SÍNTESE DE FASE SÓLIDA MAGNÉTICA A BASE DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS E ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE TRAMADOL EM PLASMA HUMANO POR ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA

Daiane Dulcileia Moraes de Paula

São João del-Rei

Daiane Dulcileia Moraes de Paula

SÍNTESE DE FASE SÓLIDA MAGNÉTICA A BASE DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS E ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE TRAMADOL EM PLASMA HUMANO POR ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química**, da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química.**

Área de Concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Keyller Bastos Borges

São João del-Rei – MG

Dezembro de 2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P324s

Paula, Daiane Dulcileia Moraes.
Síntese de fase sólida magnética a base de polímeros molecularmente impressos e análise enantiosseletiva de tramadol em plasma humano por eletroforese capilar com detecção no ultravioleta / Daiane Dulcileia Moraes Paula ; orientador Keyller Bastos Borges. -- São João del-Rei, 2022.
91 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2022.

1. Eletroforese capilar. 2. Tramadol. 3. Extração em fase sólida magnética. 4. Polímeros molecularmente impressos. 5. Material de acesso restrito. I. Borges, Keyller Bastos, orient. II. Título.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA

HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 12 / 2022 - PPGMQ (13.31)

Nº do Protocolo: 23122.051854/2022-97

São João del-Rei-MG, 20 de dezembro de 2022.

A dissertação **"Síntese de fase sólida magnética a base de polímeros molecularmente impressos e análise enantiosseletiva de tramadol em plasma humano por eletroforese capilar com detecção no ultravioleta",** elaborada por **Daiane Dulcileia Moraes de Paula** e aprovada por todos os membros da banca examinadora, foi aceita pelo Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito parcial à obtenção do título de

MESTRE EM QUÍMICA

(Assinado digitalmente em 22/12/2022 09:56)
KEYLLER BASTOS BORGES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCNAT (12.12)
Matrícula: 1872495

(Assinado digitalmente em 29/12/2022 10:00)
PATRICIA BENEDINI MARTELLI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
COQUI (12.71)
Matrícula: 1348442

(Assinado digitalmente em 20/12/2022 20:39)
MARCONE AUGUSTO LEAL DE OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 720.278.276-68

(Assinado digitalmente em 22/12/2022 18:40)
DAIANE DULCILEIA MORAES DE PAULA
DISCENTE
Matrícula: 2019100102

Para verificar a autenticidade deste documento entre em **https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **12**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **20/12/2022** e o código de verificação: **057c7fa75e**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente com a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por ser meu amparo em meio a tantos momentos de incerteza e ansiedade, Nossa Senhora da Divina Providência por sempre passar na frente de todas as minhas necessidades. Obrigada por me permitir chegar até aqui! Tudo posso naquele que me fortalece (Filipenses 4:13).

Agradeço aos meus pais Valdete e Adeli por acreditarem em mim e serem meus primeiros incentivadores nos estudos e por estarem sempre comigo me dando suporte emocional e financeiro.

Agradeço ao Jailson por não me deixar desistir, sempre com palavras, orações e ações para eu persistir em meio às dificuldades. “Vai com medo mesmo”!

Agradeço aos meus familiares e amigos pelas orações e palavras de incentivo.

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida! Obrigada pela paciência, partilha de conhecimento e pelos ensinamentos.

Agradeço ao orientador Keyller pela oportunidade e por todos os ensinamentos transmitidos.

Agradeço a todos os amigos do laboratório LASEP, os que ainda estão presentes e também os que passaram e encerram sua jornada. Aos amigos: Laíse, Camilla, Daniel, Anny, Willian pela troca de conhecimentos, ajudas e companhia o meu muito obrigada. Especialmente, ao amigo Ricky pelas contribuições, principalmente sua dedicação nas etapas finais, muito obrigada, aprendi muito com você! Sem a ajuda de vocês eu não teria chegado até aqui! Desejo a todos muita felicidade, vida profissional e pessoal repleta de muitas realizações e sucesso!

Ao laboratório Santa Casa por fornecer amostras biológicas, em especial a Iara por ter facilitado a parceria.

Agradeço aos amigos de graduação Annelise e Gabriel pela parceria e paciência, a Franciele pela companhia, animação e gordices no período que dividimos casa. A amizade de vocês é para vida toda!

Agradeço a Ana Elisa, Mayra e José Agenor pelos inúmeros frascos de água do Milli -Q.

Agradeço ao professor Marcone Oliveira e Olívia pela parceria para realizar as análises da aplicação no equipamento de eletroforese capilar na UFJF.

Gratidão ao professor Marcelo Valle na aceitação como estagiária e boa convivência que tivemos.

Gostaria de agradecer as parcerias pela realização da caracterização dos materiais sintetizados nesse estudo: ao LabPetro - UFES pela a realização das análises de espectroscopia FTIR, ao LUCCAR - UFES pela realização do MET, ao técnico Lázaro UFSJ pela realização do MEV/EDS, ao Giordane UFSJ pela realização do TGA e DRX.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química e a UFSJ pela oportunidade, apoio financeiro e espaço concedido.

Obrigada a todos os funcionários pelos serviços prestados.

Por fim, a todos, o meu muito obrigada!

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”

Isaac Newton

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Tramadol (TRM) 2

1.2. Preparo de amostras 4

1.3. Polímero Molecularmente Impresso 6

1.4. Materiais de acesso restrito (RAM) 8

1.5. Eletroforese capilar 10

2. OBJETIVOS 17

2.1. Objetivo Geral 17

2.2. Objetivos Específicos 17

3. EXPERIMENTAL 18

3.1. Reagentes e solução padrão 18

3.2. Instrumentação e condições da eletroforese capilar 19

3.3. Procedimentos de síntese 20

3.3.1. Síntese das nanopartículas magnéticas 20

3.3.2. Funcionalização das nanopartículas magnéticas 20

3.3.3. Síntese do MMIP e MNIP 20

3.3.4. Revestimento com monômero hidrofílico 21

3.3.5. Revestimento com BSA 21

3.4. Caracterização dos materiais adsorventes 22

3.4.1. Termogravimetria (TGA) 22

3.4.2. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 23

3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplado com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) 23

3.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 23

3.4.5. Difração de raio- X (DRX) 23

3.4.6. Teste de molhabilidade 24

3.4.7. Ponto de Carga Zero (PCZ) 24
3.5. Efeito de impressão do MMIP 25
3.6. Preparo das amostras empregando MSPE 26
3.6.1. Decantação das proteínas do plasma 26
3.6.2. MSPE 27
3.7. Parâmetros para validação do método analítico 27
3.7.1. Seletividade 27
3.7.2. Linearidade 28
3.7.3. Precisão 28
3.7.4. Exatidão 28
3.7.5. LOD e LOQ 29
3.7.6. Estabilidade 29
4. RESULTADO E DISCUSSÕES 31
4.1. Otimização do método analítico 31
4.2. Caracterização do material 32
4.2.1. TGA 32
4.2.2. FTIR 34
4.2.3. MEV/EDS 36
4.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão 38
4.2.5. *DRX* 40
4.2.6. Teste de molhabilidade 42
4.2.7. Ponto de carga zero 43
4.2.8. Exclusão de proteínas 44
4.3. Otimização do preparo de amostras 44
4.3.1. Efeito do volume da amostra 44
4.3.2. Efeito do pH 46
4.3.3. Tipo de eluente 47

4.3.4. Volume do eluente 48
4.3.5. Quantidade de material adsorvente 48
4.3.6. Solvente de lavagem 49
4.3.7. Tempo de agitação 49
4.3.8. Reutilização 49
4.3.9. Comparação com outros materiais 50
4.3.10. Efeito de Impressão Molecular 52
4.4. Validação do método analítico 55
4.4.1. Seletividade 55
4.4.2. Linearidade 56
4.4.3. Precisão e Exatidão 57
4.4.4. LOD e LOQ 58
4.4.5. Estabilidade 59
5. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS 60
6. COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DA LITERATURA 62
7. CONCLUSÕES 66
8. REFERÊNCIAS 67

RESUMO

PAULA, D. D. M. Síntese de fase sólida magnética a base de polímeros molecularmente impressos e análise enantiosseletiva de tramadol em plasma humano por eletroforese capilar com detecção no ultravioleta. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Departamento de Ciências Naturais (DCNat), São João del-Rei, 2022.

Tramadol (TRM), um analgésico opioide que é comercializado como mistura racêmica de dois enantiômeros (1*R*, 2*R*) e (1*S*, 2*S*), é utilizado para tratar dores agudas e crônicas de grau moderado a severo e vem sendo monitorado pela Agência Mundial Antidoping. Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico enantiosseletivo por eletroforese capilar empregando beta-ciclodextrina sulfatada. Além disso, foi realizada a síntese de um polímero molecularmente impresso magnético de acesso restrito duplamente revestido com monômero hidrofílico e albumina sérica bovina, o qual foi caracterizado por FTIR, MEV/EDS, MET, TGA, DRX, PCZ e teste de molhabilidade apresentando resultados coerentes e indicativos que o duplo revestimento foi bem realizado. Este adsorvente foi empregado de maneira eficaz na extração em fase sólida magnética, e várias variáveis foram otimizados, tais como: pH da amostra, volume de amostra, solvente de eluição, volume do solvente de eluição, tempo de agitação, solvente de lavagem, quantidade de material e reuso, obtendo recuperações reprodutíveis e próximas a 100%. O método analítico foi validado de acordo com a resolução 27/2012 da ANVISA obtendo uma linearidade no intervalo de 100-3000 ng mL^{-1}, além de ser seletivo, preciso e exato, apresentou LOQ de 100 ng mL^{-1} para ambos os enantiômeros, o que possibilitou sua determinação em amostras reais de plasma humano, sendo uma alternativa importante no monitoramento de atletas e área forense.

Palavras-chave: eletroforese capilar, tramadol, extração em fase sólida magnética, polímeros molecularmente impressos, material de acesso restrito.

ABSTRACT

PAULA, D. D. M. Magnetic solid phase synthesis based on molecularly imprinted polymers and enantioselective analysis of tramadol in human plasma by capillary electrophoresis with ultraviolet detection. Dissertation (Master's degree in Chemistry), Federal University of São João del-Rei (UFSJ), Department of Natural Sciences (DCNat), São João del-Rei, 2022.

Tramadol (TRM), an opioid analgesic that is market as a racemic mixture of two enantiomers (1R, 2R) and (1S, 2S), is used to treat moderate to severe acute and chronic pain and is being monitored by the World Anti-Doping Agency. In this work, an enantioselective analytical method was developed by capillary electrophoresis using sulfated beta-cyclodextrin. In addition, a molecularly imprinted magnetic restricted-access polymer double coated with hydrophilic monomer and bovine serum albumin have been synthtized which was properly characterized by FTIR, SEM/EDS, MET, TGA, DRX, PCZ and wettability test presenting consistent and indicative results that the double coating was well performed. This adsorbent was effectively used in magnetic solid phase extraction, and several variables were optimized, such as: sample pH, sample volume, elution solvent, elution solvent volume, stirring time, washing solvent, amount of material and reuse, obtaining reproducible recoveries close to 100%. The analytical method was validated according to ANVISA resolution 27/2012, obtaining linearity in the range of 100-3000 ng mL^{-1}, in addition to being selective, precise and exact, it presented LOQ of 100 ng mL^{-1} for both enantiomers, which allowed its determination in real samples of human plasma, being an important alternative in the monitoring of athletes and forensic area.

Keywords: capillary electrophoresis, tramadol, magnetic solid phase extraction, molecularly imprinted polymers, restricted access material.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BGE Eletrólito de fundo (do inglês - *background electrolyte*)

BSA Albumina Sérica Bovina (do inglês - *Bovine Serum Albumin*)

CE Eletroforese Capilar (do inglês - *Capillary Electrophoresis*)

CD Ciclodextrina

CZE Eletroforese Capilar em Zona (do inglês - *capillary zone electrophoresis*)

DAD Detector de Arranjo de Diodos

DRX Difração de Raios-X

EDS Espectrômetro por dispersão de energia (do inglês, *Energy dispersive x- ray spectroscopy*)

FTIR Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês - *Fourier Transformed Infrared*)

HM Monômero Hidrofílico (do inglês - *Hydrophilic Monomer*)

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês - *high performance Liquid Chromatography*)

K Coeficiente de seletividade

K_d Coeficiente de distribuição

LOD Limite de detecção (do inglês - *limit of detection*)

LOQ Limite de quantificação (do inglês - *limit of quantification*)

MET Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês - *transmission electron microscopy*)

MEV Microscopia eletrônica de varredura (do inglês - *scanning electron microscopy*)

MIP Polímero Molecularmente Impresso (do inglês - *Molecularly Printed Polymer*)

MNPs Nanopartículas magnéticas (do inglês – *magnetic nanoparticles*)

MMIP Polímero Molecularmente Impresso Magnético (do inglês *magnetic molecularly imprinted polymers*)

MSPE Extração em Fase Sólida Magnética (do inglês - *Magnetic Solid Phase Extraction*)

MNIP Polímero magnético Não Impresso (do inglês - *non-imprinted polymer*)

PCZ Ponto de Carga Zero

pH Potencial hidrogeniônico

pka Constante de dissociação ácida

®	Marca Registrada
Θ	Ângulo
r	Coeficiente de correlação
RA	Acesso restrito (do inglês - *Restricted Access*)
RAC	Ractopamina
RAM	Material de Acesso Restrito (do inglês - *Restricted Access Material*)
RAM-BSA	Material de acesso restrito – Albumina sérica bovina (do inglês – *Restricted access media – bovine serum albumin*)
RE	Erro relativo (do inglês - *relative error*)
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês - *relative standard deviation*)
SPE	Extração de Fase Sólida (do inglês - *Solid Phase Extraction*)
TEOS	Tetraetil Ortosilicato
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês - *thermogravimetric analysis*)
TRM-	Tramadol
UV-Vis	Ultravioleta – visível
WADA-	Agência Mundial Antidoping (WADA, do inglês *World Anti-Doping Agency)*

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas dos Estereoisômeros do TRM. **Fonte:** próprio autor.....2

Figura 2. Representação esquemática preparo de amostra por SPE. **Fonte:** próprio autor.....5

Figura 3. Representação esquemática preparo de amostra por MSPE. **Fonte:** próprio autor.....6

Figura 4. Representação esquemática da síntese do MIP. **Fonte:** próprio autor.....7

Figura 5. BSA intercruzada com borohidreto de sódio. **Fonte:** próprio autor.....10

Figura 6. Redução de iminas a aminas pela ação do borohidreto de sódio. **Fonte:** próprio autor.....10

Figura 7. Separação esquemática por CZE. **Fonte:** Próprio autor.....11

Figura 8. Formação da camada fixa a partir da adsorção das cargas positivas do BGE na parede do capilar e da camada móvel possuindo concentração de cátions maior que ânions e ao movimentar em direção ao detector dá origem ao fluxo eletrosmótico. **Fonte**: próprio autor.....12

Figura 9. Configuração básica do equipamento de CE. **Fonte:** Próprio autor.....13

Figura 10. Representação esquemática da eletrocromatografia. **Fonte:** Próprio autor.....15

Figura 11. Estruturas das (A) α-, (B) β-, e (C) γ-CD. **Fonte:** Próprio autor.....16

Figura 12: Esquema de síntese para RA-MMIP-HM-BSA. **Fonte:** Próprio autor.....22

Figura 13. Representação da interação da gota com uma superfície do material hidrofóbico originando o θ maior que 90°. **Fonte:** Próprio autor.....24

Figura 14. **(A)** Eletroferogramas para a determinação não enantiosseletiva de TRM utilizando as seguintes condições eletroforéticas: TRM a 50 μg mL^{-1}, BGE fosfato 25 mM pH 9,30, injeção hidrodinâmica de 30mbar durante 4 s, voltagem de 15 Kv, temperatura de 25 °C e **(B)** Determinação enantiosseletiva de TRM utilizando as seguintes condições eletroforéticas: TRM a 50 μg mL^{-1}, BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de 40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm . **Fonte:** Próprio autor. 32

Figura 15. Curvas termogravimétricas das diferentes etapas de síntese do RA-MMIP-HM-BSA e RA-MNIP-HM-BSA. **Fonte**: próprio autor.....33

Figura 16-A-B. FTIR dos materiais sintetizados. **Fonte:** próprio autor.....35
Figura 17 Imagens de MEV de **(A)** Fe_2O_3 100 ×; **(B)** Fe_2O_3 2000×; **(C)** Fe_2O_3@SiO_2 100×; **(D)** Fe_2O_3@SiO_2 2000×; **(E)** MMIP 100×; **(F)** MMIP 2000×; **(G)** MNIP 100×; **(H)** MNIP 2000×; **(I)** RA-MMIP-HM 100×; **(J)** RA-MMIP-HM 2000×; (K) RA-MNIP-HM 100×; **(L)** RA-MNIP-HM 2000×; **(M)** RA-MMIP-HM-BSA 100×; (N) RA-MMIP-HM-BSA 2000×(O) RA-MNIP-HM-BSA 100×; (P) RA-MNIP-HM-BSA 2000×. **Fonte:** próprio autor.....37
Figura 18 Imagens de MET: Fe_3O_4 **(A)** 200 nm; **(B)** 100 nm; Fe_3O_4@SiO_2 **(C)** 200 nm; **(D)** 100 nm; MMIP **(E)** 0,5 µm; **(F)** 100 nm; MNIP **(G)** 500 nm; **(H)** 200 nm; RA-MMIP-HM **(I)** 0,50 µm; **(J)** 200 nm; RA-MNIP-HM **(K)** 0,50 µm; **(L)** 100 nm; RA-MMIP-HM-BSA **(M)** 0,5 µm; **(N)** 200 nm; RA-MNIP-HM-BSA **(O)** 0,5 µm; **(P)** 200 nm. **Fonte**: próprio autor.....39
Figura 19. Resultados de DRX das diferentes etapas de síntese do RA-MMMIP-HM-BSA: **(A)** Fe_3O_4 e Fe_3O_4@SiO_2; **(B)** MMIP, RA-MMIP-HM e RA-MMIP-HM-BSA; **(C)** MNIP, RA-MNIP-HM e RA-MNIP-HM-BSA; **(D)** Representação das propriedades magnéticas RA-MMMIP-HM-BSA. **Fonte**: próprio autor.....41
Figura 20. Molhabilidade dos materiais **A)** Fe_3O_4; **B)** Fe_3O_4@SiO_2; **C)** MMIP; **D)** RA-MMIP-HM; **E)** RA-MMIP-HM-BSA; **F)** MNIP; **G)** RA-MNIP-HM; H) RA-MNIP-HM-BSA. **Fonte**: próprio autor.....42
Figura 21. Avaliação do pH_{PCZ} para MMIP-HM-BSA e MNIP-HM-BSA. **Fonte**: próprio autor.....43
Figura 22. Teste de exclusão de proteínas. **Fonte:** próprio autor.....44
Figura 23. (A) Influência do volume de amostra; **(B)** Influência do pH; **(C)** Influência do tipo de eluente; **(D)** Influência do volume do eluente; **(E)** Influência da quantidade de adsorvente; **(F)** Influência do solvente de lavagem; e **(G)** Influência do tempo de agitação na recuperação de TRM em amostras de plasma; **(H)** Recuperação de TRM em amostras de plasma após sucessivas utilizações do RA-MMIP-HM-BSA; **(I)** Comparação da recuperação de TRM amostras de plasma **(1)** RA-MMIP-HM-BSA, **2)** RA-MMNIP-HM-BSA e seus materiais precursores: **(3)** MMIP, **(4)** Fe_3O_4, **(5)** Fe_3O_4@SiO_2. **Fonte:** próprio autor.....46
Figura 24. Distribuição das microespécies de TRM em diferentes valores de pH. **Fonte:** próprio autor e adaptado de CHEMICALIZE.....47

Figura 25. Gráfico (Box Plot) do intervalo de confiança da média das recuperações de TRM por diferentes materiais em MSPE. Fonte: próprio autor.....51
Figura 26. Recuperação dos diferentes fármacos testados no estudo de seletividade do material adsorvente. Concentrações = 50 µg mL^{-1} (cada fármaco). **Fonte:** próprio autor.....53
Figura 27. Estrutura química dos interferentes **Fonte:** próprio autor.....54
Figura 28. Eletroferogramas de amostras de plasma branco (sem TRM) e de uma amostra fortificada com TRM nas concentrações de 100 ng mL^{-1} (LOQ) e de 50 µg mL^{-1} de TRM. Condições eletroforéticas: BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de 40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm. **Fonte:** Próprio autor.....56
Figura 29. Eletroferograma da aplicação em amostras de plasma 1h e 2h após a medicação frente ao padrão de TRM 50 µg mL^{-1}. Condições eletroforéticas: BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de 40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm. **Fonte:** Próprio autor.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição elementar dos materiais sintetizados obtidos por EDS.....38

Tabela 2. Variáveis do preparo de amostra em condições otimizadas.....50

Tabela 3. Resultados teste Post Hoc Tuckey para a recuperação de TRM por diferentes sorventes na MSPE.....52

Tabela 4. K_d e K para a molécula de TRM e para cada um dos fármacos testados.....55

Tabela 5. Linearidade para o método de TRM em plasma.....57

Tabela 6. Precisão e exatidão para o método de TRM em plasma.....58

Tabela 7. LOD e LOQ para o método de TRM em plasma.....59

Tabela 8: Estabilidade do TRM em plasma.....60

Tabela 9: Revisão bibliográfica sobre as metodologias analíticas para determinação de TRM em amostras biológicas.....61

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o uso indiscriminado de Tramadol (TRM) vem se expandindo em todo mundo (CHAUHAN et al., 2022; XU, LIU, 2019). Desde 2019, o TRM vem sendo monitorado pela Agência Mundial Antidoping (WADA, do inglês *World Anti-Doping Agency*). Devido a sua ação analgésica, pesquisas relatam que atletas, principalmente ciclistas, tem utilizado esse medicamento antes e após treinos intensos e competições para anestesiar a dor causada pelo esforço físico com o intuito de melhorar seu desempenho e obter melhores classificações (BALTAZAR-MARTINS et al., 2019).

Dessa forma, é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e reprodutíveis para determinar de forma rápida esse analito em matrizes complexas como o plasma. Dentre as técnicas de extração, a extração em fase sólida magnética (MSPE, do inglês *magnetic solid phase extraction*) possui vantagem na diminuição das etapas no processo de extração otimizando tempo. O material adsorvente utilizado é um fator muito importante, por isso os polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês *molecularly imprinted polymer*) tem grande destaque, uma vez que possuem estabilidade térmica, seletividade de ligação e versatilidade na síntese (HU et al., 2020).

