	7,85	7,47	9,68	19,63	4,81	14,20
	Exatidão (E ^d /%)	4,09	1,90	4,93	-4,86	6,14	5,39
Interdias	CN ^a	0,10	1,00	3,00	0,10	1,00	3,00
	CA ^b	0,11	0,94	2,77	0,10	0,91	2,88
	Precisão (CV ^c /%)	12,55	10,01	13,45	8,62	14,28	8,41
	Exatidão (E ^d /%)	7,85	-6,37	-7,74	2,71	-8,88	-3,97

Notas: ^a Concentração nominal (mg L⁻¹). ^b Concentração obtida (mg L⁻¹). ^c Coeficiente de variação. ^d Erro relativo.

5.7 Aplicação em amostras reais

A metodologia foi empregada na análise de quatro amostras de urina de fumantes, sendo que cada amostra foi analisada em triplicata. Em todos os casos, foi possível detectar e quantificar os níveis de cotinina, os quais ficaram entre 0,191 e 0,276 mg L⁻¹. Já, para a nicotina, os valores obtidos foram menores que o LQ. Isto pode ser explicado pelo fato de que as amostras de urina foram colhidas na parte da manhã e a nicotina tem uma meia-vida curta de cerca de duas horas⁴⁴.

Assim, embora não tenha sido possível quantificar a nicotina nas amostras reais, o método proposto mostra-se adequado para a monitorização do uso de tabaco, uma vez que a cotinina é o principal metabolito da nicotina e é o mais utilizado como biomarcador da exposição ao tabaco por apresentar uma meia-vida longa de cerca de 20 horas e ser excretada em grande quantidade na urina. Além disso, considera-se como fumante ativo aqueles indivíduos que apresentam uma concentração de cotinina urinária a partir de 0,1 mg L⁻¹, que foi o LQ obtido neste trabalho⁴⁷. Assim, o método desenvolvido abrange as concentrações de cotinina urinária necessárias para a biomonitorização do ato de fumar.

6. CONCLUSÃO

Os materiais magnéticos obtidos (Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$ e MMIP) apresentaram boa dispersão em solventes aquosos e orgânicos, bem como rápida separação da dispersão quando submetidos ao campo magnético do imã externo, o que foi imprescindível para a correta realização de cada etapa de síntese, bem como para a aplicação final do material. Ademais, a eficiente separação dos materiais em dispersão pelo uso de um imã externo, tanto em velocidade quanto em quantidade, permitiu um maior rendimento de cada etapa de síntese. E, se tratando do polímero magnético impresso, essa característica favorece a reprodutibilidade e a sensibilidade do método, uma vez que possibilita uma perda mínima do material durante as etapas de extração com consequente perda mínima do analito adsorvido no material. Por fim, todos os resultados obtidos pelas técnicas de caracterização confirmaram a natureza das nanopartículas de Fe_3O_4 , bem como os subsequentes tratamentos com TEOS, MPS e MIP.

Os testes realizados em amostras de urina permitem concluir que o material sintetizado apresenta capacidade de extrair nicotina e cotinina a partir da urina. Ademais, os resultados obtidos nos testes de validação indicam a viabilidade de utilização da extração em fase sólida dispersiva com MMIPs como técnica de extração e concentração de nicotina e cotinina urinária, objetivando sua análise por GC-MS.

Embora não tenha sido possível quantificar a nicotina nas amostras reais de fumantes, a metodologia proposta mostra-se adequada para a monitorização do ato de fumar, uma vez que a cotinina urinária é o biomarcador de escolha para esta finalidade e o LQ obtido para ela ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) corresponde ao *cut-off* para qualificar uma pessoa como fumante. No entanto, vale ressaltar que, provavelmente a otimização de todas as condições de extração, levariam a obtenção de menores valores de LQ, tanto para nicotina quanto para cotinina, possibilitando a quantificação da nicotina nas amostras reais e, possivelmente, o emprego da metodologia para a monitorização da exposição ambiental ao tabaco (fumante passivo).