A técnica instrumental também é importante para que tenha boa seletividade e detectabilidade do analito e nesse contexto a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) tem mostrado resultados satisfatórios pois é capaz de separar vários analitos além de ser compatível com os conceitos de química verde. Ela utiliza volume mínimo de amostra, tempo de análise relativamente curto, alta eficiência de separação e baixo custo instrumental (SILVA et al., 2007; ZHANG et al., 2013).

1.1. Tramadol (TRM)

TRM, *rac*-(1*R*, 2*R*)-2-(dimetilaminometil)-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol, é classificado como analgésico opioide, o qual é muito utilizado para pacientes com dor moderada a grave. Sua propriedade analgésica é cerca de um décimo da morfina (CHAUHAN et al., 2022). Sua estrutura possui dois centros quirais o que permite a formação de quatro esteroisômeros (1*R*, 2*R*), (1*S*, 2*S*), (1*R*, 2*S*) e (1*S*, 2*R*) (**Figura 1**). O fármaco é comercializado como mistura racêmica de dois enantiômeros (+)-(1*R*,2*R*)-TRM e (-)-(1*S*,2*S*)-TRM, sendo que ambos contribuem com o efeito analgésico do fármaco, porém com mecanismos diferentes, complementares e interativos farmacologicamente, o que torna interessante o seu estudo estereoquímico (DUVALL,2017; SARKANY et al., 2019).

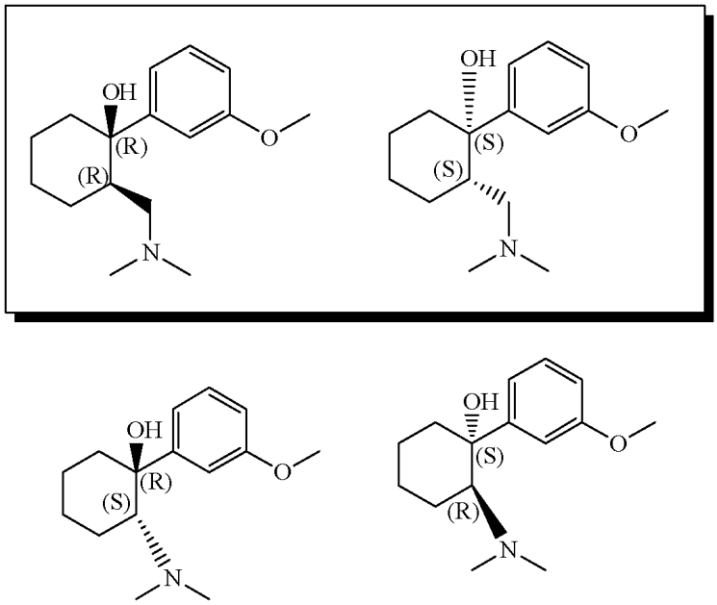


Figura 1. Estruturas dos estereoisômeros do TRM. **Fonte:** próprio autor.

TRM é um agonista puro e não seletivo nos receptores opioides μ (mu), δ (delta) e k (kappa), com afinidade consideravelmente maior pelo receptor μ. Tendo como diferença entre os perfis farmacológicos: o enantiômero (+)-(1*R*, 2*R*) é específico para receptor - μ opioide e inibe a recaptação de serotonina, enquanto que o (-)-(1*S*,2*S*) inibe a recaptação de noradrenalina ativando os receptores α_2-adrenérgicos. Estudos apontam que

após sua administração, os efeitos dos enantiômeros são somados e complementares (SHIPTON, 2000; MARCOLIN, et al., 2004, GROND, SABLOTZKI, 2004, SARKANY et al., 2019).

TRM pode ser administrado por via oral na forma de gotas, cápsulas, formulações de liberação prolongada, supositório para via retal, solução intramuscular e intravenosa ou injeção subcutânea. A dose oral recomendada é de 50–100 mg de 4 a 6 h. A analgesia começa em 1 h após administração oral e atinge o pico em 2 a 3 h. O fármaco é metabolizado no fígado, 20% ligam-se às proteínas plasmáticas, atravessa facilmente a placenta e aproximadamente 0,1% de uma dose é excretado no leite materno. O TRM e seus metabólitos são principalmente excretados pelos rins, sendo assim, mais de 90% do TRM é excretado na urina, sendo aproximadamente 10-30% na sua forma inalterada e aproximadamente 60% excretado como metabólitos, sendo o restante excretado nas fezes. Sua eliminação pela meia-vida é de aproximadamente 6 h (SARKANY et al., 2019; LEWIS, HAN, 1997). A concentração plasmática em níveis terapêuticos em humanos tem um intervalo entre 100 e 300 ng mL^{-1}. A concentração tóxica está entre 1 e 2 µg mL^{-1}. Sobredosagem com TRM pode causar distúrbios do sistema nervoso central, depressão respiratória, coma, náusea, vômitos, taquicardia, agitação e convulsões (GROND, SABLOTZKI, 2004).

Recentemente, de acordo com a União Ciclística Internacional (UCI, do inglês *Union Cycliste Internationale*), o TRM passou a fazer parte do programa de monitoramento da WADA, que é responsável pela detecção de doping em competições esportivas (BAUME et al., 2015; BALTAZAR-MARTINS et al., 2019). Tal fato se deve a ação analgésica do TRM que é capaz de anestesiar a dor causada pelo esforço físico do atleta, podendo aumentar o desempenho do mesmo. Além disso, pode apresentar efeitos colaterais podendo acarretar o aumento de acidentes durante as corridas, além da dependência gradual da substância

(HOLGADO, 2017). Por isso, de acordo com Comitê Olímpico do Brasil, com o intuito de preservar a segurança e a saúde do ciclista, desde 1 de março de 2019, esse medicamento foi proibido para uso de ciclistas que estiverem participando de competições nacionais e internacionais e desde 2012 está na lista publicada pela WADA.

1.2. Preparo de amostras

O plasma sanguíneo é um líquido tecidual de cor amarelada sendo o maior componente do sangue (55%), ou seja, é a parte líquida do sangue que possui a função de carrear substâncias e remover resíduos do corpo. É constituído principalmente por água (92%), agindo como solvente a pH 7.4, e contém substâncias de diversos pesos moleculares que perfazem 7% do seu volume. Os componentes dissolvidos são proteínas plasmáticas, nutrientes, sais, gorduras, gases respiratórios, hormônios e eletrólitos (OLIVEIRA, 2016; CHAVES, QUEIROZ, 2008). O sangue é uma matriz convencional amplamente estudada nas análises toxicológicas forenses, pois fornece de forma apropriada a correlação da concentração da droga no sangue com o estado clínico do indivíduo, além disso, o uso da razão droga original/metabólito pode ser bastante útil para predizer o período decorrido desde a administração (BORDIN, et al. 2015). Por ser uma matriz complexa, é necessário a etapa do preparo de amostra.

O preparo da amostra é uma das etapas mais importantes em uma análise química, sendo essencial para alcançar resultados exatos e confiáveis. Esse preparo tem a finalidade de retirar o máximo possível de interferentes da matriz, concentrar e extrair o analito estudado (BORGES et al., 2015). Existe uma grande necessidade de simplificar o método analítico, de forma que o mesmo seja capaz de extrair o máximo do analito, com processo simples diminuindo tempo e compatível com técnicas de separação (HU et al., 2020).

A extração em fase sólida (SPE, do *inglês solid phase extraction*) é um procedimento de preparo de amostras baseado na extração líquido-sólido, ou seja, extração utilizando materiais adsorventes. É um método capaz de realizar a remoção de interferentes e pré-concentrar analitos em determinada matriz. Os procedimentos convencionais de SPE consistem em uma sequência contínua de condicionamento, extração, lavagem e etapas de eluição conforme mostra a **Figura 2**. Esse método possui algumas vantagens como alta recuperação, a diminuição do uso de solventes orgânicos se comparada a técnicas de extração com solventes, menor tempo de preparação, operação e automação mais fáceis (AGUIAR JÚNIOR et al., 2018; WEN, 2020).

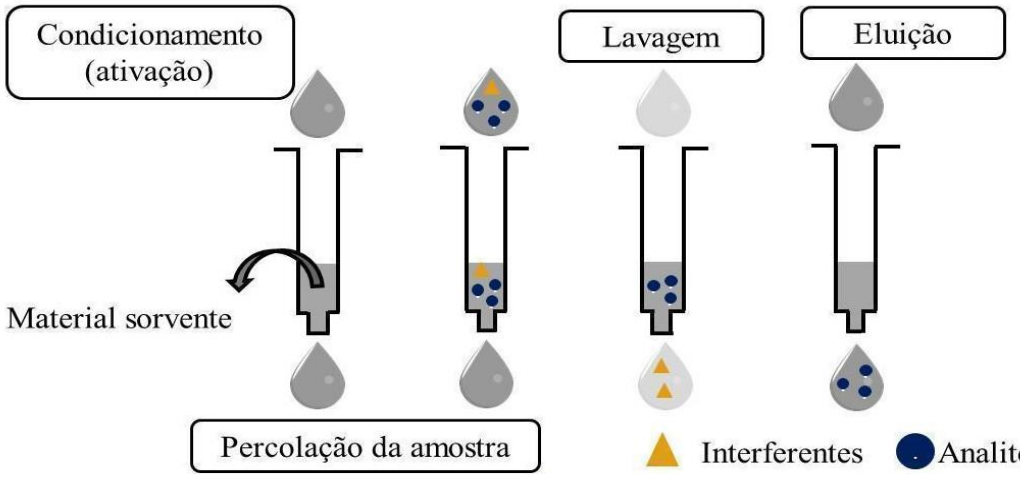


Figura 2. Representação esquemática preparo de amostra por SPE. **Fonte:** próprio autor.

Uma das variações da SPE, a extração em fase sólida dispersiva (dSPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*), permite a separação das fases simplificando o processo de extração diminuindo assim o tempo do preparo de amostra. Nesta técnica, a fase extratora é adicionada diretamente na matriz, ocorrendo a extração, diminuindo assim a fase de pré-condicionamento dos cartuchos. Logo após a extração, a separação do material extrator e matriz pode ocorrer por centrifugação, filtração ou separação magnética. Esta última vem recebendo uma atenção especial por utilizar nanopartículas magnéticas (MNPs, do inglês

Magnetic nanoparticles) como material extrator, pois são núcleos com propriedades magnéticas que são atraídas por um campo magnético externo facilitando ainda mais o processo de separação (SILVA, et al., 2016). Estas MNPs são recobertas com polímero o qual oferece a seletividade para extração do analito.

Essa extração utilizando separação magnética pode ser observada na **Figura 3**, a qual demonstra uma representação esquemática MSPE. Primeiramente ocorre a dispersão do material na matriz para extração do analito. Logo após, é feita a separação magnética da matriz com a fase extratora. Em seguida, é feita a lavagem para retirada de interferentes e por fim, os analitos são eluídos e encaminhados para análise instrumental. Em cada fase é necessário agitação mecânica, normalmente com uso de vórtex.

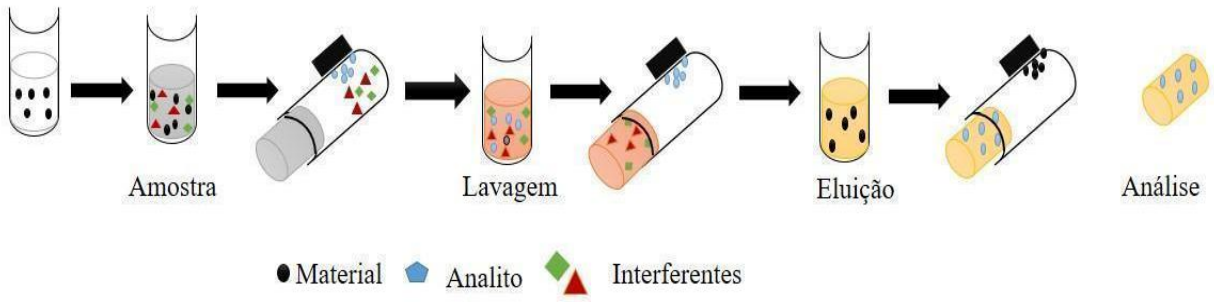


Figura 3. Representação esquemática do preparo de amostra por MSPE. **Fonte:** próprio autor.

1.3. Polímero Molecularmente Impresso

Vários materiais adsorventes são reportados na literatura, como octilsilano (C8), ocadecilsilano (C18), sílica em gel (SiOH) entre outros, no entanto eles possuem a desvantagem de baixa seletividade para diferentes analitos. Os polímeros molecularmente impressos (MIPs), são uma alternativa de materiais adsorventes, pois são seletivos com cavidades seletivas para determinada molécula o que garante maior recuperação. Além disso,

apresenta resistência à temperatura, a solventes orgânicos e a variações de pH, o que o torna adequado no preparo de amostra (TAVARES, 1996; WEN, 2020; HU, 2020).

A síntese do MIP acontece na presença da molécula molde (MM), do solvente, monômero funcional (MF), o agente de ligação cruzada (ALC) e o iniciador radicalar (IR) conforme ilustra a **Figura 4**.

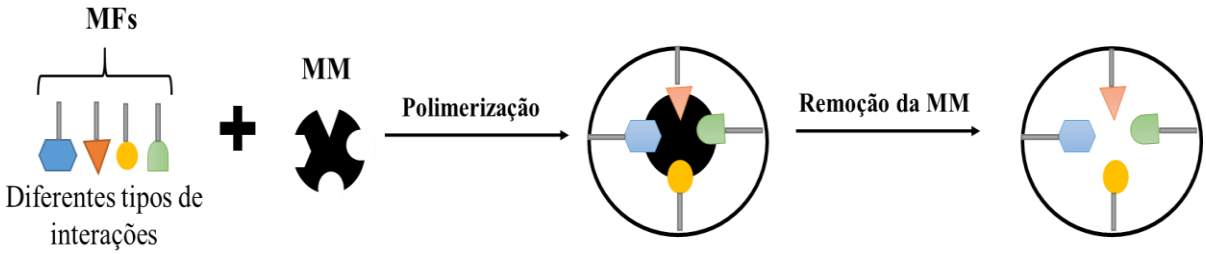


Figura 4. Representação esquemática da síntese do MIP. **Fonte:** próprio autor.

A MM proporciona as cavidades seletivas ao material, o solvente possui a função de solubilizar os reagentes da síntese sem interferir na formação do complexo MM-MF, os MFs, responsáveis pelas interações com a MM, são posicionados ao seu redor para formar os sítios seletivos e suas posições são fixadas com a copolimerização do ALC, este além da função de estabilizar os sítios de ligação na impressão, também controla a morfologia e estabilidade da matriz polimérica. Já o IR possui a função de criar radicais livres para possibilitar o início e a manutenção da reação. O polímero obtido possuirá microcavidades com estrutura tridimensional. A remoção da MM é feita por meio da lavagem com solvente adequado, a qual é monitorada com a injeção de alíquotas injetadas no CE para verificar a total retirada da MM. Assim, o polímero possuirá sítios de reconhecimento à MM de acordo com as interações MM-MF durante a polimerização. O MIP reconhece e se liga seletivamente à MM (FIGUEIREDO et al., 2008, CHEONG, YANG & ALI, 2012).

A síntese do polímero molecularmente não impresso (NIP, do inglês *molecularly non-imprinted polymer*) acontece sob as mesmas condições, porém com a ausência da MM.

Assim, o NIP possuirá a mesma estrutura química sem os sítios impressos. Ao comparar os dois materiais é possível avaliar a influência dos sítios impressos na recuperação da adsorção (SILVA, 2017).

Para síntese dos MIPs existem algumas metodologias, dentre elas a síntese de "Bulk" e a de polimerização por precipitação. A primeira é realizada em sistema homogêneo onde utiliza-se uma quantidade maior de monômero e os demais reagentes em quantidades menores. A reação é realizada em frascos tampados e com aquecimento entre 60 e 70 °C. O polímero formado deve ser moído, peneirado o que pode destruir algumas interações e logo após submetido a lavagem. Além disso, suas partículas possuem tamanhos irregulares e a produção em escala maior é dificultada. A polimerização por precipitação se diferencia do método de "Bulk" pela quantidade de volume de solvente, cinco vezes maior, agitação constante durante a síntese. Por ser uma síntese mais controlada garante um maior rendimento e partículas uniformes com maior área superficial (VASAPOLLO et al., 2011).

Uma forma de facilitar o preparo de amostra é a utilização da MSPE onde combina-se os MIPs com MNPs dando origem aos polímeros molecularmente impressos magnéticos (MMIPs, do inglês *magnetic molecularly imprinted polymers*). Nos MMIPs, primeiramente obtêm-se as partículas de ferro (Fe_3O_4). Logo após, elas são revestidas com tetraetilortosilicato (TEOS) para obtenção do suporte magnético (Fe_3O_4@SiO_2), conferindo maior estabilidade evitando a oxidação do Fe (sangria) e auxílio na interação com polímero para posteriormente realizar o revestimento. Por fim, o MIP é sintetizado sobre o suporte magnético revestido (HUANG, 2018).

1.4. Materiais de acesso restrito (RAM)

As matrizes biológicas são complexas, pois possuem muitas proteínas, sais ácidos, bases, compostos orgânicos com propriedades semelhantes às do analito que podem assim

comprometer a recuperação da extração (KATAOKA, 2003). O RAM (do inglês *restricted access material*) tem o objetivo de melhorar a extração dessas matrizes, pois tem a função de reter o analito e excluir macromoléculas. Tem sua superfície modificada, funcionando como barreira física e/ou química retendo interferentes. Assim, somente pequenas moléculas conseguem permear até as cavidades internas do material. Para esses revestimentos utilizam-se monômeros com características hidrofílicas e macromoléculas como proteínas. Destacando-se a proteína albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) que possui semelhança com a albumina de soro humano (DE FARIA, 2017), além disso, dentre às proteínas plasmáticas, a mesma destaca-se por ser a proteína mais abundante no plasma (OLIVEIRA, 2016). O encapsulamento dessa proteína se dá por meio de duas reações: A primeira pelo intercruzamento entre os grupos aminos da BSA utilizando agente de ligação gluteraldeído, e a segunda, ocorre entre os grupos aldeído livre do complexo BSA-gluteraldeído e o grupo amino de outra molécula de BSA formando uma rede polimérica de BSA em torno do material (**Figura 5**). No entanto, gera grupos iminas que são instáveis, então é necessário a utilização do borohidreto de sódio ($NaBH_4$) que é um agente redutor o qual reduz as iminas em aminas deixando assim o material mais estável como mostra a reação na **Figura 6** (BARBOSA et al., 2015; SANTOS, 2016; DE FARIA et al., 2017).

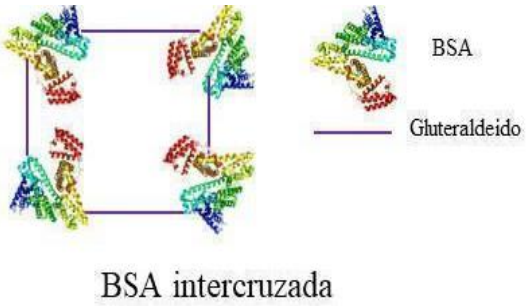


Figura 5. BSA intercruzada com borohidreto de sódio. **Fonte:** próprio autor.

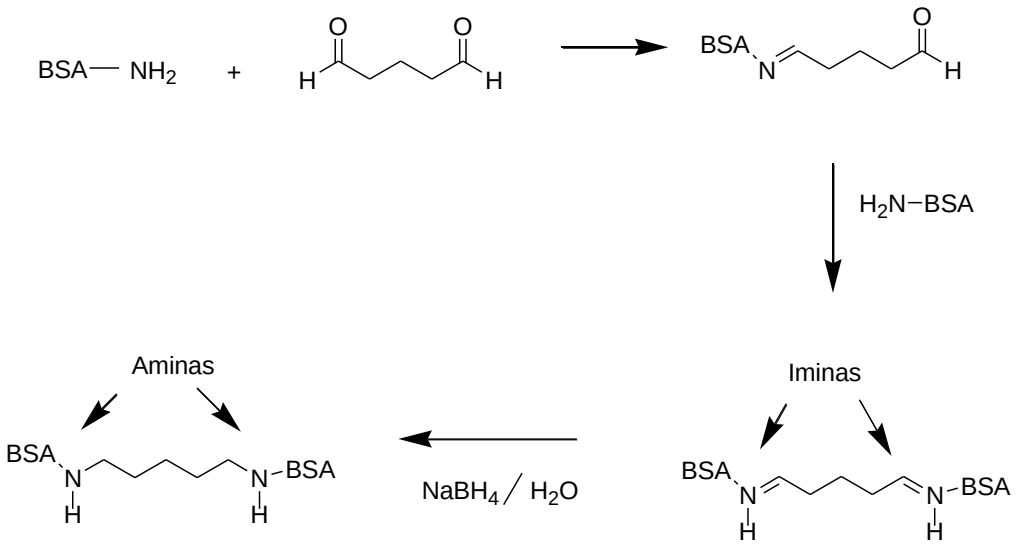


Figura 6. Redução de iminas a aminas pela ação do borohidreto de sódio. **Fonte:** próprio autor.

1.5. Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE) é um método de separação baseado na migração de espécies químicas quando uma corrente elétrica é aplicada. Ela possui grande versatilidade podendo analisar uma vasta gama de amostras, como por exemplo, ânions, aminoácidos, fármacos, proteínas, macromoléculas, o que é interesse da indústria biotecnológica, biologia, bioquímica e diversas outras áreas (HOLLER et al., 2009).

A CE possui diversos mecanismos de separação que podem ser realizados em um capilar. Cada modo de separação tem suas particularidades e áreas de aplicação. São exemplos, além da eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*), eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês *capillary gel electrophoresis*), eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF, do inglês *capillary isoelectric focusing*), isotacoforese capilar (CITP, do inglês *capillary isotachophoresis*), eletrocromatografia micelar (MECC, do inglês micellar electrokinetic capillary chromatography) (TAVARES, 1997; SILVA et al., 2007).

A CZE também conhecida como CE de solução livre (FSCE, do inglês *free solution capillary electrophoresis*) é uma das mais simples e utilizadas na prática. A separação acontece ao longo do capilar baseada na relação carga/ massa do analito conforme ilustra a **Figura 7**. A separação ocorre pela diferença de velocidade de migração dos analitos demonstrados por A, B, C. Nesse mecanismo é importante homogeneidade do BGE, a constância e intensidade do campo elétrico (TAVARES, 1997; BERNARDO-BERMEJO et al., 2020).

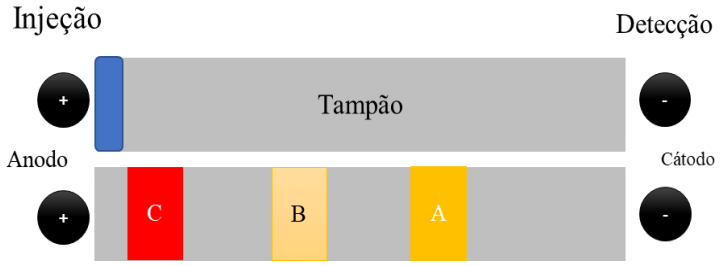


Figura 7. Separação esquemática por CZE. **Fonte:** Próprio autor.

O fluxo eletroforético é o movimento inerente às cargas e tamanho do analito. Cátions migram em direção ao cátodo, eletrodo negativo e ânions em direção ao ânodo, eletrodo positivo (BONATO, JABOR 2005). O fluxo eletrosmótico, é uma característica particular da CE, pois origina-se nas paredes do tubo próximo ao ânodo, é considerado a bomba de fase móvel em CE. Responsável pelo transporte dos solutos em direção ao detector, é produzido por causa da alta voltagem aplicada no capilar de sílica e pela dupla camada formada na interface sílica/solução (TAVARES 1997; HOLLER et al., 2009).

A dupla camada é formada pois a parede interna do capilar de sílica sofre a ionização dos grupos silanóis ácidos fracos (SiOH) que em contato com a base forte (NaOH) adquire carga negativa desprotonando grupos silanóis. Os cátions do tampão se juntam formando uma camada elétrica dupla, uma fixa e outra móvel na superfície negativa do capilar como mostra a **Figura 8**.

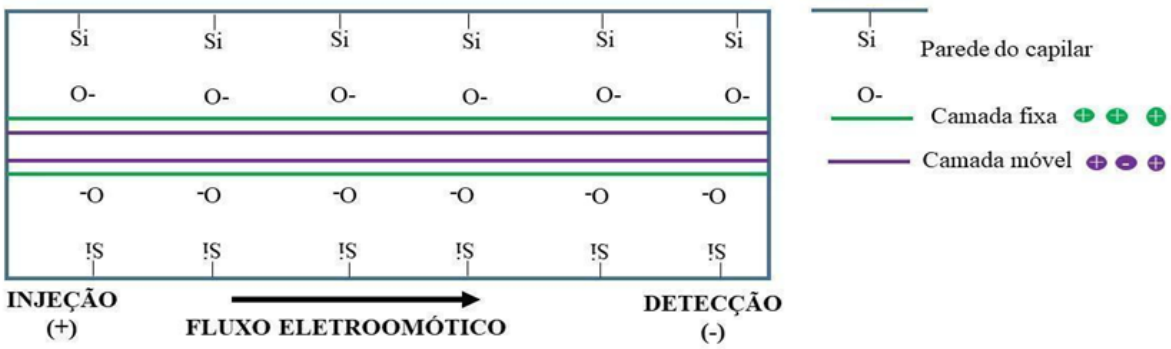


Figura 8. Formação da camada fixa a partir da adsorção das cargas positivas do BGE na parede do capilar e da camada móvel possuindo concentração de cátions maior que ânions e ao movimentar em direção ao detector dá origem ao fluxo eletrosmótico. **Fonte**: próprio autor

Assim com a aplicação do campo elétrico, as forças elétricas causam movimento na direção do catodo, eletrodo negativo e por estarem solvatados, arrastam os analitos juntamente com eles (HOLLER et al., 2009). A velocidade do fluxo eletrosmótico geralmente é maior que o movimento eletroforético e eficaz para arrastar os analitos positivos, nêutrons e negativos respectivamente nessa ordem de eluição (HOLLER et al., 2009). Outra característica, é o perfil do eletroferograma que devido ao fluxo eletrosmótico possui um perfil radial constante da velocidade o que não contribui para o alargamento das bandas (TAVARES, 1997).

A instrumentação básica na sua mobilidade mais simples, CZE, necessita de capilar de sílica fundida recobertos externamente com uma camada de poliimida ou material polimérico, estes com uma janela ótica alinhada com detector geralmente ultravioleta (UV), uma fonte de alta tensão controlável, reservatório para tampão e amostra, um par de eletrodos cátodo e ânodo, geralmente de platina, para aplicação de um alto potencial de corrente contínua monitorados ou controlados por softwares de um computador para controle do método e receptor de dados (SILVA, 2003), conforme ilustrado na **Figura 9**.

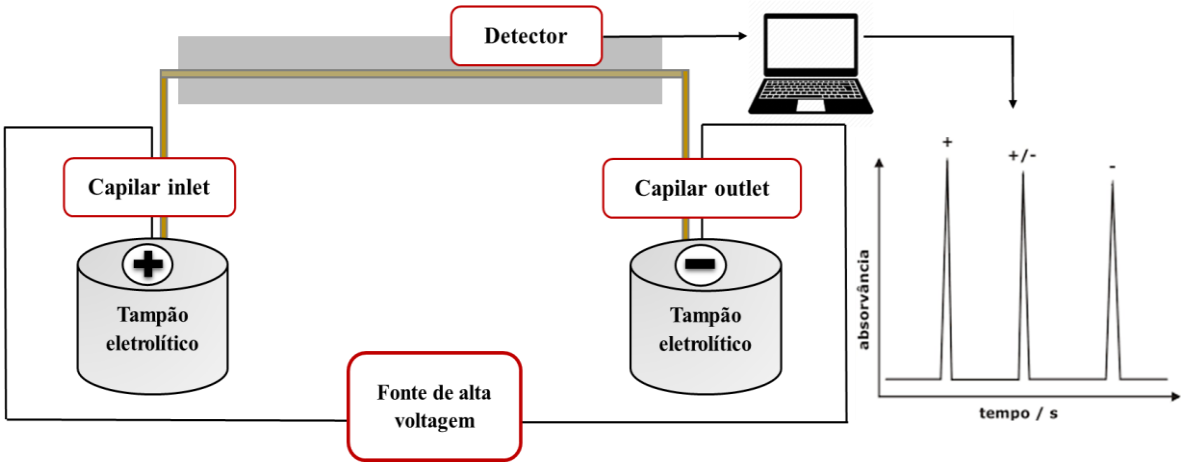


Figura 9. Configuração básica do equipamento de CE. **Fonte:** Próprio autor.

Os tubos capilares, onde ocorre a separação, são de 15 a 100 µm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento. Esse capilar é preenchido por um eletrólito, geralmente solução tampão e submetido a altas voltagens aplicadas pelos eletrodos (TAVARES, 1997). O capilar possui vantagens em relação a outros suportes devido ao seu diâmetro estreito e formato que resiste a aplicação de altos campos elétricos propiciando uma dissipação do calor gerando aquecimento mínimo e minimizando o efeito Joule (HOLLER et al., 2009).

A amostra, cerca de 1 a 10 nL, pode ser introduzida no capilar *inlet* por injeção eletrocinética em que uma voltagem é aplicada entre os reservatórios da amostra e eletrólito em um tempo definido ou por injeção hidrodinâmica que pode ser pressão positiva ou negativa, voltagem e vácuo entre os reservatórios da amostra e do eletrólito de corrida (QUEIROZ, 2001; SILVA et al., 2007).

As análises quirais em CE iniciaram a partir da década de 80 e essa técnica mostrou-se capaz de alcançar separações altamente eficientes tornando-se uma ótima alternativa aos métodos cromatográficos (ZHANG et al., 2021). Para que haja separação de enantiômeros é feita adição de seletores quirais no BGE. Assim o enantiômero interage com o seletor quiral provocando diferentes mobilidades e acontecendo a separação (BONATO; JABOR, 2005).

Alguns autores denominam essa técnica de eletrocromatografia capilar ou cromatografia eletrocinética e não somente CE, isso porque acontece dois mecanismos de separação, um cromatográfico e outro eletroforético. O princípio cromatográfico se refere ao reconhecimento estereosseletivo dos enantiômeros onde o seletor quiral forma uma pseudofase estacionária. O princípio eletroforético influencia na migração do analito, seletor quiral, complexo analito-seletor quiral em direção ao detector (DE OLIVEIRA, 2011), conforme mostra a **Figura 10**.

Calcula-se que cerca de 80% de seletores quirais usados em CE são ciclodextrinas (CDs) e seus derivados. Essas são moléculas cíclicas de oligossacarídeos de seis (α-CD), sete (β-CD) ou oito (γ-CD) unidades de glicose. Possuem algumas propriedades como baixa absorção no UV, possibilidade de obtenção de CDs com diferentes polaridades e solubilidades e alto grau de enantiodiscriminação (DE OLIVEIRA, 2011).

Relativamente sua cavidade interna é hidrofóbica e as bordas da cavidade com a presença de grupos hidroxilas, hidrofílica o que concede propriedades enantiosseletivas. O diâmetro e o volume da cavidade variam de acordo com o número de glicoses que constitui o anel como mostra a **Figura 11** (BONATO; JABOR, 2005; BERNARDO-BERMEJO et al., 2020). Existem quatro tipos de CDs: neutras, aniônicas, catiônicas e anfóteras elas são sintetizadas, pois algumas CDs nativas (α, β, γ) apresentam baixo poder de separação dos enantiômeros e solubilidade, porém elas podem passar por substituições químicas do hidrogênio em grupos hidroxila gerando CDs com propriedades distintas. As CDs neutras são utilizadas na separação de analitos ionizados. Alguns exemplos desta classe de CDs são: 2-hidroxipropil-β-CD, dimetil-β-CD, trimetil-β-CD, hidroxietil-CD, heptakis-(2,6-diO-metil)-β-CD, heptakis-(2,3, 6-tri-O-metil)- β-CD. As CDs aniônicas podem separar analitos ionizados ou não. Alguns exemplos: carboximetil-β-CD (CM-β-CD), carboxietil-β-CD, succinil-β-CD, sulfobutiléter-β-CD (SB-β-CD) e sulfoetil-β-CD e CD-β-sulfatada (S-β-CD).

As CDs S-β-CD e SB-β-CD são carregadas negativamente em qualquer faixa de pH e são usadas para separação de compostos neutros e básicos. A CD catiônica mais usada é a 2-hidroxipropil-3-trimetilamônio-β-CD (QA-β-CD). Sua principal aplicação é na separação de ácidos carboxílicos e aminoácidos. Por fim, as CDs anfóteras comporta-se como aniônicas, neutras ou catiônicas o que dependerá do pH do BGE. Um exemplo de CD anfótera é o cloreto de 2-hidroxipropiltrimetilamônio (DE OLIVEIRA,2011).

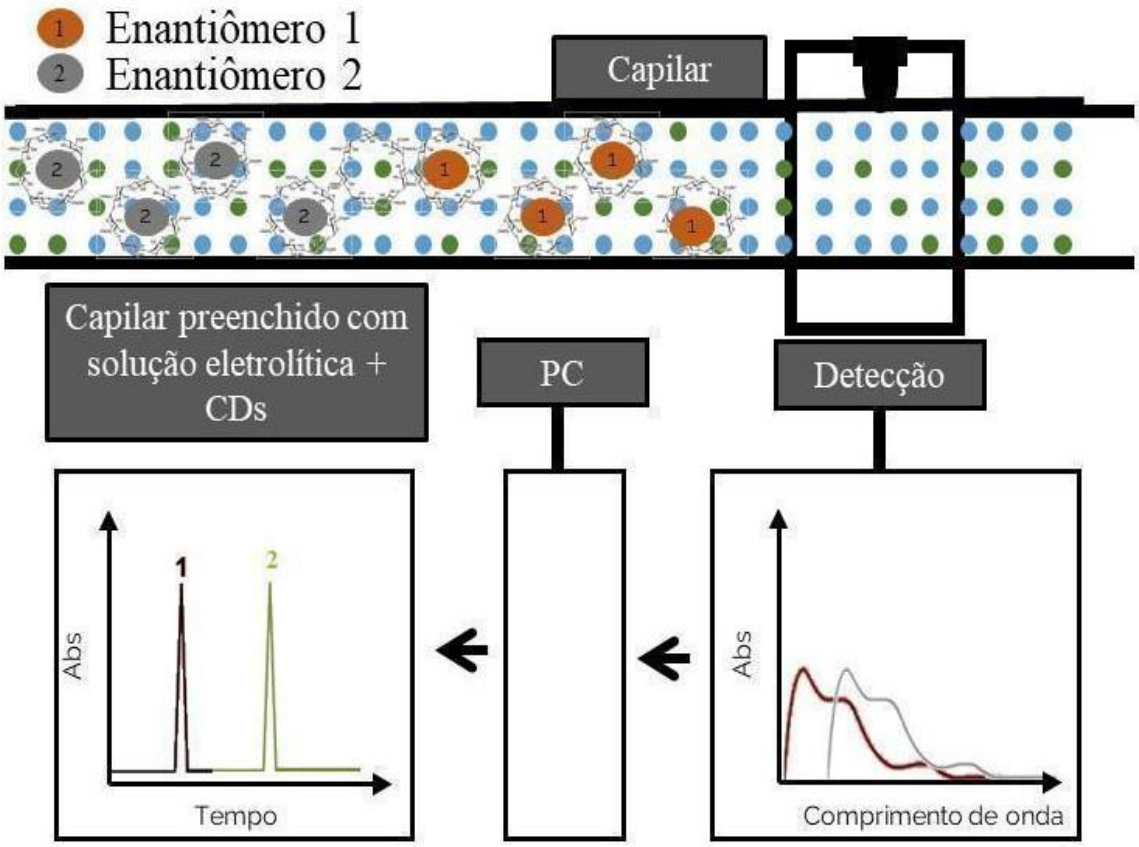


Figura 10. Representação esquemática da eletrocromatografia. **Fonte:** Próprio autor

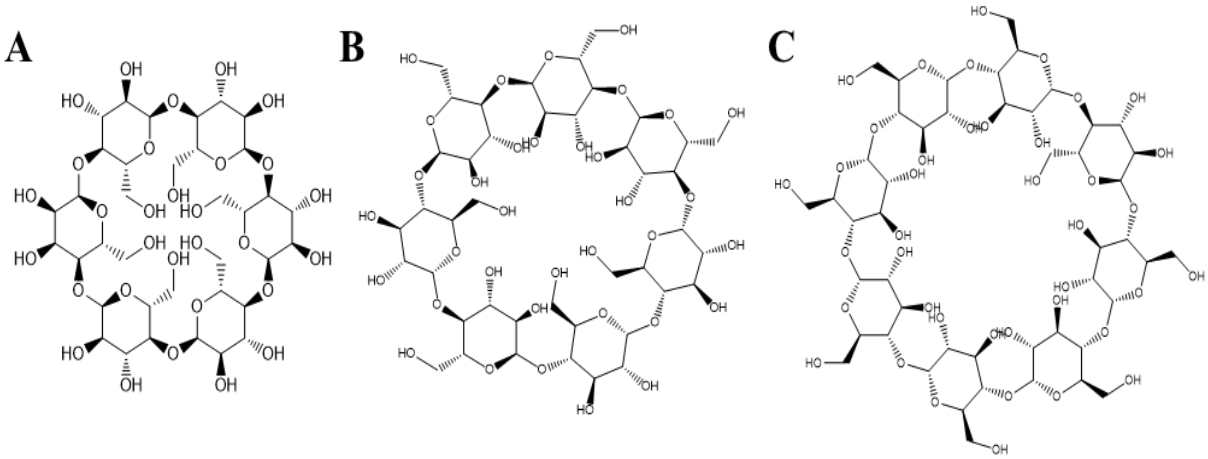


Figura 11. Estruturas das (A) α-, (B) β-, e (C) γ-CD. **Fonte:** Próprio autor.

A CE apresenta uma opção interessante na determinação enantiosseletiva de TRM, devido a sua rapidez, versatilidade, eficiência na separação, baixo consumo de reagente e solvente, se enquadrando nos parâmetros da química verde, sendo que o solvente mais utilizado é água em volumes muito pequenos, além da geração de pouco resíduo por demandar o mínimo de amostras (nano litro), possuir baixo custo por análise, curto tempo de análise, alto poder de separação, compatibilidade com vários sistemas de detecção, instrumentos comercializados que admitem operações confiáveis em análises de rotina (SILVA, 2003; JUAN-GARCIA et al., 2005; SILVA et al., 2007; SARKANY et al., 2019; BERNARDO-BERMEJO et al., 2020).

Nesse cenário, fica evidente a necessidade de desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação de enantiômeros para avançar pesquisas envolvendo o TRM. Assim, o desenvolvimento de um método analítico para a determinação enantiosseletiva de TRM em plasma utilizando CE e empregando MSPE como preparo de amostras poderá responder a esse apelo analítico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método enantiosseletivo por CE empregando MSPE como preparo de amostras para determinação de TRM em plasma humano.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar as condições para análise enantiosseletiva do TRM por CE;
- Sintetizar e caracterizar o material adsorvente magnético a base de MIP e RAM;
- Avaliar a capacidade do adsorvente em extrair o TRM do plasma, estudando o efeito de diferentes variáveis como pH da amostra, volume da amostra, solvente de eluição, volume do solvente de eluição, solvente de lavagem, tempo de agitação, quantidade de material, reuso.
- Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade;
- Realizar a aplicação deste método desenvolvido e validado na análise de amostra de plasma humano de voluntário em uso do TRM.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e solução padrão

O padrão de TRM (99,52%) foi adquirido da Cristália® (Itapira, SP, Brasil). A solução padrão foi preparada na concentração de 1 mg mL^{-1} e para isso, pesou-se em uma balança analítica 0,010 g de TRM que foi transferido para um balão de 10 mL e completado com metanol volumetricamente.

Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos materiais foram de grau analítico ou HPLC: Cloreto de ferro II e III, etanol, ácido acético foram adquiridos da Êxodo Cientifica® (Hortolândia, SP, Brasil); hidróxido de amônio (NH_4OH) adquirido na Êxodo Cientifica® (Hortolândia, SP, Brasil), acetonitrila e clorofórmio adquiridos na Dinâmica Química® (Indaiatuba, SP, Brasil), a água que foi destilada e purificada utilizando o equipamento Millipore Milli-Q Plus® (Bedford, MA, Estados Unidos da América), ácido metacrílico, etilenoglicol de dimetacrilato, glicerol de dimetacrilato, 2-hidroxietil metacrilato e cloreto de benzalcônio adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), 4,4'-azo-bis-(4-ciano pentaenóico) adquirido da Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, TX, Estados Unidos da América), borohidreto de sódio, glutaraldeído e tetraetilortosilicato (TEOS) adquiridos da Merck® (Darmstadt, Hessen, Alemanha), albumina de soro bovino (BSA) adquirido da Acrós Organics® (Morris Plains, NJ, Estados Unidos da América), metanol da J. T. Baker® (Cidade do México, MX, México), acetona da Macronκ Chemicals® (Phillipsburg, NJ, Estados Unidos da América), hidróxido de sódio e ácido clorídrico adquiridos da Synth® (Diadema, SP, Brasil). Para o preparo da solução eletrolítica (BGE, do inglês *background electrolite*): fosfato de sódio monobásico anidro 98% p.a. da Neon® (São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio dibásico anidro Synth® (Diadema, SP, Brasil), β-CD-sulfatada sal sódico (S-β-CD) da Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

3.2. Instrumentação e condições da eletroforese capilar

A separação dos enantiômeros do TRM foi obtida utilizando um equipamento de CE da Agilent Technologies modelo CE 7100 acoplado a um detector por arranjo de diodos (DAD) operando a 195 nm. Capilar de sílica fundida com revestimento de poliimida, de 75 µm diâmetro interno, comprimento total de 58 cm e comprimento efetivo de 50 cm, injeção hidrodinâmica, λ=195 nm, temperatura de 25°C, programa Agilent Open Lab.

Antes do primeiro uso, o capilar foi condicionado com NaOH (1 mol L^{-1}) por 1 h, seguido de água ultrapura pelo mesmo tempo. Antes da primeira análise de cada dia foi condicionado com NaOH (0,1 mol L^{-1}), seguido de água ultrapura, de um sistema Millipore Milli-Q Plus (Bedford, MA, EUA), ambos por 10 min. Entre as análises, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} e água ultrapura ambos por 2 min seguido de BGE com CD durante 3 min. O vial contendo eletrólito era trocado a cada quatro corridas.

O padrão de TRM foi dissolvido em metanol, obtendo-se concentração 1 mg mL^{-1}. Para análise, esta solução padrão foi diluída passando a ter a concentração de 50 µg mL^{-1}. A solução de 25 mM BGE fosfato foi preparada todos os dias, filtrada com filtro 0,45 µm, pH ajustado com solução de NaOH 0,1/0,01 M.

A separação não enantiosseletiva de TRM ocorreu a partir do trabalho de Fonseca et al., 2017. Foram feitas algumas modificações, como diminuição na concentração e pH do BGE, diminuição na voltagem aplicada, aumento no comprimento total, efetivo e no diâmetro interno do capilar alcançando as seguintes condições eletroforéticas: BGE fosfato 25 mM pH 9,30, injeção hidrodinâmica de 30mbar durante 4 s, voltagem de 15 Kv, temperatura de 25 °C.

Já a separação enantiosseletiva do TRM foi feita nas seguintes condições eletroforéticas: BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de

40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm.

3.3. Procedimentos de síntese

3.3.1. Síntese das nanopartículas magnéticas

As MNPs foram preparadas utilizando 15 mmol de $FeCl_3.6H_2O$ e 10 mmol de $FeCl_2.4H_2O$ dissolvidos em 80 mL de água destilada pré-aquecida à 80 ˚C sob agitação para formação de uma solução amarelo claro. Em seguida, 50 mL de solução de NH_4OH 28% (*v/v*) foi adicionada gota a gota na solução, que mudou sua cor de amarelo para o preto. A reação foi mantida a 80 ˚C por 30 min. O precipitado preto obtido (MNPs) foi recolhido magneticamente e lavado repetidamente com água destilada a qual tinha valor de pH aferido aproximando do neutro. Finalmente, as MNPs foram secas em estufa a 60 ˚C durante 24 h.

3.3.2. Funcionalização das nanopartículas magnéticas

A modificação das MNPs foi feita utilizando TEOS. Para tanto, 600 mg de Fe_2O_3 foram adicionados em 60 mL de etanol: água destilada (5: 1, *v/v*) e essa suspensão foi mantida no banho de ultrassom por 20 min. Em seguida, 10 mL de 28% NH_4OH e 4 mL de TEOS foram adicionados na suspensão rapidamente e a reação foi mantida na temperatura ambiente com agitação mecânica por 12 h. O precipitado obtido foi magneticamente separado, e repetidamente lavado com água destilada até pH das soluções de lavagens chegar próximo ao neutro. Finalmente, o precipitado foi seco a 60 ˚C durante 24 h.