Assim, os polímeros de impressão molecular magnéticos, mostram-se como uma técnica promissora para o emprego no preparo de amostras complexas, com grande potencial de aplicações e exploração de suas propriedades.

REFERÊNCIAS

- 1- WINEFORDNER, J. D. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
- 2- VERAAT, J. R.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. Th. Coupling of biological sample handling and capillary Electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 483–514, 1999.
- 3- CHEN, Y. *et al.*. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191–219, 2008.
- 4- CHIYANG, H. E. *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.
- 5- PICHON, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 41–53, 2007.
- 6- ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 3–13, 2000.
- 7- SPIVAK, D.A. Optimization, evaluation, characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1779-1794, 2005.
- 8- CHEN, L.; LI, B. Application of magnetic molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 4, p. 2613–2621, 2012.
- 9- BENITO-PENA, E. *et al.*. Water-compatible molecularly imprinted polymer for the selective recognition of fluoroquinolone antibiotics in biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 235–245, 2009.
- 10- FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 361- 375, 2008.
- 11- POLYAKOV, M. W. Adsorption properties and structure of silica gel. **Russian Journal of Physical Chemistry**, v. 2, p. 799-804, 1931
- 12- DICKEY, F. H. The preparation of specific adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 35, p. 227-229, 1949.
- 13- WULF, G.; SARHAN, A. Use of polymers with enzyme analogous structures for the resolution of racemates. **Angewandte Chemie**, v. 11, p. 341-344, 1972.
- 14- MAHONY, J. O. *et al.*. Molecularly imprinted polymers- potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, p. 31-39, 2005.

- 15- TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros Biominéticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em Técnicas de Extração e Separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.
- 16- CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 173-182, 2004.
- 17- SHIL, X. *et al.*. Development and characterisation of molecularly imprinted polymers based on methacrylic acid for selective recognition of drug. **Biomaterials**, v. 28, p. 3741–3749, 2007.
- 18- 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, 2006.
- 19- WHITCOMBE, M. J.; VULSON, E. N. Imprinted Polymers. **Advanced Materials**, v. 13, p. 467-478, 2001.
- 20- _____. Covalent imprinting using sacrificial spacers. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 203-212, 2000.
- 21- AL-KINDY, S. *et al.*. Molecularly Imprinted Polymers and Optical Sensing Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 291-309, 2000.
- 22- TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32-40, 2007.
- 23- QIAO, F. *et al.*. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. **Chromatographia**, v. 64, p. 625-634, 2006.
- 24- LAI, J. P. *et al.*. Chromatographic characterization of molecularly imprinted microspheres for the separation and determination of trimethoprim in aqueous buffers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, p. 391-396, 2002.
- 25- PUOCI, F. *et al.*. Spherical Molecularly Imprinted Polymers (SMIPs) via a Novel Precipitation Polymerization in the Controlled Delivery of Sulfasalazine. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 22-26, 2004.
- 26- WOLMAN, F. J. *et al.* Peptide imprinted polymer synthesized by radiation-induced graft polymerization. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, p. 1199-1205, 2006.
- 27- FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 102-107, 2009.
- 28- YIN, J. F. *et al.*. Molecularly imprinted solid-phase extraction for rapid screening of mycophenolic acid in human plasma. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 142, p. 142-147, 2006.