3.3.3. Síntese do MMIP e MNIP

Em um béquer contendo 500 mg de $Fe_3O_4@SiO_2$ foram adicionados 20 mL de clorofórmio. Em outro béquer, 0,4 mmol de TRM (MM) e 2,0 mmol de ácido metacrílico

(MF) foram dissolvidos em 20 mL de clorofórmio. Os béqueres foram colocados simultaneamente ao banho de ultrassom por 1 h para formação do complexo molde-monômero e dispersão das partículas magnéticas, respectivamente. Posteriormente, os conteúdos de ambos os béqueres foram vertidos para um frasco âmbar e em seguida foram adicionados 12 mmol de etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) (ALC) e 80 mg de 4,4'-azobis (ácido 4-cianovalérico) (IR). A mistura foi mantida sob banho de ultrassom por 30 min. O frasco foi selado e mantido a 75 °C, sob agitação mecânica por 24 h. Após a síntese, o MMIP foi lavado com uma solução de metanol: ácido acético (9:1, *v/v*) até completa remoção da MM, a qual foi monitorada pela injeção da solução de lavagem no CE. O polímero não impresso magnético (MNIP) foi sintetizado nas mesmas condições, porém na ausência da MM.

3.3.4. Revestimento com monômero hidrofílico

Em um tubo tipo Falcon® de 50 mL foram adicionados 1,0 g do MMIP, 7,5 mmol de 2-hidroxietil metacrilato, 0,5 mmol de glicerol dimetacrilato e 35 mL de clorofórmio. Em seguida, o tubo foi levado ao ultrassom durante 10 min, e depois, deixado na estufa por 60 °C por 24 h. O material foi lavado com água ultrapura para retirada do excesso de monômeros e seco na estufa a 60 °C por 24 h.

3.3.5. Revestimento com BSA

Em um tubo tipo Falcon® de 50 mL foram adicionados 1,0 g de MMIP-HM e 20 mL de solução de BSA (1% *m/v*). Em seguida, a solução foi agitada utilizando vórtex a 3000 rpm por 1 min. Logo após, a solução foi deixada em repouso por 30 min. Após esse tempo, o excesso de BSA foi retirado sendo adicionado ao mesmo tubo 5,0 mL do reticulador gluteraldeído. O tubo foi agitado no vórtex por 1 min. E logo após deixado em repouso por

5 h. Em seguida, o excesso de gluteraldeído foi retirado adicionando-se 10 mL do agente redutor borohidreto de sódio (1%), a solução foi agitada por 1 min utilizando o vórtex. Depois, a solução foi deixada em repouso por 15 min, sendo retirado o excesso da solução de borohidreto de sódio. Finalmente, o tubo Falcon® foi levado na estufa a 60 °C por 24 h. Após a secagem, o material foi lavado com solução de metanol: água ultrapura (1: 1, *v/v*) seguido por água ultrapura para se obter o material denominado RA-MMIP-HM-BSA. As etapas de síntese são representadas na **figura 12**.

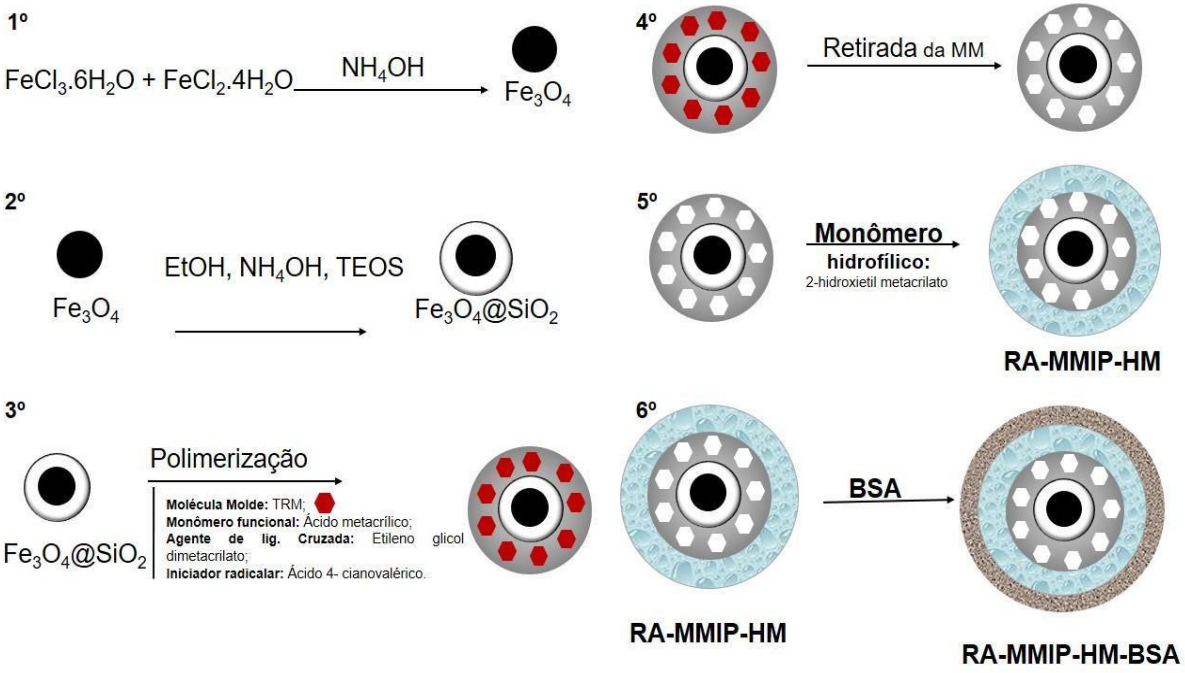


Figura 12: Esquema das etapas da síntese para RA-MMIP-HM-BSA. **Fonte:** Próprio autor.

3.4. Caracterização dos materiais adsorventes

3.4.1. Termogravimetria (TGA)

As análises de TGA foram realizadas em uma termobalança (2970 TA Instrument, New Castle, EUA) da UFSJ aquecida de 25 a 1000 ºC, com taxa de aquecimento de 10 ºC min^{-1} e sob fluxo de nitrogênio (50 mL min^{-1}), a amostra foi acondicionada em cadinho de alumina, na forma de pó. Os dados foram plotados pelo software Origin.

3.4.2. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A realização das análises de FTIR foi feita em parceria com LabPetro da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) realizada em um espectrômetro Agilent Technologies (Modelo Cary 630 FTIR), com módulo de ATR, faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1}, 16 scans, 4 cm^{-1} de resolução e os dados foram plotados pelo software Origin.

3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplado com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)

Foi utilizado um microscópio TM 3000 Hitachi Analítica Table Top com aceleração de tensão variando entre -5 KV a 15 KV, equipado com EDS da UFSJ e os dados foram plotados pelo software Origin.

3.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises da morfologia interna dos materiais foram realizadas em 0,50 µm, 500 nm, 200 nm, 100 nm em parceria com Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Microscópio eletrônico de Transmissão fabricante JEOL / Modelo: JEM 1400 / Voltagem de aceleração: Até 120 kV / Resolução: 0,3 nm (120 kV) / Tipo de Filamento: Lab6 (Hexaboreto de Lantânio) / Magnificação: 1.200.000 ×.

3.4.5. Difração de raio- X (DRX)

O DRX foi realizado na UFSJ em um difratômetro de raios-X XRD-6000 da Shimadzu. Os dados foram plotados pelo software Origin.

3.4.6. Teste de molhabilidade

O teste de molhabilidade tem o intuito de determinar a hidrofilicidade dos materiais sintetizados. Para isso, o material é colocado em uma superfície plana e lisa e com auxílio de uma pipeta uma gota de água é colocada sobre a sua superfície. Então é obtido o ângulo (θ) de contato entre a superfície do material e a gota e este que definirá o grau de afinidade do material com a água conforme mostra a **Figura 13**, onde ângulos menores que 90° indicam que as forças de adesão são maiores, ou seja, existe uma forte atração entra as moléculas de água e as moléculas do material e por isso representa a hidrofilicidade do material, já ângulos maiores que 90° indicam que as forças adesivas são menos intensas, demonstrando a característica hidrofóbica do material. As superfícies ainda podem ser super-hidrofóbicas, com ângulos maiores que 150° ou super-hidrofílicas, com ângulos menores que 10° (LU et al., 2017).

Utilizou-se uma câmera fotográfica profissional, de alta resolução, Nikon D90 acoplada a uma lente de aumento de 50 mm para capturar a interação da superfície do material com a gota de água.

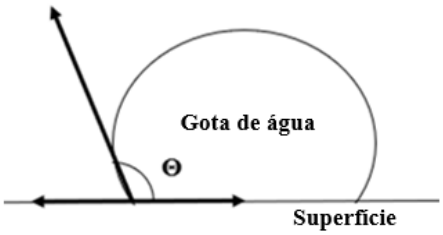


Figura 13. Representação da interação da gota com uma superfície do material hidrofóbico originando o θ maior que 90°. **Fonte:** Próprio autor.

3.4.7. Ponto de Carga Zero (PCZ)

Prever a carga da superfície do material é um parâmetro importante quando se trata de adsorção, pois este tem influência na ionização dos grupos funcionais da superfície do

adsorvente que irá interagir com o analito. O PCZ é um conceito relacionado ao fenômeno de adsorção e descreve a condição quando a densidade de carga elétrica em uma superfície é zero, ou seja, cargas positivas e negativas na mesma proporção. A adsorção do cátion é favorecida quando o pH da solução for maior que o PCZ pois a superfície do material tende a estar negativa, já a adsorção de ânions, quando o pH da solução for menor que o PCZ, onde a superfície do material tende a estar positiva (DEOLIN, et al. 2013; MADRAKIAN, et al.2013).

A determinação PCZ do RA-MMIP-HM-BSA e RA-MNIP-HM-BSA foi feita utilizando 125 mg de cada material em tubo Falcon® foram colocados em contato com 5 mL de água deionizada nos valores de pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12. O pH dessas soluções foram ajustados com NaOH 0,1M/0,01M e HCl 0,1M/0,01M. Os tubos foram agitados em uma mesa agitadora por 15 min a 175 rpm, e em seguida, deixados em repouso por 24 h em temperatura ambiente. Posteriormente os pHs foram medidos. Todas as determinações foram feitas em duplicata. O PCZ foi determinado por meio de um gráfico.

3.5. Efeito de impressão do MMIP

O teste do efeito de impressão molecular possui o intuito de verificar o reconhecimento seletivo do material para determinado analito ou grupo de analitos. Desta forma, a seletividade deste material foi avaliada frente a outros fármacos a fim de observar a eficiência de adsorção deste material.

Com os dados de recuperação dos fármacos, alguns parâmetros referentes a seletividade do material foram determinados, como coeficiente de distribuição (K_d) calculado pela **Equação 1** e o coeficiente de seletividade (k) obtido através da **Equação 2** (NACANO; SEGATELLI; TARLEY, 2010).

$$Kd = \frac{(Ci - Cf)}{Cf} X \frac{V(mL)}{mA(g)} \quad \textbf{Eq. (1)}$$

Onde: Ci e Cf representam concentração inicial e final da solução respectivamente, V volume da solução e mA a massa do material adsorvente.

$$K = \frac{Kd\ (TRM)}{Kd\ (interferente)}$$ **Eq. (2)**

Neste estudo foram utilizados plasma enriquecidos com padrões de lisinopril, enalapril, captopril, atenolol, ractopamina, ibuprofeno e bupropiona, na concentração de 50 µg mL^{-1}, as quais foram submetidas a processos de extração com 20 mg o RA-MMIP-HM-BSA e NIP e 500 µL de amostra, sendo os resultados apresentados na forma de gráfico de recuperação.

3.6. Preparo das amostras empregando MSPE

3.6.1. Decantação das proteínas do plasma

Neste trabalho usaremos o plasma de doadores saudáveis, o qual foi separado do sangue total por meio de centrifugação e armazenado em freezer a -20 °C. O desenvolvimento desse projeto utilizando amostra de plasma humano foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos com número da CAAE: 20839019.7.0000.5151.

Na otimização do preparo de amostra foi utilizado plasma enriquecido com padrão TRM na concentração de 50 µg mL^{-1}. Primeiramente foi necessário fazer o procedimento de hidrólise básica para decantação das proteínas do plasma. Para isso, em um balão de 10 mL foi adicionado 300 µL de solução de NaOH 1 mol L^{-1} e completado com plasma. Posteriormente foi feita diluição 1:1 (*v* / *v*) com 10 mL de tampão fosfato para diminuição da sua viscosidade e a mistura deixada em banho maria a 65 °C por 1 h e logo após centrifugação por 3 min a 1500 rpm. Esses procedimentos têm por objetivo desnaturar as proteínas e separar a possível da ligação do analito com a proteína (BORDIN et al., 2015).

3.6.2. MSPE

A extração de TRM nas amostras de plasma foi feita pela MSPE. Em um tubo de ensaio foi adicionada uma quantidade de material adsorvente, logo após, acrescentou-se uma determinada quantidade de amostra enriquecida com TRM na concentração de 50 µg mL^{-1}. O tubo foi agitado em vórtex e em seguida deixado em repouso em um ímã de neodímio N42 (50×50×25 mm) para separação do material e o sobrenadante que foi descartado. Posteriormente, foi feita a etapa da lavagem agitando o tubo com uma quantidade determinada de água que foi descartada com auxílio do ímã. Por fim, foi feita a eluição com um solvente adequado agitando em vórtex e separando com ímã. O sobrenadante foi coletado e seco em estufa a 60 °C. Após seco foi feita a ressuspensão com uma solução de Metanol:BGE:Água 1:1:8 *v*/*v* para posterior injeção no CE.

3.7. Parâmetros para validação do método analítico

O objetivo da validação de um método analítico é mostrar por meios de resultados confiáveis que a aplicação desse método é condizente e atende às exigências da normativa da ANVISA, RDC, nº 27, 2012. Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, linearidade, LOD, LOQ, precisão, exatidão e estabilidade.

3.7.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada através da sobreposição dos eletroferogramas da matriz isenta do analito e da matriz enriquecida com padrão TRM na concentração LOQ. Mostrando assim que no tempo de retenção dos picos não há interferentes.

3.7.2. Linearidade

A curva foi construída a partir de sete concentrações na faixa de: 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000 ng mL^{-1}. Para o preparo dessas soluções foi utilizado uma solução mãe na concentração de 1 mg mL^{-1}, a mesma foi diluída para 200 µg mL^{-1} e a partir dessa solução preparou-se os padrões 4, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg mL^{-1}, os quais resultarão nas extrações com a faixa já indicada. Os tubos foram pesados com 20 mg de RA-MMIP-HM-BSA, logo após adicionou-se 25 µL de cada padrão, completando com volume de 975 µL de plasma pH 8, o que resultou na concentração de cada ponto da curva.

3.7.3. Precisão

A precisão foi determinada por um intervalo linear utilizando concentrações baixa de 500 ng mL^{-1}, média de 1500 ng mL^{-1} e alta de 2500 ng mL^{-1}. As análises foram realizadas em seis replicatas sob as mesmas condições experimentais para cada concentração no mesmo dia e a precisão intermediária foi realizada em inter-dia. Foi expressa por meio da porcentagem desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) também conhecido como Coeficiente de variação (CV), obtendo valores menores ou iguais a 15%, exceto para LOQ, onde são aceitos valores até 20%, obtido conforme **Equação 3** (RDC, nº 27, 2012, RIBANI et al., 2004).

$$CV = RSD(\%) = \frac{DP}{M}\ x\ 100 \quad \textbf{Eq. (3)}$$

Onde DP é o Desvio padrão das recuperações e M a média das medições

3.7.4. Exatidão

A exatidão foi determinada por um intervalo linear utilizando três concentrações diferentes: 500 ng mL^{-1}, 1500 ng mL^{-1} e 2500 ng mL^{-1}. As análises foram realizadas em seis replicatas para cada concentração. Foi expressa pela porcentagem do erro relativo (RE do

inglês, *relative error*) admitindo valores na faixa de ± 15% de acordo com a **Equação 4** (RDC, nº 27, 2012).

$$RE(\%) = \frac{valor\ obtido - valor\ real}{Valor\ real}\ x\ 100 \quad \textbf{Eq. (4)}$$

3.7.5. LOD e LOQ

O LOD corresponde a menor concentração em que uma determinada técnica instrumental consegue detectar um analito não necessitando quantificá-lo (RDC, nº 27, 2012). A determinação do LOD pode ser feita de três métodos: visual, relação sinal-ruído e baseado nos parâmetros da curva analítica. Neste trabalho o LOD foi obtido pelo método visual, fazendo-se injeções de concentrações conhecidas decrescentes até que seja possível diferenciar o ruído do sinal analítico na menor concentração visível de TRM na matriz estudada. O LOQ foi a menor concentração que apresentou sinal analítico quantificável com precisão e exatidão aceitáveis e valores de RSD e RE% abaixo de 20%.

3.7.6. Estabilidade

A estabilidade deseja avaliar se a concentração do analito em uma determinada matriz se mantém dentro dos limites aprovados sob condições específicas como temperatura ambiente, ciclos de congelamento e descongelamento, armazenamento com longa e curta duração (RDC, nº 27, 2012). Foi feito um levantamento bibliográfico de artigos que determinaram TRM em plasma comparando os dados de estabilidade dos artigos encontrados.

3.8. Aplicação em amostra real

A aplicação do método ocorreu por meio da análise do plasma de um voluntário saudável, administrando 2 cápsulas de Cloridrato de Tramadol (Germed®) de 50 mg após

jejum noturno. A ingestão de alimentos foi retida por 2 h após a medicação. Foram coletadas amostras de plasma após 1, 2 h da administração do medicamento. As amostras foram mantidas em freezer por -20°C por 4 meses. Após esse tempo, houve a precipitação de proteínas e amostras foram submetidas ao método desenvolvido.

4. RESULTADO E DISCUSSÕES

4.1. Otimização do método analítico

O padrão de TRM foi dissolvido em metanol, obtendo-se concentração 1 mg mL^{-1}. Para análise, esta solução padrão foi diluída passando a ter a concentração de 50 µg mL^{-1}. A solução de 25 mM BGE fosfato foi preparada todos os dias, filtrada com filtro 0,45 µm, pH ajustado para 9,30 com solução de NaOH 0,1/0,01 M, injeção da amostra de modo hidrodinâmico com pressão de 30 mbar por 4 s, λ=195 nm, voltagem de 15 kV e temperatura de 25°C.

A **Figura 14A,** mostra o eletroferograma da análise não enantiosseletiva de TRM realizada por CZE, utilizando TRM a 50 µg mL^{-1}, BGE fosfato 25 mM pH 9,30, injeção hidrodinâmica de 30mbar durante 4 s, voltagem de 15 Kv, , temperatura de 25 °C. A **Figura 14B** mostra a separação enantiosseletiva do TRM com as seguintes condições eletroforéticas: TRM a 50 µg mL^{-1}, BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de 40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm, onde (-)-(1*S*,2*S*)-TRM apresentou um tempo de migração de 8,48 min e (+)-(1*R*,2*R*)-TRM de 9,50 min, obtendo uma excelente resolução de os picos 5,05.

A ordem de eluição foi estudada por Fonseca et al. (2017) no qual foi feito um estudo teórico e prático, para isso, foram feitas vinte injeções do padrão de TRM em metanol por HPLC, os enantiômeros foram separados e coletado alíquotas as quais foram secas por fluxo de N_2 e ressuspendidas em BGE para injeção no CE. Essa etapa foi realizada para obter uma amostra pura de cada enantiômero. Foi utilizado um HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com operação de modo normal utilizando uma coluna Chiralpak® IA com seletor quiral tris (3,5- dimetilfenilcarbamato) de amilose e fase móvel hexano: etanol:

dietilamina (96: 4: 0.3 *v*/*v*/*v*) onde (-)-(1*S*,2*S*)-TRM possui menor tempo de eluição que (+)-(1*R*,2*R*)-TRM.

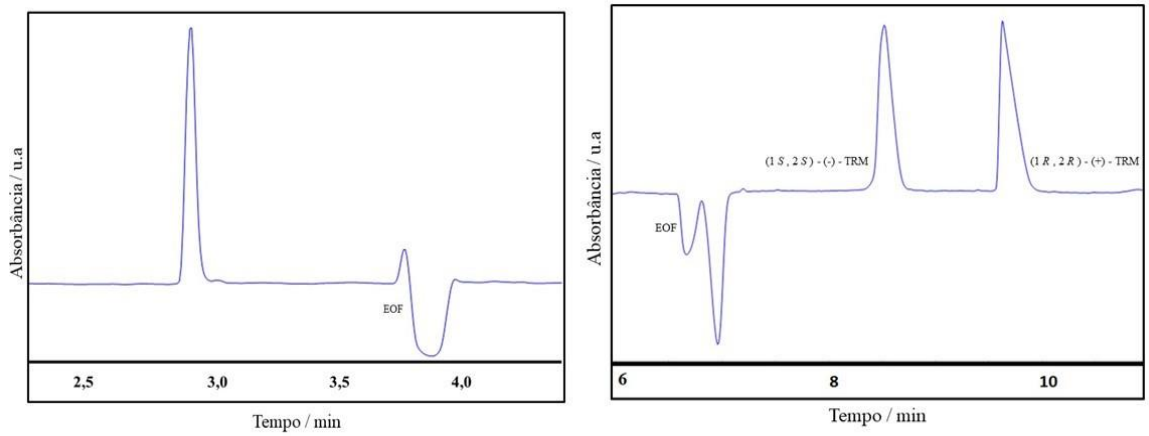


Figura 14. **(A)** Eletroferogramas para a determinação não enantiosseletiva de TRM utilizando as seguintes condições eletroforéticas: TRM a 50 µg mL^{-1}, BGE fosfato 25 mM pH 9,30, injeção hidrodinâmica de 30mbar durante 4 s, voltagem de 15 Kv, , temperatura de 25 °C e **(B)** Determinação enantiosseletiva de TRM utilizando as seguintes condições eletroforéticas: TRM a 50 µg mL^{-1}, BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de 40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm . **Fonte:** Próprio autor.

4.2. Caracterização do material

4.2.1. TGA

A TGA é utilizada para monitorar a variação da massa em função da temperatura em uma taxa de aquecimento constante. Para isso, a massa de uma amostra em atmosfera controlada é registrada em função da temperatura que é aumentada linearmente com o tempo. Um gráfico de porcentagem de massa em função do tempo é plotado chamado de termograma ou curva de decomposição térmica. É possível quantificar a perda de massa proveniente de vários fenômenos como decomposição e vaporização (HOLLER et al., 2009).

A **Figura 15** mostra o TGA do RA-MMIP-HM-BSA e RA-MNIP-HM-BSA e seus materiais precursores, podendo assim estudar a estabilidade térmica deles. É possível notar

que a partícula magnética Fe_3O_4 possui boa estabilidade térmica devido a sua natureza inorgânica apresentando apenas 3,82% de perda de massa durante todo o processo, essa pequena perda pode ser devido a perda de compostos voláteis ou até mesmo umidade, fato este esperado visto que possui ponto de fusão em 1565 °C. Já a Fe_3O_4@SiO_2 pode-se observar uma perda de massa de aproximadamente 7,7% com evento térmico próximo a 50 °C, o que pode ser justificado devido alguma decomposição de reagentes de síntese.

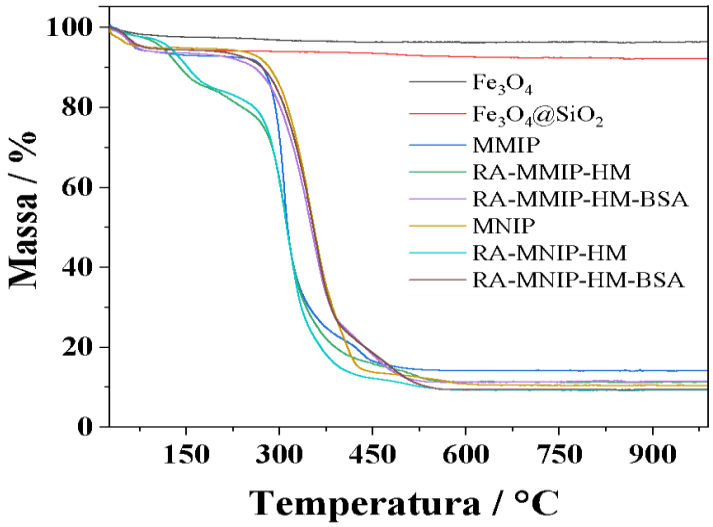


Figura 15. Curvas termogravimétricas das diferentes etapas de síntese do RA-MMIP-HM-BSA e RA-MNIP-HM-BSA. **Fonte**: próprio autor.

No caso do MMIP possui dois eventos térmicos, o primeiro se repete entre 50 e 150 °C com perda de 7% de massa que pode ser justificado por perda de água, e outro de 250 a 550 °C com perda de 77,8% de massa devido a decomposição da matriz polimérica. Após essa temperatura, não se observa perda acentuada de massa restando 14,2 % atribuída às partículas magnéticas que não se decompõem nessa faixa de temperatura. No termograma do RA-MMIP-HM pode-se observar três eventos térmicos: o primeiro referente a perda de umidade até 104 °C com perda de aproximadamente 5% em seguida até 261 °C com perda de 18,14% podendo ser decomposição de reagentes residuais da síntese e por fim 570 °C

com perda de 66,4% referente a degradação da matriz polimérica. Em RA-MMIP-HM-BSA também ocorre esses dois eventos térmicos, o primeiro até 100 °C com perda de 6,2% e o outro na faixa de 235 a 560 °C com perda de 82,12%. É possível notar também que os termogramas dos NIP, material referência, tiveram o mesmo perfil apresentando os mesmos eventos térmicos nas diferentes etapas de síntese.

4.2.2. FTIR

Com a espectroscopia do infravermelho é possível identificar a presença de grupos funcionais, podendo identificar compostos e/ou investigar sua composição química. O princípio da técnica se baseia na absorção de radiação. Um feixe de radiação passa de um meio mais denso para um menos denso (superfície da amostra) ocorrendo reflexão. A radiação no infravermelho atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrômetro registra o resultado na forma de uma banda de absorção, fornecendo evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam (PAVIA et al., 2015).

As análises por FTIR têm sido usadas em vários estudos para identificar grupos funcionais, como os de ácidos carboxílicos, aminas, amidas, estruturas alifáticas e aromáticas e grupos hidroxilas (PAIM et al., 1990). As vantagens desta técnica sobre outros métodos incluem a rapidez na aquisição dos espectros, melhor relação sinal-ruído, alta resolução espectral, não destrutivo, além de apresentar boa reprodutividade. Baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem aos níveis de energia da molécula (chamados de níveis

vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico (PAVIA et al., 2015).

Na **Figura 16A**, tem-se o FTIR da Fe_3O_4 onde as bandas do Fe – O apresentam-se abaixo de 600 cm-1, por isso não são identificadas. Já no FTIR da Fe_3O_4@SiO_2 possui um sinal intenso em 1090 cm^{-1} atribuído ao alongamento assimétrico de vibração da ligação Si–O–Si. Observou-se também uma banda de absorção em 780 cm^{-1} devido à vibração da ligação Si–O e outra em 940 cm^{-1} atribuída ao alongamento Si–OH. Esses dados demonstram a eficácia da funcionalização da partícula magnética com TEOS (DINALLI et al., 2020).

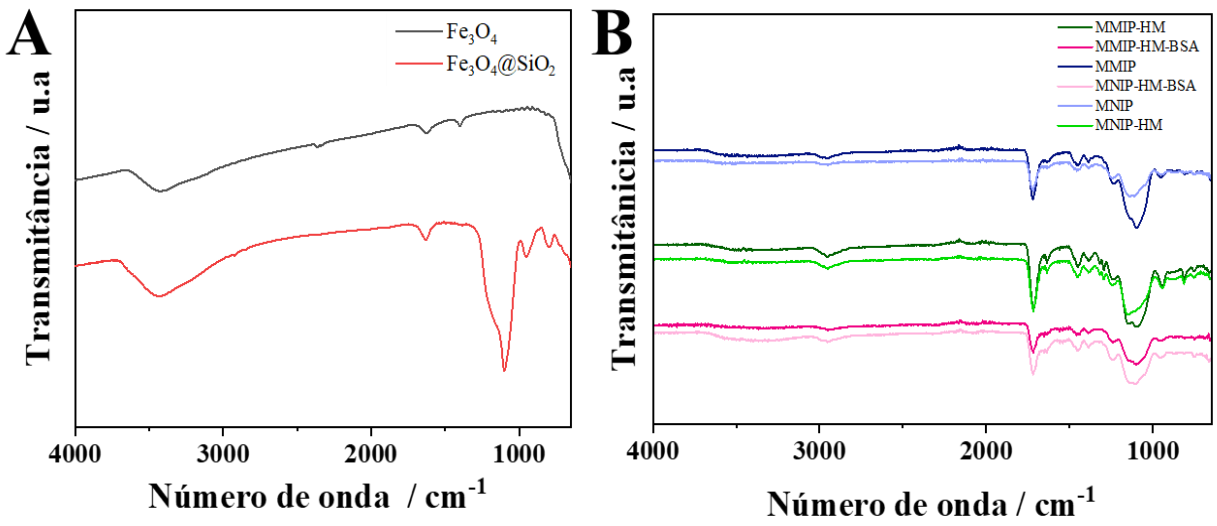


Figura 16-A-B. FTIR dos materiais sintetizados. **Fonte:** do próprio autor

Na **Figura 16B** tem-se o MMIP na sequência MNIP, MMIP-HM e MNIP-HM, RA-MMIP-HM-BSA seguido do RA-MNIP-HM-BSA. Pode-se perceber que os materiais sintetizados MIP e NIP mantiveram o mesmo perfil espectral apresentando as mesmas bandas no FTIR, sugerindo que a remoção da molécula molde, TRM, do MIP foi bem-sucedida. Algumas bandas são dignas de menção, sendo uma banda centrada a 3450 cm^{-1} característica do estiramento das ligações O-H provenientes do grupo carboxílico

do polímero sintetizado. Um pico bem definido a 1720 cm^{-1} característica do estiramento da ligação C=O (carbonila). Bandas de baixa intensidade próximas a 2950 cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações C-H (característica de hibridização sp3). As bandas próximas a 1453 cm^{-1} referem-se à deformação angular da ligação CH_2=CH_2, presentes na matriz polimérica formada sobre Fe_2O_3@SiO_2 (DE OLIVEIRA, 2019). Todos esses resultados indicam que o processo de polimerização do polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado foi eficaz e que o polímero teve boa adesão ao suporte magnético.

4.2.3. MEV/EDS

A MEV é capaz de produzir imagens tridimensionais de alta resolução da superfície das amostras. Essa técnica permite analisar a morfologia com grande aumento e boa resolução espacial. É utilizado um feixe de elétrons que é irradiado sob a amostra que é capaz de explorar sua superfície e transmitir uma série de radiações, dentre eles elétrons secundários e retroespalhados. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição. (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007; MALISKA, 2020). Esse equipamento pode ser equipado com EDS que também se restringe a superfície da amostra e permite fazer uma análise qualitativa e semiquantitativa para identificação e estimativa da concentração dos elementos químicos presentes nos materiais (DUART et al., 2003; DEDAVID et al., 2007). Característica importante dessa técnica é poder correlacionar a morfologia, superfície do material com a composição da região analisada.

A **Figura 17** mostra imagens com ampliações de 100 e 2000 × para as diferentes etapas de síntese do RA-MMIP-HM-BSA e seus precursores, além das imagens de MEV para os adsorventes a base de NIP. Foi possível perceber que o material possui partículas

com tamanhos irregulares, granulometria distinta, essa característica ficou bem evidente devido ao fato de o material não ter sido tamisado. Pode-se perceber a presença de aglomerados grandes de tamanhos e formatos diferentes (esféricos e retangulares) e superfície indefinida em maior ampliação.

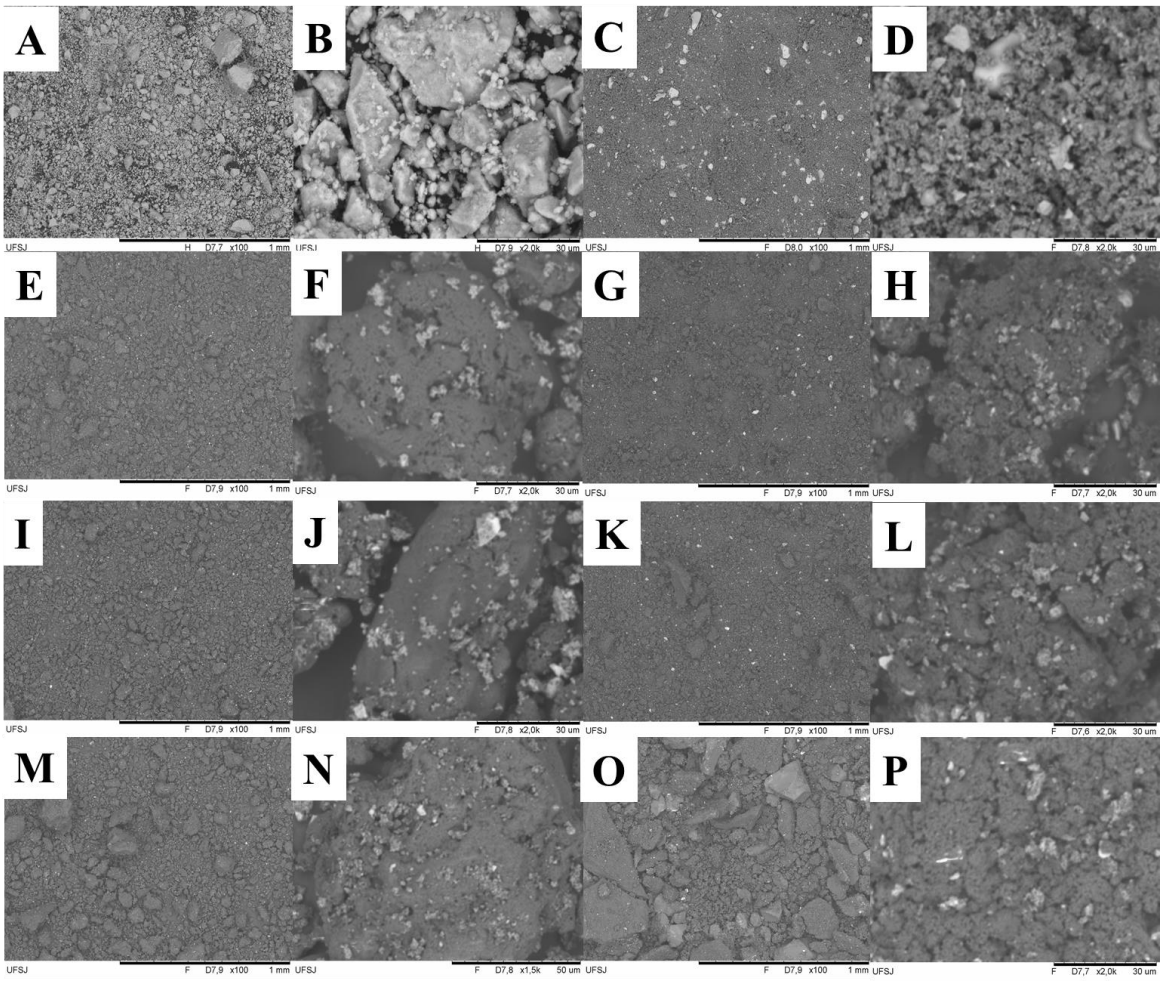


Figura 17. Imagens de MEV de **(A)** Fe_2O_3 100 ×; **(B)** Fe_2O_3 2000×; **(C)** Fe_2O_3@SiO_2 100×; **(D)** Fe_2O_3@SiO_2 2000×; **(E)** MMIP 100×; **(F)** MMIP 2000×; **(G)** MNIP 100×; **(H)** MNIP 2000×; **(I)** RA-MMIP-HM 100×; **(J)** RA-MMIP-HM 2000×; (K) RA-MNIP-HM 100×; (L) RA-MNIP-HM 2000×; (M) RA-MMIP-HM-BSA 100×; **(N)** RA-MMIP-HM-BSA 2000×**(O)** RA-MNIP-HM-BSA 100×; **(P)** RA-MNIP-HM-BSA 2000×. **Fonte:** próprio autor.

A análise por EDS permite uma avaliação qualitativa e semiquantitativa dos elementos químicos presentes na superfície dos materiais, não tendo uma precisão, mas uma estimativa da concentração dos elementos presentes (DUART et al., 2003; DEDAVID et al.,

2007), o que pode ser observado na **Tabela 1**. Para o Fe_3O_4 foi possível detectar grandes quantidades de Fe e O, além de traços de contaminantes N, Si. E C devido a fita de carbono usada na análise. Em $Fe_3O_4@SiO_2$ observa-se uma redução da quantidade de Fe, e como esperado, aumento de O e Si devido ao revestimento com TEOS. Enquanto que o MMIP MNIP e suas formas revestidas tiveram as grandezas elementares parecidas. Observou-se redução de Fe e Si e aumento de C, comprovando a eficiência da polimerização na superfície das partículas magnéticas. Pelo EDS foi possível confirmar a presença dos elementos esperados em cada etapa de síntese.

Tabela 1. Composição elementar dos materiais sintetizados obtidos por EDS.

	Elemento					
	Fe	**O**	**C**	**Nª**	**Si**	**Total (%)**
Fe_3O_4	62,87	26,94	8,65	1,36	0,18	100
$Fe_3O_4@SiO_2$	24,09	42,92	9,40	1,30	22,29	100
MMIP	4,46	36,69	52,12	2,78	3,95	100
RA-MMIP-HM	5,02	35,95	52,03	2,97	4,03	100
RA-MMIP-HM-BSA	5,30	34,83	52,29	4,37	3,21	100
MNIP	5,13	34,87	52,39	3,97	3,64	100
RA-MNIP-HM	4,99	34,60	54,20	3,65	2,56	100
RA-MNIP-HM-BSA	4.51	34,21	55,48	3,53	2,27	100

4.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A MET (do inglês *transmission electron microscopy*) é uma técnica que se baseia na interação de feixe de elétrons com a amostra, esse feixe que atravessa a amostra, os elétrons transmitidos são analisados e a imagem é formada. Essa técnica permite identificar a forma estrutural dos materiais e tamanho das partículas (TELES, et al. 2017; WILLIAMS, BARRY, 2009). A **Figura 18** apresenta as imagens de MET de cada etapa de síntese. Pode-se observar pela **Figuras 18 A-D** que Fe_3O_4 que são nanopartículas esféricas densas que foram revestidas com SiO_2 com sucesso formando $Fe_3O_4@SiO_2$, uma camada menos densa

e irregular. As imagens da **Figuras 18 E-F** se referem ao MMIP e as Figuras **18 G-H** ao MNIP. **Figuras 18 I-J** referem-se à RA-MMIP-HM e **Figuras 18 K-L** à RA-MNIP-HM. As Figuras 18 M-N e O-P referem-se à RA-MMIP-HM-BSA e RA-MNIP-HM-BSA, respectivamente. Pode-se observar que em todas as etapas de síntese há presença do núcleo magnético, o que garante as propriedades magnéticas no material. Observa-se também um aumento da camada externa que pode ser devido ao duplo revestimento o que facilita a exclusão de macromoléculas.

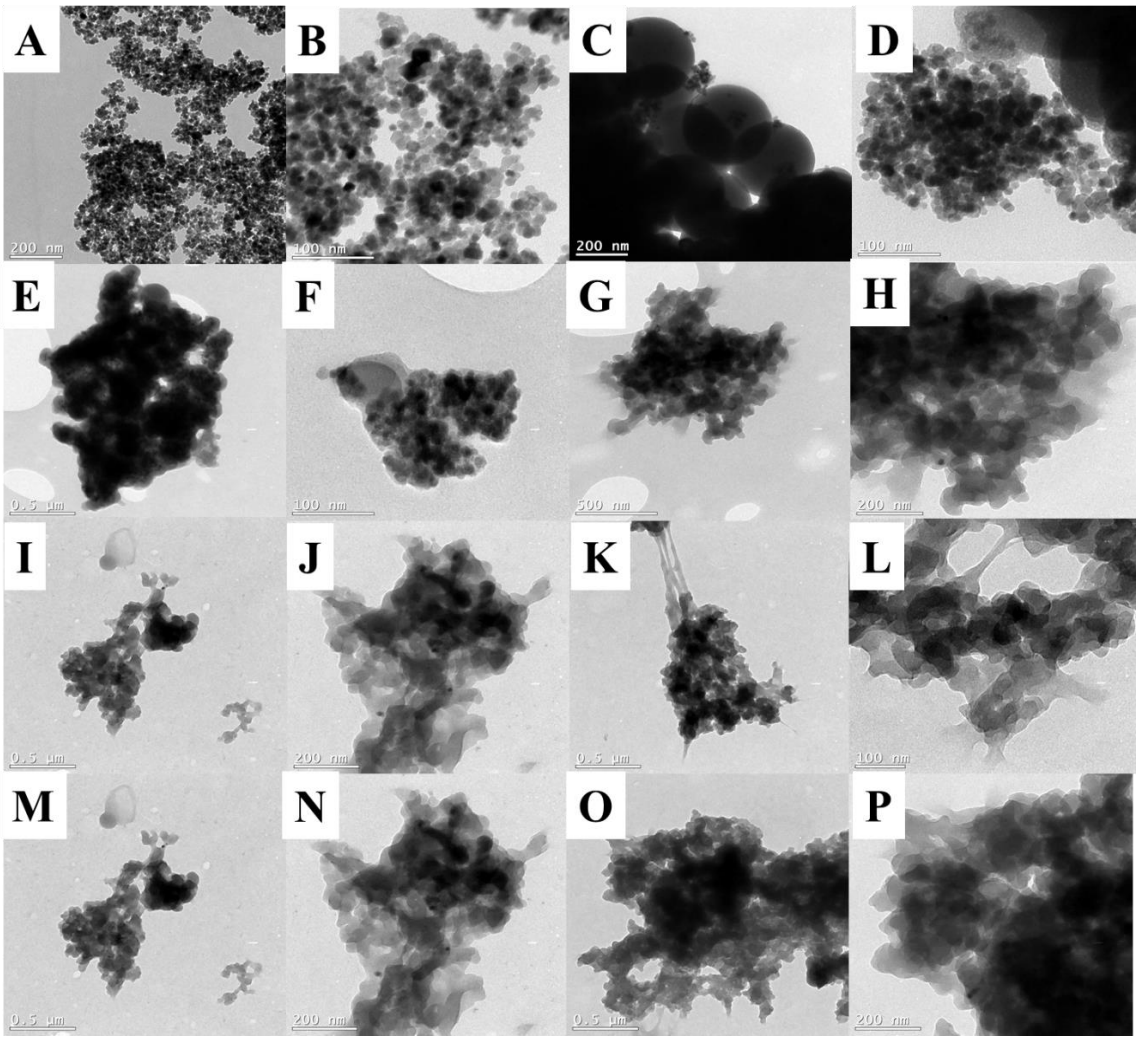


Figura 18. Imagens de MET: Fe_3O_4 **(A)** 200 nm; **(B)** 100 nm; $Fe_3O_4@SiO_2$ **(C)** 200 nm; **(D)** 100 nm; MMIP **(E)** 0,5 µm; **(F)** 100 nm; MNIP **(G)** 500 nm; **(H)** 200 nm; RA-MMIP-HM **(I)** 0,50 µm; **(J)** 200 nm; RA-MNIP-HM **(K)** 0,50 µm; **(L)** 100 nm; RA-MMIP-HM-BSA **(M)** 0,5 µm; **(N)** 200 nm; RA-MNIP-HM-BSA **(O)** 0,5 µm; **(P)** 200 nm. **Fonte**: próprio autor.

4.2.5. *DRX*

A técnica de DRX é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios-x incidente e os elétrons dos átomos componentes do material. A análise difração desses feixes determina o tipo de estrutura cristalina do material. A difração é formada quando as reflexões produzem interferências construtivas e estas estão diretamente relacionadas à distância entre os planos dos átomos e o ângulo de incidência do feixe da radiação (QUEIROZ, et al. 2021). Uma expressão muito importante para esse estudo é a lei de Bragg demonstrada na **Equação 5** que relaciona a distância entre os planos do cristal (d), o ângulo de difração dos feixes de raio-x (θ) e do comprimento de onda da radiação monocromática utilizada (λ).

$$n\lambda = 2dsen\theta \qquad \textbf{Eq. (5)}$$

Onde *n* corresponde à diferença de fase entre duas ondas, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d distância entre os planos cristalinos e θ corresponde ao ângulo de espalhamento, também conhecido como ângulo de Bragg. O ângulo de difração é dado por 2θ e corresponde ao ângulo medido experimentalmente (SHACKELFORD, 2008).