- 29- LU, Y. *et al.*. Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol–Gel Approach. **Nano Letters**, v. 2, p. 183-186, 2002.
- 30- LU, F. *et al.*. Flow injection chemiluminescence sensor based on core–shell magnetic molecularly imprinted nanoparticles for determination of sulfadiazine **Analytica Chimica Acta**, v. 718, p. 84–91, 2012.
- 31- GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J.; KOHLER, J. Effect of column degradation on the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of peptides and proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 384, p. 81–90, 1987.
- 32- ZHANG, Y. *et al.*. Microwave Heating in Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Beads for Trace Triazines Analysis in Complicated Samples. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 967–976, 2009.
- 33- CHEN, L. *et al.*. Determination of fluoroquinolone antibiotics in environmental water samples based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 31–38, 2010.
- 34- ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Wiley, Huddersfield, 2003.
- 35- LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.
- 36- SKOOG, A.D; HOLLER, J.F; NIEMAN, A.T. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- 37- SILVERSTEIN, M.R; WEBSTER, F.X; KIEMLE, J.D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. São Paulo: LTC, 2006.
- 38- KITSON, F. G; LARSEN, B. S; MCEWEN, C. N. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Practical Guide**. Academic: London, 1996.
- 39- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- 40- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on the global tobacco epidemic, 2013: enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship**. Geneva: WHO, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/global_report/2013/en/>. Acesso em: 8 jan. 2015.
- 41- US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **The health consequences of smoking: 50 Years of Progress**. A report of the Surgeon General. Atlanta, GA.: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2014. Disponível em: <<http://ash.org/wp-content/uploads/2014/01/full-report.pdf>> . Acesso em: 8 jan. 2015.

- 42- MALAFATTI, L. MARTINS, I. Aspectos analíticos da determinação de cotinina em matrizes biológicas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, V. 22, p. 9-20, 2009.
- 43- KATAOKA, H. *et al.*. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 108–114, 2009.
- 44- OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Ateneu, v. 275, 2008.
- 45- DAJAS-BAILADOR, F.; WONNACOTT, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 317–324, 2004.
- 46- MELLO, P. R. B.; PINTO, G. R.; BOTELHO, C. Influência do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação. **Jornal de Pediatria**, v. 77, p. 257-264, 2001.
- 47- TAPANI, T. TOM, J. KARI, R. Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine and caffeine in urine passive of smokers by HPLC- Tandem Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 45, p. 2164 – 2172, 1999.
- 48- BRAMER, S. L. KALLUNGAL, B. A. Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. **Biomarkers**, v. 8, p. 187 – 203, 2003.
- 49- SHIN, H-S. *et al.*. Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 769, p. 177–183, 2002.
- 50- DIMICH, W.H. *et al.*. Analysis of nicotine and cotinine in the hair of hospitality workers exposed to environmental tobacco smoke. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 39, p. 946–948, 1997.
- 51- PATEL, J. B. *et al.*. Utility of Urinary Biomarkers in Oral Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 8, p. 229–235, 2007.
- 52- MACHACEK, D. JIANG, N. Quantification of cotinine in plasma and saliva by Liquid Chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 979–982, 1986.
- 53- CHIU, H.T. WU, H.D.I. KUO, H.W. The relationship between self-reported tobacco exposure and cotinine in urine and blood for pregnant women. **Science of the Total Environment**, v. 406, p.331-336, 2008.
- 54- JARVIS, M. J.*et al.*. Comparison of tests used to distinguish smokers from nonsmokers. **American Journal of Public Health**, v. 77, p. 1435-1483, 1987.
- 55- MAN, C.N. *et al.*. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 322-327, 2006.

- 56- BOURI, M. *et al.*. Selective extraction and determination of catecholamines in urine samples by using a dopamine magnetic molecularly imprinted polymer and capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 99, p. 897–903, 2012.
- 57- LAURENT, S. *et al.*. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2064–2110, 2008.
- 58- CHEN, F.; XIE, X.; SHI, Y. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for selective recognition of resveratrol in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 112-118, 2013.
- 59- ZENG, H. *et al.*. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for separating rutin from Chinese medicinal plants. **Analyst**, v. 137, p. 2503-2512, 2012.
- 60- KONG, X. *et al.*. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymers (Fe₃O₄@MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. **Journal of chromatography A**, v. 1245, p. 8-16, 2012.
- 61- ANVISA, Ministério da Saúde, Brasil. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.