A técnica de DRX auxilia na compreensão das propriedades do material, pois revela suas estruturas cristalinas e microestruturas. Cada estrutura cristalina possui um padrão característico sendo preciso de um banco de dados de difratogramas para interpretar os resultados. Os materiais envolvendo cada etapa da síntese foram submetidos a DRX para avaliação de suas propriedades estruturais. Os materiais sintetizados foram submetidos à DRX, conforme observado na **Figura 19A**. É possível perceber a presença de seis picos, os quais são característicos da Fe_3O_4, de acordo com o padrão de difração do Fe_3O_4 cristalino, disposto no banco de dados American Mineralogist Crystal Structure Database (COD). Os seis picos são referentes aos índices de Miller (220), (311), (400), (422), (511) e (440) e suas respectivas posições nos difratogramas na faixa de 2θ na região de 20 a 70°.

Para os demais materiais é possível observar que os picos permanecem, porém com intensidade um pouco menor, algo esperado devido aos revestimentos realizados. A partir das **Figuras 19B** e **19C** é possível observar as demais etapas de síntese do MIP e NIP, onde os seis picos permaneceram, porém com intensidade cada vez menor. Esse fato pode ser justificado pelos diferentes processos de revestimento o que deixaram o material com característica amorfa o que pode ser comprovado pela presença de um pico alargado na região 2θ=20°. A partir dos resultados obtidos é possível inferir que houve a preservação da magnetita devido a presença dos picos de difração, fato esse confirmado, pois ao aproximar um campo magnético externo (imã) de um frasco contendo o material ele aproxima, o que garante propriedades magnéticas ao material como demonstrado na **Figura 19D**.

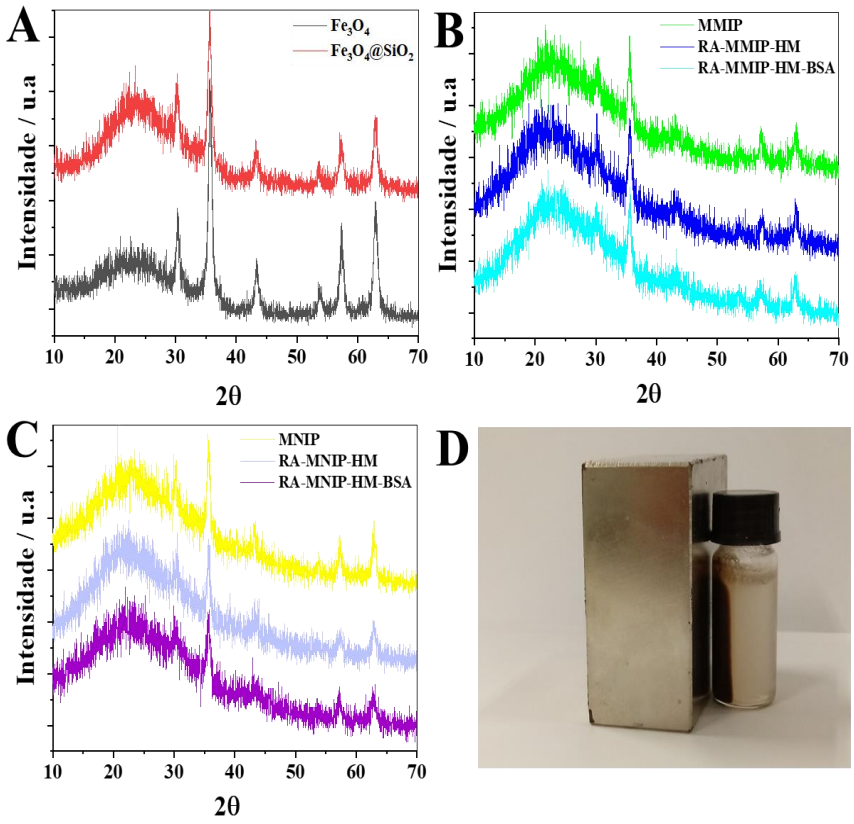


Figura 19. Resultados de DRX das diferentes etapas de síntese do RA-MMMIP-HM-BSA: **(A)** Fe_3O_4 e $Fe_3O_4@SiO_2$; **(B)** MMIP, RA-MMIP-HM e RA-MMIP-HM-BSA; **(C)** MNIP, RA-MNIP-HM e RA-MNIP-HM-BSA; **(D)** Representação das propriedades magnéticas RA-MMMIP-HM-BSA. **Fonte**: próprio autor.

4.2.6. Teste de molhabilidade

A **Figura 20** mostra o teste de molhabilidade dos materiais, onde em **Fig. 20A** a gota d´água ficou totalmente dispersa no material Fe_3O_4, o qual pode ser classificado como superhidrofílico. Após a funcionalização com sílica (**Fig. 20B**) o ângulo do material passou a ser 130°, o que também foi observado para MMIP quanto MNIP (**Fig. 20C** e **20F**). O revestimento com HM tornou o material hidrofílico, ou seja, RA-MMIP-HM e RA-MNIP-HM apresentaram ângulos de 0º, como pode ser observado na **Fig. 20D** e **20G**. Já o encapsulamento com BSA, apresentado nas **Figuras 20E** e **20H**, tornou os materiais hidrofóbicos, pois apresentaram ângulos maiores que 90°. Tal característica demonstra que o revestimento com a proteína BSA foi bem realizado, visto que o material, no encapsulamento anterior possuía características superhidrofílicas, passou a possuir características hidrofóbicas θ= 145º. Essas propriedades são desejáveis para o presente estudo, uma vez que, como este material é utilizado em matrizes aquosas, isto pode ajudar no processo de adsorção/recuperação dos analitos.

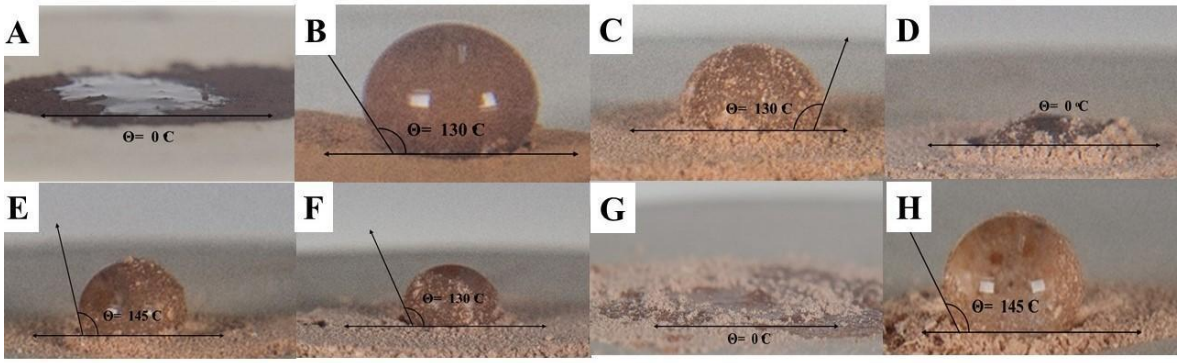


Figura 20. Molhabilidade dos materiais **A)** Fe_3O_4; **B)** Fe_3O_4@SiO_2; **C)** MMIP; **D)** RA-MMIP-HM; **E)** RA-MMIP-HM-BSA; **F)** MNIP; **G)** RA-MNIP-HM; **H)** RA-MNIP-HM -BSA. **Fonte**: próprio autor

4.2.7. Ponto de carga zero

O ponto de carga zero (PCZ) é um importante estudo na avaliação do preparo de amostra na discussão do efeito do pH, pois permite analisar as cargas na superfície do material e entender a influência do pH na recuperação do analito. Foi determinado pela diferença do pH final (pH_f) e pH inicial (pH_0), dos materiais RA-MMIP-HM-BSA e RA-MNIP-HM-BSA, onde pH_{PCZ} corresponde ao cruzamento da curva pH_f-pH_0 *vs.* pH_0. Para RA-MMIP-HM-BSA encontrou-se pH_{PCZ} = 6,7 e para RA-MNIP-HM-BSA pH_{PCZ} = 6,6. Assim, em pH da amostra maior que 6,7 o material estará carregado negativamente, em pH 6.7 RA-MMIP-HM-BSA estará neutro e em pH menor que 6.7 estará protonado, conforme mostra a **Figura 21**.

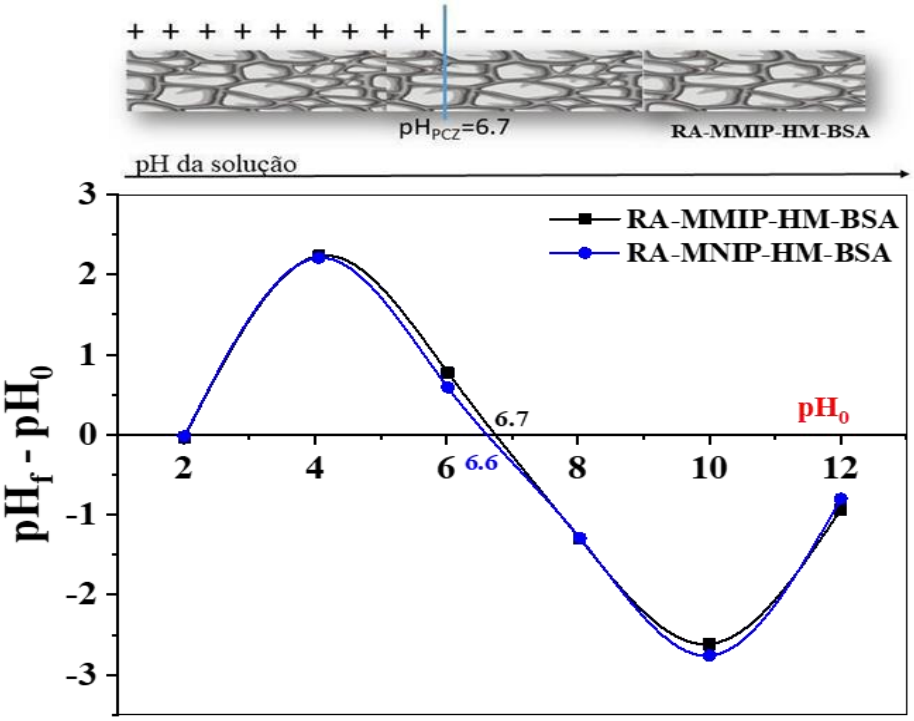


Figura 21. Avaliação do pH_{PCZ} para RA-MMIP-HM-BSA e RA-MNIP-HM-BSA. **Fonte:** próprio autor

4.2.8. Exclusão de proteínas

O teste de exclusão de proteínas tem o intuito de avaliar a eficiência do revestimento, ou seja, se o material foi devidamente revestido com BSA excluindo macromoléculas. A **Figura 22** mostra as curvas de absorção do UV- Vis do padrão BSA e três materiais. Foi atribuído 100% ao sinal do padrão BSA (0,1%), sendo possível observar que RA-MMIP-HM-BSA excluiu 91,51% das proteínas, RA-MMIP-HM 86,42% e MMIP 80,55%, no qual o restante do BSA foi adsorvido por cada material. Esses resultados mostram que à medida que o material foi sendo revestido com HM e depois com BSA, seu potencial de exclusão das proteínas também foi aumentado. RA-MMIP-HM-BSA teve o maior potencial de exclusão, 91,51%, o que auxilia no uso de matrizes complexas como o plasma que possui grande quantidade de macromoléculas.

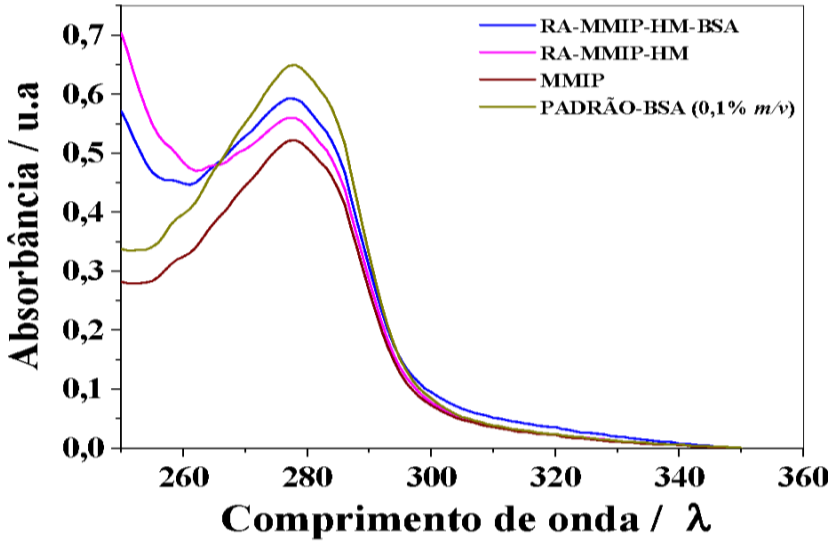


Figura 22. Teste de exclusão de proteínas. **Fonte:** próprio autor

4.3. Otimização do preparo de amostras

4.3.1. Efeito do volume da amostra

Para iniciar os estudos, algumas condições iniciais foram adotadas: 10 mg de material adsorvente RA-MMIP-HM-BSA, 500 µL volume de amostra (plasma), sem ajuste

do pH da amostra, 60 s de agitação no vórtex, 200 µL de água para a etapa de lavagem, e 500 µL de metanol para eluição. Com essas condições iniciais obteve-se uma recuperação de 34,3 ± 9,5%. A partir dessa condição inicial utilizou-se a metodologia univariada envolvendo o estudo das seguintes variáveis: volume de amostra, pH da amostra, eluente, volume do eluente, quantidade de adsorvente, solvente de lavagem e tempo de agitação.

Como mostrado na **Figura 23A**, quatro volumes de amostras foram avaliados: 250, 500, 750 e 1000 µL. O volume de amostra está relacionado com a quantidade de analito disponível para ocupar os sítios ativos do material e também quantidade de interferentes. Sabe-se que um maior volume de amostra implica em uma maior massa no sistema eletroforético o que facilita na redução do limite de quantificação. Porém, inicialmente foi escolhido 500 µL, pois ao comparar com os demais volumes a recuperação não sofreu variação tão significativa e o RSD% está dentro de uma mesma margem, optando então por utilizar menor volume de amostra.

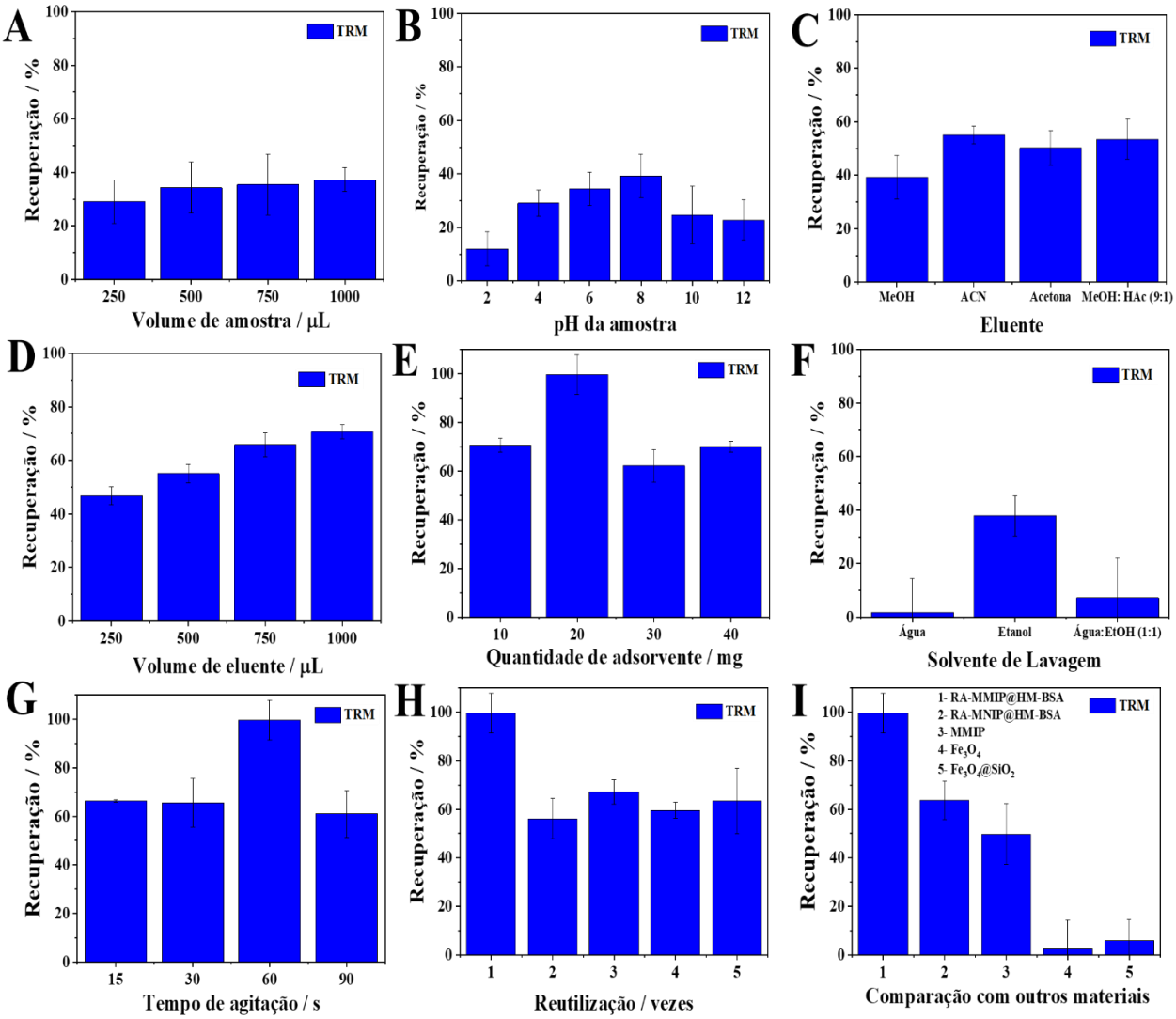


Figura 23. (A) Influência do volume de amostra; **(B)** Influência do pH; **(C)** Influência do tipo de eluente; **(D)** Influência do volume do eluente; **(E)** Influência da quantidade de adsorvente; **(F)** Influência do solvente de lavagem; e **(G)** Influência do tempo de agitação na recuperação de TRM em amostras de plasma; **(H)** Recuperação de TRM em amostras de plasma após sucessivas utilizações do RA-MMIP-HM-BSA; **(I)** Comparação da recuperação de TRM amostras de plasma **(1)** RA-MMIP-HM-BSA, **2)** RA-MMNIP-HM-BSA e seus materiais precursores: **(3)** MMIP, **(4)** Fe_3O_4, **(5)** Fe_3O_4@SiO_2. **Fonte:** próprio autor.

4.3.2. Efeito do pH

O efeito do pH da amostra é significativo na estrutura do analito molecular ou ionizado e na sua interação com os sítios de sorção do material. O TRM é um analito básico

(pKa 9,23, amina terciária e pKa 13,8 álcool) (chemicalize.com). Isso significa que em uma solução que contenha TRM possui suas moléculas em equilíbrio ácido-base em pKa próximo a 9,2. À medida que se eleva o pH dessa solução a porcentagem de moléculas protonadas vai diminuindo perdendo sua carga em pH 11. Outro equilíbrio é formado em valor de pKa 13,8 proveniente de uma espécie aniônica do TRM (CUNHA, 2017).

Foram avaliados pH de 2, 4, 6, 8, 10 e 12. Os resultados obtidos mostraram conforme a **Figura 23B** que em pH 8 acontece uma melhor taxa de recuperação 39,2 ±8,2%. A **Figura 24** apresenta a distribuição das espécies de TRM ao longo da faixa de pH. Em pH 8 cerca de 90% de suas moléculas apresentam carga positiva e 10% estão sem carga, forma neutra. Além disso, pelo PCZ pH 6.7, ou seja, nesse valor de pH o material encontra-se neutro e acima desse valor carregado negativamente, diante disso pode-se dizer que em pH 8 o material terá superfície negativa favorecendo a adsorção de espécies catiônicas por interações eletrostáticas.

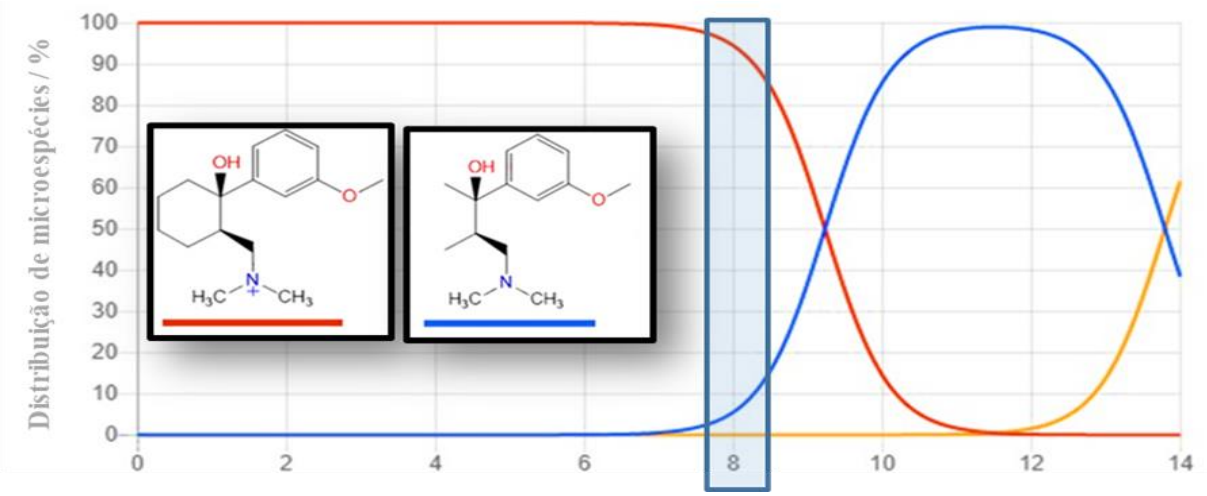


Figura 24. Distribuição das microespécies de TRM em diferentes valores de pH. **Fonte:** próprio autor e adaptado de CHEMICALIZE.

4.3.3. Tipo de eluente

Na escolha do eluente deve-se levar em consideração as propriedades do analito e do material adsorvente A escolha do mesmo é de suma importância para se obter uma boa

recuperação, pois ele é o responsável por romper as interações entre analito e material. Foram avaliados solventes de eluição polares próticos: metanol e metanol: ácido acético (10%); polares apróticos: acetona, acetonitrila e apolar: hexano, porém este último não foi compatível com o material sendo assim descartado. Como observado, dentre os eluentes polares estudados, a acetonitrila foi escolhida por alcançar recuperação de 55,1 ± 6,4% (**Figura 23C**).

4.3.4. Volume do eluente

Foram avaliados volumes do eluente acetonitrila de 250, 500, 750, e 1000 µL, sendo que este último foi escolhido, uma vez que apresentou maior recuperação (**Figura 23D**). O volume do eluente possui uma relação direta com a solubilização/dessorção do analito e os resultados mostraram que um maior volume do solvente favorece com a recuperação atingindo 70,6 ± 2,6%.

4.3.5. Quantidade de material adsorvente

A adsorção acontece nos sítios ativos do material e pode ser influenciada pela quantidade de adsorvente. Na **Figura 23E** pode-se observar que foram analisados 10, 20, 30 e 40 mg de material adsorvente. Em 10 mg a recuperação foi baixa, podemos inferir na presença de pouco material para muito analito a ser adsorvido, sendo que 20 mg apresentou um evidente aumento na recuperação e 30 e 40 mg a presença de muito material para pouco eluente, além disso maior massa exige maior força e maior pressão para realizar a extração. Optando-se assim em fixar a quantidade de 20 mg para os próximos testes. Atingindo uma recuperação de 99,6% ±8,1%.

4.3.6. Solvente de lavagem

O intuito do solvente de lavagem é deixar a amostra mais limpa para eluição, ou seja, retirar os interferentes que podem interagir e ficar retidos no material prejudicando a adsorção. Foram avaliados água, etanol e água: etanol na proporção 1:1. Os resultados mostraram que o melhor solvente de lavagem é a água, pois ela extraiu do material menor quantidade do analito estudado apresentando recuperação de apenas 1,85% e também houve uma melhora significativa no perfil do eletroferograma (**Figura 23F**).

4.3.7. Tempo de agitação

Na agitação ocorre a interação do analito com o material permitindo a adsorção e dessorção. Este é um parâmetro importante a ser avaliado para identificar o tempo necessário para que essas interações ocorram. Foram avaliados os tempos de agitação de 15, 30, 60 e 90 s em um vórtex a 3000 rpm. Como pode ser observado na **Figura 23G**, o tempo escolhido foi de 60 s porque ele apresentou maior recuperação, 99,6 ± 8,1%.

4.3.8. Reutilização

Para avaliar o reuso do material foram feitas cinco extrações com a mesma porção de material. Pela **Figura 23H** observa-se que a partir do primeiro uso a reutilização do material é diminuída significativamente. Sendo assim realizou-se apenas uma extração do material.

A otimização do preparo de amostra ocasionou em uma recuperação de 99,6%. Todas as variáveis avaliadas e as condições otimizadas estão resumidas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Variáveis do preparo de amostra em condições otimizadas.

Variável do preparo de amostra	Condição otimizada
Solvente de Eluição	acetonitrila
Volume do solvente de eluição	1000 µL
Quantidade de material	20 mg
Volume de amostra	500 µL
Tempo de agitação	60 s
pH da amostra	8,0
Solvente de lavagem	Água (200 µL)

4.3.9. Comparação com outros materiais

Foi feito um experimento para comparar a recuperação de TRM utilizando RA-MMIP-HM-BSA com seus materiais precursores: Fe_3O_4, $Fe_3O_4@SiO_2$, MMIP e também RA-MNIP-HM-BSA, seu polímero não impresso. As extrações foram realizadas na condição final, otimizada para o preparo de amostra. Na **Figura 23I** observa-se que os materiais revestidos com HM e BSA tiveram uma maior recuperação, isso porque esses revestimentos podem ajudar na retirada de interferentes, deixando o sítio ativo do material livre para adsorção do analito, e também melhorando as propriedades adsortivas do material.

Além disso, ao comparar o MMIP e o RA-MNIP-HM-BSA pode-se observar que o material revestido apresenta maior recuperação, pois o duplo revestimento do material facilita na exclusão de macromoléculas que poderiam interferir na adsorção do analito. Apesar do MMIP possuir os sítios seletivos, por não possuir o revestimento pode ocorrer adesão de macromoléculas em sua superfície impedindo a adsorção do analito e assim perdendo sua eficiência na extração.

Foi realizado um estudo estatístico empregando o programa GraphPad Prism 7.0 para comparar a eficiência de extração de TRM com os diferentes materiais sintetizados. Foi empregue o teste Anova seguido pelo teste *post hoc* Tuckey, **Figura 25, Tabela 3,** no qual

o fator "tipo de sorvente" foi avaliado de maneira sistemática por múltiplas comparações. Admitindo um intervalo de confiança de 95% e o nível de significância com base no valor de p ($p < 0,05$) os resultados mostram que existe um efeito significativo para o fator “tipo de sorvente” na MSPE para recuperação de TRM, **Tabela 3.** Do ponto de vista estatístico é possível perceber que os intervalos de confiança não se sobrepõem no MMIP, RA-MMIP@HM-BSA e RA-MNIP@HM-BSA, ou seja, possuem diferença significativa na recuperação do TRM, sendo que RA-MMIP@HM-BSA apresentou uma maior recuperação. Fica evidente que o efeito do sítio de reconhecimento molecular e as modificações nos polímeros impressos implicaram em ganhos significativos para a recuperação de TRM quando comparados com os outros adsorventes.

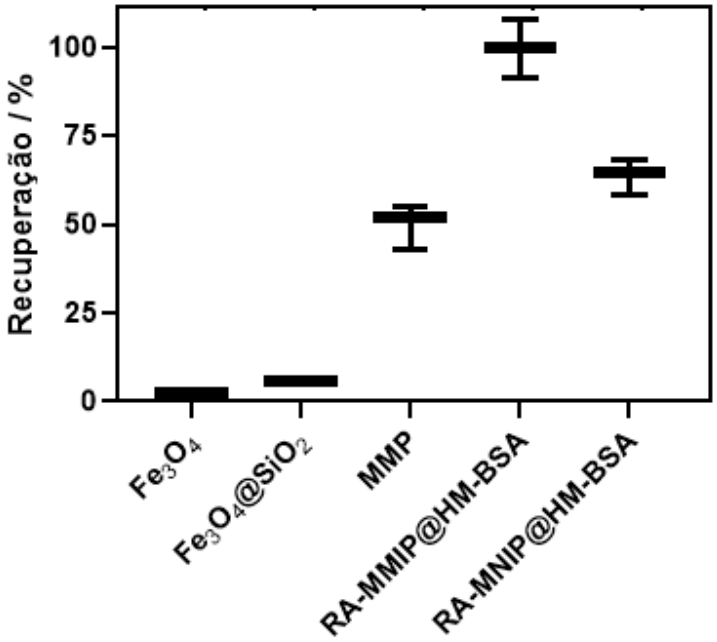


Figura 25. Gráfico (Box Plot) do intervalo de confiança da média das recuperações de TRM por diferentes materiais em MSPE. Fonte: próprio autor.

Tabela 3. Resultados teste Post Hoc Tuckey para a recuperação de TRM por diferentes sorventes na MSPE.

Teste Tuckey – Múltiplas comparações	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p
Fe_3O_4@SiO_2 vs. Fe_3O_4	-12,4 a 19,2	0,94
MMP vs. Fe_3O_4	31,5 a 63,1	< 0,001*
RA-MMIP@HM-BSA vs. Fe_3O_4	81,3 a 113	< 0,001*
RA-MNIP@HM-BSA vs. Fe_3O_4	45,5 a 77,1	< 0,001*
MMP vs. Fe_3O_4@SiO_2	28,0 a 59,7	< 0,001*
RA-MMIP@HM-BSA vs. Fe_3O_4@SiO_2	77,9 a 109	< 0,001*
RA-MNIP@HM-BSA vs. Fe_3O_4@SiO_2	42,0 a 73,7	< 0,001*
RA-MMIP@HM-BSA vs. MMP	34,0 a 65,6	< 0,001*
RA-MNIP@HM-BSA vs. MMP	-1,80 a 29,8	0,09
RA-MNIP@HM-BSA vs. RA-MMIP@HM-BSA	-51,6 a -20,0	< 0,001*

Nível de significância de p* < 0,05

Dentre os grupos de materiais analisados, a recuperação de TRM para os materiais inorgânicos Fe_3O_4 e Fe_3O_4@SiO_2 foram as menores (**Figura 23I**) o que já era esperado, pois, esses materiais não são adequados para o processo de adsorção na MSPE. Ficou evidenciado que houve uma sobreposição dos intervalos de confiança analisados, não sendo encontrada diferenças significativas nas suas recuperações **Figura 25**, **Tabela 3**. Finalmente, o os sítios impressos para o TRM combinados com as modificações nas superfícies dos polímeros promoveram maiores recuperações TRM e diferenças significativas nos materiais poliméricos estudados

4.3.10. Efeito de Impressão Molecular

O efeito de impressão molecular é um teste relevante para avaliar a seletividade do material adsorvente (RA-MMIP-HM-BSA) frente a MM determinando sua constante de seletividade (k). Foram realizados ensaios de recuperação com amostras enriquecidas a 50 μg mL^{-1} com os fármacos: enalapril, captopril, (*S*)-atenolol, (*R*)-atenolol, ractopamina, ibuprofeno e bupropiona, onde a **Figura 26** mostra suas recuperações.

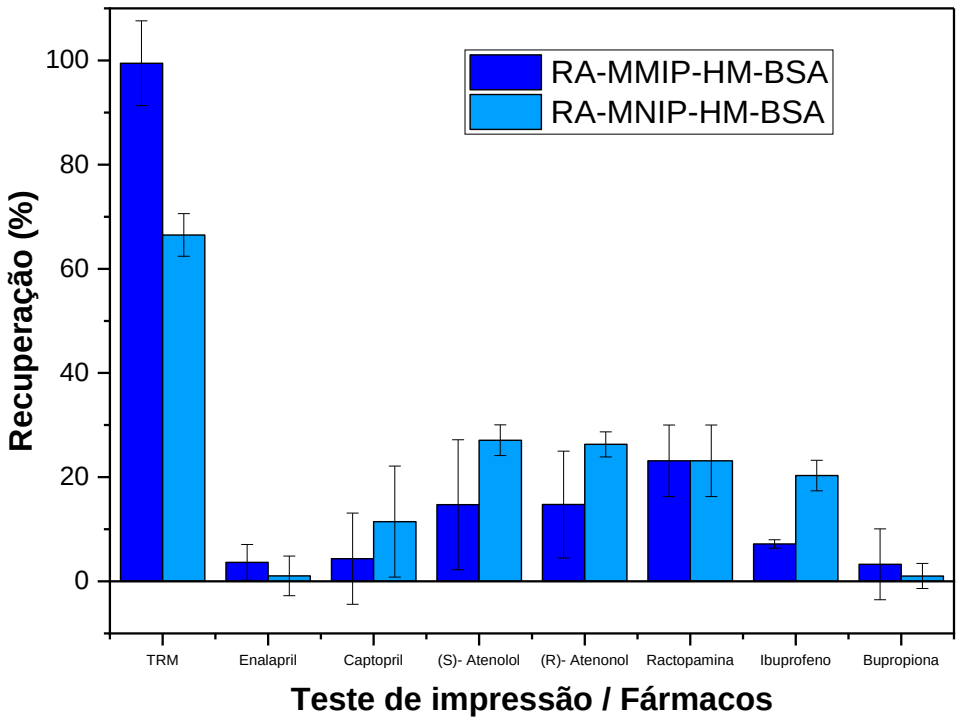


Figura 26. Recuperação dos diferentes fármacos testados no estudo de seletividade do material adsorvente. Concentrações = 50 µg mL^{-1} (cada fármaco). **Fonte:** próprio autor.

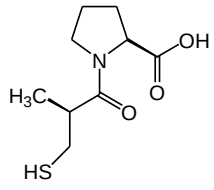
Ao observar os gráficos, pode-se notar que o TRM obteve maior recuperação para ambos os materiais adsorventes. Isso pode ser explicado, pois o primeiro material foi sintetizado na presença da MM e com isso alcançou uma recuperação de 100%. Enquanto que o segundo, material não impresso, foi favorecido devido ao processo de otimização que foi realizado objetivando maior recuperação de TRM. Nota-se recuperações abaixo de 27% para os demais fármacos.

A **Tabela 4** mostra os coeficientes de distribuição (K_d) e a constante de seletividade (k) para a molécula de TRM e para cada um dos interferentes (fármacos). O K_d representa a afinidade e migração do analito para o material adsorvente utilizado. Maiores valores de K_d indicam maior interação entre o analito e material, fato este observado para o TRM, o que

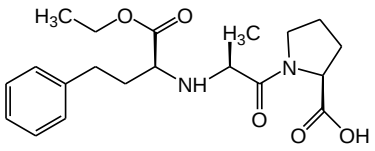
mostra alta afinidade da MM com MMIP retratando que o processo de polimerização foi eficaz.

Os valores de K representam a razão entre a afinidade do MMIP pela MM e pelos interferentes, por isso, quanto maior os valores obtidos para este coeficiente menor é a afinidade do material pelo analito em questão. Na **Tabela 4**, observa-se que enalapril e bupropiona apresentaram as menores recuperações e consequentemente os maiores valores de K. Em compensação, TRM apresentou maior recuperação e menor valor do coeficiente de seletividade. A partir dos valores obtidos para K, percebe-se que o polímero apresenta maior afinidade pelo TRM do que pelos demais analitos, confirmando a seletividade do MMIP para o TRM, sendo possível seu reconhecimento em meio aos interferentes testados.

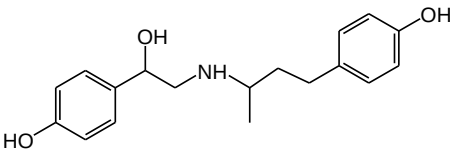
Ao comparar as estruturas dos interferentes, **Figura 27**, pode-se perceber que enalapril e captopril possuem estruturas semelhantes, presença de ácido carboxílico e amida, logo seus K_d e K tiveram valores próximos mostrando que tiveram interações semelhantes com o material. Dentre os fármacos utilizados o material apresentou uma ligeira melhoria na recuperação com ractopamina que possui grupos amina e álcool semelhantes ao TRM, o que pode ter favorecido interação do material.



Captopril



Enalapril



Ractopamina

Figura 27. Estrutura química dos interferentes **Fonte:** próprio autor.

Tabela 4. K_d e K para a molécula de TRM e para cada um dos fármacos testados

Fármaco	Coeficiente de Distribuição (K_d) / mL g^{-1}	Constante de seletividade (K)
TRM	4672,054	1
Enalapril	0,9480	4928,47
Captopril	1,1332	4122,62
(*S*)-Atenolol	4,3108	1083,79
(*R*)-Atenolol	4,3233	1080,65
Ractopamina	6,4441	725,01
Bupropiona	1,9337	4474,11

4.4. Validação do método analítico

4.4.1. Seletividade

A seletividade do método analítico demonstra a capacidade de detectar e quantificar o analito na presença de interferentes como componentes da matriz e impureza (RDC, nº 27, 2012). A seletividade foi avaliada comparando os eletroferogramas da amostra de plasma fortificada com TRM no LOQ 100 ng mL^{-1} e o eletroferograma do branco, ou seja, a amostra de um *pool* de plasma branco (na ausência do analito), e assim observar a presença de possíveis interferentes que possam estar na matriz visto que o plasma é uma matriz complexa. Após análise da **Figura 28** verificou-se que nos tempos de migração do analito não há presença de interferentes, garantindo-se assim a seletividade do método para o fármaco estudado.

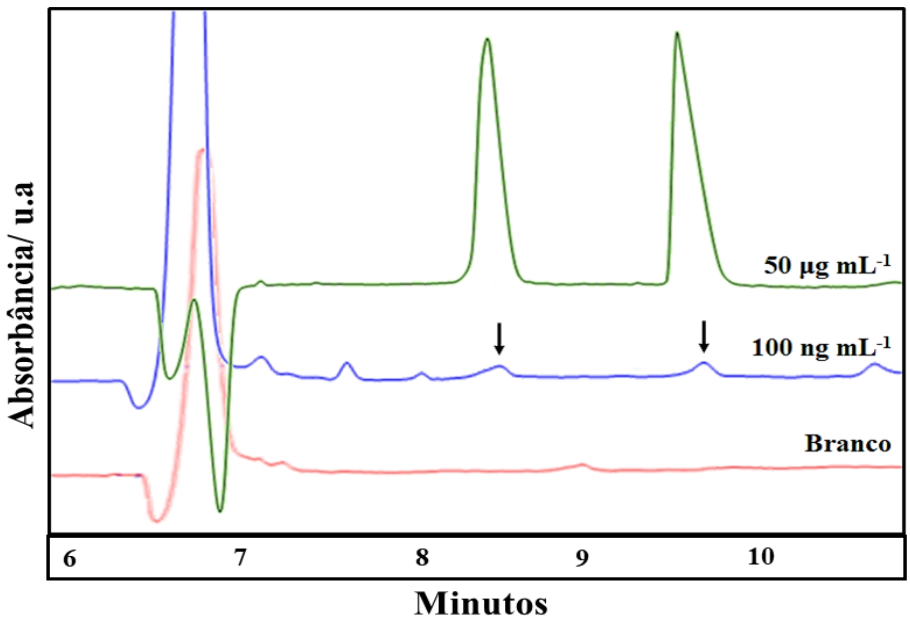


Figura 28. Eletroferogramas de amostras de plasma branco (sem TRM) e de uma amostra fortificada com TRM nas concentrações de 100 ng mL^{-1} (LOQ) e de 50 µg mL^{-1} de TRM. Condições eletroforéticas: BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de 40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm. **Fonte:** Próprio autor.

4.4.2. Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade do mesmo de apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra, em uma determinada faixa de concentração (RDC, nº 27, 2012). Esta pode ser determinada pela curva analítica onde obtêm-se uma relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa do analito na faixa trabalhada (RIBANI et al., 2004). A partir da curva obtém-se uma equação da reta onde pelo método de regressão linear é possível encontrar os coeficientes *a* e *b*, o coeficiente de correlação *r* e de determinação R^2. O *r* indica a relação entre x e y na curva e, quanto mais próximo o valor estiver de 1, menor será a dispersão dos pontos experimentais no conjunto (RDC, nº 27, 2012).

A linearidade do método foi demonstrada através da **Tabela 5** que apresenta os dados da equação de regressão linear para cada enantiômero, e seus coeficientes de correlação, o teste da falta de ajuste os quais seguem os parâmetros da descritos na literatura, como por exemplo, $r > 0.99$, valores de RSD abaixo que 15%, Fcri < Fcal = 2,96 e p -valor > 0,05.

Tabela 5. Linearidade para o método de TRM em plasma.

	(-)-(1*S*,2*S*)-TRM	**(+)-(1*R*,2*R*)-TRM**
Linearidade		
Equação linear	y = 0,0171x + 18,5690	y = 0,0209 x + 22,2575
r [b]	0,99684	0,99679
Intervalo / ng mL^{-1}	100 a 3000	100 a 3000
RSD /% [c]	2,09	0,06
ANOVA lack of fit		
Valor de F [d]	0,175	0,223
Valor de p [e]	1,81	1,60

y = ax + b, em que y é a área do pico do analito, a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear e x é a concentração da solução medida em µg mL^{-1}; [b] *r* = coeficiente de correlação linear; [c]RSD% = desvio padrão relativo da inclinação da curva de calibração. [d] F < 2.96; [e] p > 0.05.

4.4.3. Precisão e Exatidão

A precisão de um método analítico indica o grau de dispersão entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições pré-definidas. Já a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). Para avaliar a precisão e exatidão foram analisadas as concentrações de 500, 1500 e 2500 ng mL^{-1}. Os valores referentes à precisão intra e inter-dia das análises estão expostos na **Tabela 6**

Tabela 6. Precisão e exatidão para o método de TRM em plasma.

	(-)-(1*S*,2*S*)-TRM			(+)-(1*R*,2*R*)-TRM		
Concentração / ng mL^{-1}	**500**	**1500**	**2500**	**500**	**1500**	**2500**
Intra-dia (n^a = 6)						
Concentração real	532,13	1536,98	2432,96	559,03	1474,94	2505,04
Precisão (RSD, %) [b]	2,172	2,497	1,478	5,124	3,415	2,125
Exatidão (RE, %) [c]	6,427	2,465	-2,682	11,806	-1,670	0,202
Inter-dia (n^a = 3)						
Concentração real	555,222	1428,84	2528,97	567,59	1403,98	2546,66
Precisão (RSD, %) [b]	3,065	3,302	1,383	2,193	1,362	1,480
Exatidão (RE, %) [c]	11,04	-4,744	1,159	13,528	-6,401	1,867

[a] n = número de repetições das análises; [b] RSD% = desvio padrão relativo em porcentagem; [c] RE% = erro relativo

É possível observar que nas concentrações estudadas o valor de RSD% e RE% estão dentro das recomendações descritas na literatura para amostras complexas, ou seja, até 15%.

4.4.4. LOD e LOQ

O LOD e o LOQ foram estabelecidos experimentalmente, de forma que o LOD foi a menor concentração que apresentou um sinal analítico discriminatório, incapaz de se quantificar. O LOQ foi a menor concentração que apresentou sinal analítico quantificável com precisão e exatidão aceitáveis e valores de RSD abaixo de 20%. A **Tabela 7** mostra os limites em ng mL^{-1} reproduzidos em seis replicatas. Para tanto, foi necessário retornar ao preparo de amostra de forma a utilizar 1000 µL de amostra e não mais 500 µL. Com essa modificação não houve mudanças na recuperação. Esse ajuste facilita a diminuição do LOQ visto que ao possuir maior massa, oferece um perfil eletroforético mais definido no sistema, com maior integração de área, menor RSD, facilitando a diminuição do LOQ o que é interessante para aplicação do método.

Tabela 7. LOD e LOQ para o método de TRM em plasma.

	(-)-(1*S*,2*S*)-TRM	**(+)-(1*R*,2*R*)-TRM**
LOD / ng mL^{-1}	75	75
LOQ / ng mL^{-1}	100	100
RSD, %	3,7	4,8

4.4.5. Estabilidade

Vários artigos afirmam que o TRM é estável nas condições estudadas como mostra a **Tabela 8**. Por exemplo, Haage et al. (2016) concluíram que os enantiômeros são estáveis em extratos deixados no amostrador automático a 10 °C por 72 h, até 48 h a temperatura ambiente, 3 ciclos de congelamento-descongelamento e até 21 dias em 4 °C e pelo menos 12 meses a -80 °C, sendo que o teste de 18 e 24 meses não foi concluído.

Na aplicação deste trabalho, as amostras foram congeladas a -20°C por 4 meses e após esse período conseguiu-se identificar o fármaco na mesma comprovando assim sua estabilidade em congelamento.

Tabela 8. Estabilidade do TRM em plasma.

Temperatura ambiente	Pós-processamento (Soluções de injeção)	Ciclos de congelamento e descongelamento	Armazenamento a longo prazo	Referência
6 h	48 h a 4 °C	3 ciclos	22 semanas a -70°C	GU, FAWCET 2005
-	48 h a 15 °C	3 ciclos	4 semanas a -20°C	CURTICAPEA et al, 2008
6 h	12 h a 12 °C	3 ciclos	11 meses a -20°C	DE MORAES et al, 2012
8 h	-	3 ciclos	1 semana a -20°C	YILMAZ; ERDEM, 2015
-	24 h a 4 °C	-	1 mês a -80°C	TANAKA et al, 2016
24 e 48h	24, 48 h a 10°C	3 ciclos	3 semanas a 4°C 12 meses a -80°C	HAAGE et al, 2016
4h	24 h a 4 °C	3 ciclos	15 dias -20°C	ALMALKI et al, 2021

5. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

A aplicação do método ocorreu por meio da análise em matriz biológica de plasma de um voluntário no intervalo de 1, 2 h após a administração do fármaco com o intuito de comprovar que o método desenvolvido é capaz de identificar e quantificar a presença de TRM, por isso, as análises foram feitas sem adição de TRM. Foi possível detectar e quantificar o fármaco no tempo de 1 h e 2 h.

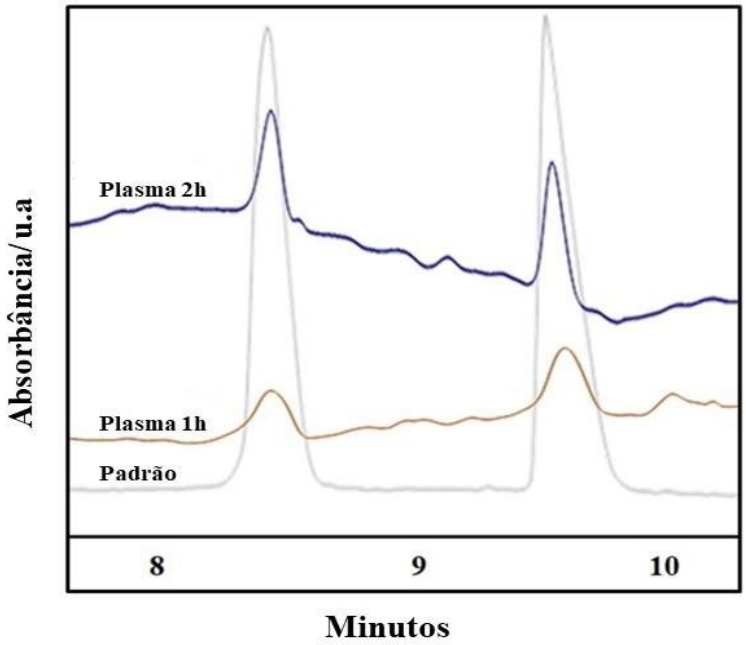


Figura 29. Eletroferograma da aplicação em amostras de plasma 1h e 2h após a medicação frente ao padrão de TRM 50 µg mL^{-1}. Condições eletroforéticas: BGE fosfato 25 mM, 0,01g de S-β-CD, pH 9,05, injeção hidrodinâmica de 40mbar durante 4 s, voltagem de 10 Kv, temperatura de 25 °C e capilar de sílica fundida com comprimento efetivo de 50 cm. **Fonte:** Próprio autor.

A partir da **Figura 29** é possível observar o eletroferograma obtido a partir da amostra real de plasma de um voluntário saudável. Foi encontrado concentração de 132,18 ng mL^{-1} para o primeiro enantiômero e de 163,93 ng mL^{-1} para o segundo na primeira hora após a administração do TRM. Na segunda hora observou-se um aumento nessa concentração, alcançando 204,65 ng mL^{-1} com RSD ± 0,61 para (-)-(1*S*,2*S*)-TRM e de 216,89 ng mL^{-1} RSD ± 0,089 para (+)-(1*R*,2*R*)-TRM, fato que é esperado visto a concentração plasmática em níveis terapêuticos tem um intervalo entre 100 e 300 ng mL^{-1} (ARDAKANI, ROUINI 2007).

6. COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DA LITERATURA

Foi feito um levantamento bibliográfico e selecionados alguns trabalhos que tiveram o intuito de determinar o TRM em amostras biológicas. A **Tabela 9** apresenta as metodologias analíticas utilizadas. É possível perceber que na literatura existem muitos métodos reportando a extração de TRM, porém a grande maioria utiliza as técnicas de espectrometria de massas e cromatografia. Já o método proposto neste trabalho é simples, fácil de executar sendo uma alternativa eficaz para a determinação de TRM em plasma humano.

Tabela 9. Revisão bibliográfica sobre as metodologias analíticas para determinação de TRM em amostras biológicas.

Técnica instrumental/ método de detecção	Técnica de preparo de amostra/ material	Matriz	Condições do preparo	LOD / LOQ	Faixa linear	Referência
GC-MS	HS-SPME PDMS/PDV	Plasma humano	Extração do com fibra PDMS/DVB; 0,5 mL de amostra de plasma diluído com 0,5 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1}; temperatura de extração a 100 °C com agitação a uma taxa de 2000 rpm por 30 min; temperatura de dessorção a 250 ◦C por 2 min.	LOD 0,2 ng mL^{-1}	1-400 ng mL^{-1}	SHA et al, 2005
UV-Vis	MSPE/ Fe_3O_4/GO-COOH	Plasma humano Águas residuais hospitalares e de rios	50 mg de nanocompósito, pH 5, tempo de extração 20 min, 20 mL de volume de amostra e eluindo com 2 mL metanol: amônio (0,2M) em 4 min.	LOD 0,025 mg mL^{-1}	0,05-3 mg L^{-1}	TAGHIZADE et al, 2020
LC-MS	Coluna Diamonsil C18	Plasma humano Urina	Separado em uma coluna C18 com acetato de amônio 5 mmol L^{-1}: metanol (50: 50, *v/v*), pH ajustado com NaOH, taxa de vazão de 0,8 mL min^{-1}	-	Plasma 1-400 ng mL^{-1} Urina 0,01- 16 ng mL^{-1}	PING et al, 2009
HPLC-UV	SPE MIP	Plasma Urina	60 mg do polímero em cartuchos SPE de 1mL; Condicionamento: 1 mL de metanol, 1 mL de água e 1 mL de fosfato de amônio 20 mmol L^{-1} pH 3. Extração: 5 mL da amostra aquosa 50 µg L^{-1} pH 8. Lavagem: 1 mL de acetonitrila: acetona (1: 3, v/v) e 1 mL de diclorometano. Aplicação de vácuo para secagem do cartucho. Eluição: 3 × 1 mL metanol: ácido acético (10: 1, v/v)	Plasma LOD: 3 µg L^{-1} LOQ: 8,5 µg L^{-1} Urina LOD: 1,2µg L^{-1} LOQ: 3,5 µg L^{-1}	Plasma 5-350 µg L^{-1} Urina 2- 300 µg L^{-1}	MEHRAN, 2010

LC-MS/MS	SPE Estratos-X	Plasma humano	Cartuchos pré-condicionados com 1 mL de metanol e 1 mL de água Milli-Q. Extração com 500 µL de amostra; o cartucho foi lavado com 1 mL 0,1% de ácido fórmico, 1 mL n-hexane e 1 mL de metanol: água (5:95 v/v); secagem dos cartuchos por 3 min e eluição com 1 mL de solução de metanol amônia de 2%.	LOQ 1 ng mL^{-1}	1-500 ng mL^{-1}	NAGARAJU, 2018
GC-MS	MSPE/ Fe_3O_4@grafeno	Urina Plasma Cabelo Águas subterrâneas	20 mg do material em contato com 15 mL de amostra pH 2,2. Agitação de 1600 rpm por 30 min, separação das fases com ímã. Para eluição 230 µL de metanol agitado a 1600 rpm por 7,8 min.	LOD 0,088 ng mL^{-1} LOQ 0,29 ng mL^{-1}	0,09 a 150 ng mL^{-1}	SEFATY et al, 2020
CE-UV	-	Comprimidos Plasma Urina humana	Comprimidos foram pulverizados e preparo uma solução de 20µg mL^{-1} Diluição das amostras biológicas	LOQ 7 µg mL^{-1} LOD 2 µg mL^{-1}	-	NAGHDI; FAKHARI, 2018
HPLC-UV	SPE cartucho C_{18}	Plasma humano	Condicionamento: 1 mL de metanol seguido de 1 mL de água; Extração: 1 mL de plasma enriquecido; Lavagem: 3 × com 1 mL de água seguido 250 µL de acetonitrila: acetato de etila (60: 40, v/v); Eluição: 4 × 250 µL acetonitrila: acetato de etila (60: 40, v/v) com adição de trietilamina 1%.	LOQ 50 ng mL^{-1}	50 a 3500 ng mL^{-1}	GAN; ISMAIL, 2001
CE-UV	100mg C_{18}	Urina	Condicionamento: 4mL de metanol, 2 mL de água destilada pH 9.8 e 1mL de tampão amoniacal pH 9,8; Extração: 1mL de urina; Lavagem: 1 mL de tampão amoniacal pH 9 seguido de 2 mL de água pH 9,8; secagem do sorvente por 10 minutos Eluição: 1mL de metanol	LOQ 0,245 µg mL^{-1}	0.245 a 49.681 µg mL^{-1}	BURKHARD; GOTTFRIED, 1999

GC: cromatografia gasosa; HS-SPME: microextração em fase sólida do *headspace*; MS: espectrometria de massa; LC MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

7. CONCLUSÕES

Foram obtidas duas condições, uma não enantiosseletiva e outra enantiosseletiva, para a determinação de TRM em plasma por CE. Além disso, foi sintetizado com sucesso um novo adsorvente seletivo e de acesso restrito para o TRM denominado RA-MMIP-HM-BSA, que foi empregado de maneira eficaz na MSPE. Os materiais adsorventes foram apropriadamente caracterizados por diversas técnicas. Um método miniaturizado (20 mg de adsorvente) de preparo de amostra por MSPE foi otimizado obtendo recuperações de TRM reprodutíveis e próximas a 100%, possibilitando o desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação de TRM em amostras reais de plasma humano. Além disso, esse novo método é uma alternativa eficaz, ambientalmente correta pois utiliza baixíssimo consumo de solvente e gera pouco resíduo. Foi obtida uma linearidade no intervalo de 100-3000 ng mL^{-1} para o método analítico, apresentando LOQ de 100 ng mL^{-1} para ambos os enantiômeros, além de ser seletivo, preciso e exato. Fatores que possibilitam sua determinação em amostras reais de paciente em tratamento e que fizeram abuso com TRM, e também para identificação em *doping* e investigações forenses.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR JÚNIOR. C. A. S. *et al*. Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um sorvente de menor retenção. **Química Nova**. v. 41, n. 6, p. 641-647, 2018.

ALMALKI, A. H. *et al*. ESI–LC–MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring of Binary Mixture of Pregabalin and Tramadol: Human Plasma and Urine Applications. **Separations**, v. 8, n. 21, 2021.

ARDAKANI, Y. H.; ROUINI, M. R. Improved liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tramadol and its three main metabolites in human plasma, urine and saliva. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 5, p. 1168–1173, 2007.

BAUME, N. *et al*. Antidoping programme and biological monitoring before and during the 2014 FIFA World Cup Brazil. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 9, p. 614–622, 2015.

BALTAZAR-MARTINS, J. G. *et al*. Infographic. Tramadol: should it be banned in athletes while competing, particularly in road cycling? **British Journal of Sports Medicine**, v. 54, n. 2, p. 20–121, 2019.

BALTAZAR-MARTINS, J. G. *et al*. Prevalence of Tramadol Findings in Urine Samples Obtained in Competition. **Drug Test. Anal,** v. 11, p. 631–634, 2019.

BARBOSA, Adriano F. *et al*. Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, v. 131, p. 213–220, 2015.

BERNARDO-BERMEJO, S. *et al*. Chiral Capillary Electrophoresis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.124, n. 75, 2020.

BONATO, P. S.; JABOR. V. A. P. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Quimica nova,** v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BORDIN, D. C. M. *et al*. Amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2015.

BORGES, K. B.; PEREIRA. A. C, MANO.V. In: BORGES. K. B.; FIGUEIREDO. E. C, QUEIROZ. M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. LTC, 2015, v. 1. Cap. 1, p. 2-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: dez. 2021.

BURKHARD, K. GOTTFRIED, B. Achiral and chiral determination of tramadol and its metabolites in urine by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, n.3, p.555–563, 1999.

COD – Crystallography Open Database. Disponível em: http://nanocrystallography.net/. *Acesso em: set. 2022.*

CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1814–1819, 2008.

CUNHA, R. R. **Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de paracetamol e outros fármacos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C^{4}D)**. 2017. Tese (doutorado em Química). Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. 2017.

CHAUHAN, V. *et al.* Current analytical trends of abuse of tramadol and its forensic significance. **Toxicol. Environ. Health Sci**, v. 14, p. 111–129, 2022.

CHEONG, W. J.; YANG, S. H.; ALI, F. Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 3, p. 609–628, 2012.

CURTICAPEAN, A. *et al.* Optimized HPLC method for tramadol and O-desmethyl tramadol determination in human plasma. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 6, p. 1304–1312, 2008.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura aplicações e preparação de amostras**. EDIPUCRS, Porto Alegre, p.60, 2007.

DUARTE, L. C. *et al*. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.

DE FARIA, H. D. *et al*. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta,** v. 959, p.43–65, 2017.

DE MORAES, N. V. *et al*. Enantioselective analysis of unbound tramadol, O-desmethyltramadol and N-desmethyltramadol in plasma by ultrafiltration and LC–MS/MS: Application to clinical pharmacokinetics**. Journal of Chromatography B**, v. 880, p.140–147, 2012.

DE OLIVEIRA, A. R. M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos empregando eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 231-247, 2011.

DE OLIVEIRA, H. L. *et al*. Novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymer for selective magnetic solid-phase extraction of estrogens from human urine. **Microchemical Journal**, v. 149, n. 104043, 2019.

DEOLIN, M. H. S. *et al*. Obtenção do ponto de carga zero de materiais adsorventes. *In*: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR. VIII., 2013, Maringá-Paraná. **Anais eletrônico**. p. 4, 2013.

DINALI, L. A. F. *et al*. Efficient development of a magnetic molecularly imprinted polymer for selective determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in milk. **Microchemical Journal**, v. 154, n. 104648, 2020.

DUVALL, Abigail. Tramadol. **Journal of exotic pet medicine**, v.26, n.1, p.74-77, 2017.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.

FONSECA, M. C. **Polímeros molecularmente impressos e análise enantiosseletiva de tramadol por eletroforese capilar – uma abordagem teórica e experimental.** 93f. Dissertação. (Programa de pós graduação Multicêntrico em Química). Universidade Federal de São João Del Rei, 2016.

FONSECA. C, M. *et al*. Computational contribution to the electrophoretic enantiomer separation mechanism and migration order using modified β-cyclodextrins. **Electrophoresis**, v. 38, n. 15, p.1860–1868, 2017.

GROND, S.; SABLOTZKI, A. Clinical Pharmacology of Tramadol. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 13, p. 879–923, 2004.

GU, Y.; FAWCETT, J. Improved HPLC method for the simultaneous determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 821, n. 2, p. 240–243, 2005.

HAAGE, P. *et al*. Quantificação dos enantiômeros do tramadol e seus três metabólitos principais no sangue total humano usando LC – MS / MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 119, p.1-9, 2016.

HOLGADO, D. *et al*. Analgesics and Sport Performance: Beyond the Pain-Modulating Effects. **PM&R**, v. 10, n.1, p.72–82, 2017.

HOLLER, F. J.; SKOOG. D. A.; CROUCH. S. T. Métodos térmicos. In: **Princípios de Análise instrumental**. Bookman, 6º ed. Cap. 31, p. 908-911, 2009.

HOLLER. F. J.; SKOOG. D. A.; CROUCH. S. T. Eletroforese capilar, eletrocromatografia e fracionamento por campo e fluxo. In: **Princípios de Análise instrumental**. Bookman, 6º ed. Cap.30, p. 881-903. 2009.

HU, T. *et al*. Recent advances and applications of molecularly imprinted polymers in solid–phase extraction for real sample analysis. **Journal of Separation Science**, 2020. doi:10.1002/jssc.202000832.

HUANG, S. *et al*. Synthesis and application of magnetic molecularly imprinted polymers in sample preparation. **Anal Bional Chem**, v. 410, p. 3991-4014, 2018.

JUAN-GARCIA, A.; PICÓ, Y.; FONTE, G. Capillary electrophoresis for analyzing pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction. **Journal of chromatography A.** v. 1073, p. 229-236, 2005.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232–244, 2003.

LEWIS, K. S.; HAN, N. H. Tramadol: A new centrally acting analgesic. **Am J Health-Syst Pharm**, v.54, p. 643-652, 1997.

LU, Z. *et al*. Thermal, mechanical, and surface properties of polyvinyl alcohol (PVA) polymer modified cementitious composites for sustainable development. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, p. 46177-46185, 2017.

MADRAKIAN, T. *et al.* Superparamagnetic surface molecularly imprinted nanoparticles for sensitive solid-phase extraction of tramadol from urine samples. **Talanta**, v.105, p. 255–261, 2013.

MALISKA, A. M. Microscopia eletrônica de varredura. Laboratório de caracterização microestrutural e análise de imagem. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf>.

MEHRAN, J. *et al*. Solid-phase extraction of tramadol from plasma and urine samples using a novel water-compatible molecularly imprinted polymer. **Journal of Chromatography B,** v. 878, n. 20, p. 1700-1706, 2010.

NACANO, L. R.; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, R. T. Selective Sorbent Enrichment of Nickel Ions from Aqueous Solutions using a Hierarchically Hybrid Organic-Inorganic Polymer Based on Double Imprinting Concept. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 419-430, 2010.

NAGARAJU, P. *et al*. LC-MS/MS Quantification of Tramadol and Gabapentin Utilizing Solid Phase Extraction. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, p. 1–9, 2018.

NAGHDI, E; FAKHARI, A. R. Simultaneous chiral separation of tramadol and methadone in tablets, human urine, and plasma by capillary electrophoresis using maltodextrin as the chiral selector. **Chirality**, p. 1–8, 2018.

OLIVEIRA, G. C. **Plasma humano: componentes e derivados conservação e utilização terapêutica em ambiente hospitalar.** 100f. Dissertação. (mestrado integrado em ciências farmacêuticas). Instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz, 2016.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 5ª edição norte-americana. Cengage Learning, p. 731, 2015.

PING, L. *et al.* Guo. Development and validation of a sensitive LC-MS method for the determination of tramadol in human plasma and urine. **Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokine,** v. 34, n. 3-4, p.185–192, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese Capilar, **Chemkeys**, n.8, 2001.

QUEIROZ, A.; KUROSAWA, R.; BARRETO, R. **Difração de Raios-X**. Laboratório Avançado de Física Computacional; Universidade de São Paulo. Disponível em: https://www.ifsc.usp.br/~lavfis/images/BDApostilas/ApRaios-X/Manual_RX_v2.pdf Acesso em: 07 maio. 2022.

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

SANTOS, C. R. **Emprego de nanotubos de carbono de acesso restrito na extração direta de fármacos anticonvulsivantes seguido de análise por HPLC**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2016.

SARKANY, A. *et al*. Capillary Electrophoresis Methods for the Determination of Tramadol: A Review. **Pharmaceutical Sciences**, v.25, n. 4, p. 278-286, 2019.

SEFATY, B. *et al*. Determination of Tramadol and Fluoxetine in Biological and Water Samples by Magnetic Dispersive Solid-Phase Microextraction (MDSPME) with Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). **Analytical Letters**, p. 1–19, 2020.

SHA, Y. F.; SHEN, S.; DUAN, G. L. Rapid determination of tramadol in human plasma by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 1, p.143–147, 2005.

SHACKELFORD, J. F. **Ciência dos Materiais**. Pearson Prentice Hall. 6. ed. São Paulo, p.576, 2008.

SILVA, A. K. *et al*. Extração em fase sólida magnética (MSPE): Fundamentos e aplicações. **Scientia Choromatographica**, v. 8, n.4, p. 239-256, 2016.

SILVA, J. A. F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1. p. 56-64, 2003.

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

SILVA, R. C. **Síntese de polímeros impressos para aplicação em técnicas de preparo de amostras e desenvolvimento analítico**. 2017. Tese. (Doutor em ciências). Universidade Federal de São João del-Rei. 2017.

TAGHIZADE, M. *et al*. Simultaneous spectrophotometric determination of the residual of ciprofloxacin, famotidine, and tramadol using magnetic solid phase extraction coupled with multivariate calibration methods. **Microchemical Journal**, v. 105627, 2020.

TANAKA, H. *et al*. Validated determination method of tramadol and its desmethylates in human plasma using an isocratic LC-MS/MS and its clinical application to patients with cancer pain or non-cancer pain. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences**, v. 2, n. 1, 2016.

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

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação de Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TELES, V. C; ANDREANI, L; VALADARES, L. F. Uso de Microscopia de Luz e Eletrônica como Técnicas de Análise Morfológica. **Circular Técnica**, v 15, 2017.

Tramadol-Proibido no ciclismo. Antidoping Comitê olímpico do Brasil. Disponível em: https://www.cob.org.br/pt/cob/antidoping. Acesso em: 10/10/22.

Union Cycliste Internationale (UCI), Proibição do tramadol: tudo o que você precisa saber. 19/01/19. Disponível em: https://www.uci.org/inside-uci/press-releases/tramadol-ban-all-you-need-to-know Acesso em: 15/02/20.

VASAPOLLO, G. *et al*. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5908–5945, 2011.

ZHANG, Q. *et al*. Functional materials in chiral capillary electrophoresis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 445, n. 214108, 2021.

WEN, Y. Recent advances in solid-phase extraction techniques with nanomaterials. **Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry**, p.57–73, 2020.

WILLIAMS, D. B.; BARRY CARTER, C. **Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science**, 2°ed. Springer, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-76501-3.

YILMAZ, B.; ERDEM, A. F. Simultaneous Determination of Tramadol and its Metabolite in Human Plasma by GC/MS**. Journal of AOAC International**, v. 98, n. 1, p. 56–61, 2015.