

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ELIZÂNGELA MARIA DE CASTILHO ALVES MORAIS

**ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO A PARTIR DE
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MPS-MS) PARA ANÁLISE DE ANTI-
HIPERTENSIVOS DE PLASMA HUMANO**

ALFENAS/MG

2024

ELIZÂNGELA MARIA DE CASTILHO ALVES MORAIS

**ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO A PARTIR DE
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MPS-MS) PARA ANÁLISE DE ANTI-
HIPERTENSIVOS DE PLASMA HUMANO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Morais, Elizângela Maria de Castilho Alves .

Espectrometria de massas com ionização a partir de partículas magnéticas (MPS-MS) para análise de anti-hipertensivos de plasma humano / Elizângela Maria de Castilho Alves Moraes. - Alfenas, MG, 2024.

116 f. : il. -

Orientador(a): Eduardo Costa de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.


Bibliografia.

1. Espectrometria de massas com ionização a partir de partículas magnéticas. 2. Ionização ambiente. 3. Espectrometria de massas. 4. Polímeros de impressão molecular. 5. Extração em fase sólida dispersiva. I. Figueiredo, Eduardo Costa de, orient. II. Título.

**ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO A PARTIR DE
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MPS-MS) PARA ANÁLISE DE ANTI-
HIPERTENSIVOS DE PLASMA HUMANO**

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

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO COSTA DE FIGUEIREDO**
Data: 15/05/2024 19:08:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof. Dr. João Paulo Martins
Instituto Federal do Sul de Minas

Assinatura:

Prof.^a Dr.^a Rafaela Figueiredo Rodrigues
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Dedico este trabalho ao meu orientador,
amigos e familiares que me acompanharam
nesta caminhada

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os educadores que me inspiraram a passar por mais esta fase. Ao meu orientador que viveu junto comigo todos os desafios que a pós-graduação proporciona. Aos colegas do laboratório LATF que me acolheram quando cheguei, me acompanharam durante esta trajetória e pela construção e compartilhamento de conhecimento trocados durante este tempo. Aos meus familiares e amigos por todo carinho e dedicação e as demais pessoas que de alguma maneira ajudaram na realização deste trabalho. Em especial aos meus pais que estiveram do meu lado, quando eu mais precisei durante o mestrado. Aos meus filhos, minha gratidão eterna, amo vocês.

Agradeço à Financiamento CAPES pelo financiamento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."

(Marie Curie – 1867/1934)

RESUMO

A técnica de espectrometria de massas com ionização a partir de partículas magnéticas (MPS-MS, do inglês *magnetic particles spray mass spectrometry*), recentemente desenvolvida em nosso grupo de pesquisa, foi utilizada para a análise de fármacos anti-hipertensivos em amostras de plasma humano. Objetivou-se também caracterizar o M-MIP sintetizado. Para isso, foi aplicada a técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) dos analitos, utilizando partículas magnéticas de polímero com impressão molecular (M-MIP). As partículas foram acopladas a uma sonda metálica, posicionada na entrada do espectrômetro de massa. Em seguida, um solvente foi adicionado e formou-se um cone de Taylor ao redor das partículas, devido à alta tensão aplicada. Assim, os analitos foram eficientemente desorvidos/ionizados e submetidos à análise em um espectrômetro de massa do tipo triplo quadruplo. O M-MIP foi produzido utilizando oxprenolol como modelo de molécula, sendo em seguida caracterizado e empregado para avaliar o desempenho do MPS-MS na análise dos beta-bloqueadores atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol, nadolol e pindolol em plasma humano. O M-MIP apresentou seletividade satisfatória para os betabloqueadores em comparação com moléculas não-análogas, além de exibir uma superfície heterogênea na qual ocorre, de acordo com estudos de isoterma, um processo de adsorção em monocamadas. A quimissorção se mostrou a interação predominante entre o M-MIP e os analitos, conforme indicado pelos experimentos cinéticos de adsorção. As curvas analíticas resultaram em linearidades (r^2 superiores a 0,98) e os limites de quantificação para todos os analitos foram de $3 \mu\text{g L}^{-1}$. A precisão (expressa como desvio-padrão relativo) e a exatidão (expressa como erro relativo) variaram entre 3,95 e 21,20%, e entre -17,05 e 18,93%, respectivamente. A técnica MPS-MS demonstrou ser extremamente simples, sensível e vantajosa em comparação com as abordagens convencionais. As análises são rápidas, não requerendo separação cromatográfica e com um mínimo de supressão iônica. Os volumes de amostra, solvente e massa de sorvente utilizada na MPS-MS foram significativamente reduzidos, em total conformidade com os princípios da química verde. A MPS-MS apresenta uma nova perspectiva na interação entre a preparação de amostras e a espectrometria de massa com ionização ambiente, com potencial para uso com outros sorventes e diferentes amostras e analitos.

Palavras-chave: Espectrometria de massas com ionização a partir de partículas magnéticas; ionização ambiente; espectrometria de massas; polímeros de impressão molecular; extração em fase sólida dispersiva; sorvente magnético.

ABSTRACT

Recently developed in our research group, magnetic particle spray mass spectrometry (MPS-MS) was used to analyze antihypertensive drugs in human plasma samples. The analyte's dispersive solid phase extraction (d-SPE) technique was applied using magnetic molecularly imprinted polymer particles (M-MIP). The particles were attached to a metallic probe positioned at the entrance of the mass spectrometer. Then, a solvent was added, and a Taylor cone formed around the particles due to the high voltage applied. Thus, the analytes were efficiently desorbed/ionized and subjected to analysis in a triple quadrupole mass spectrometer. M-MIP was produced using oxprenolol as a model molecule and was then characterized and used to evaluate the performance of MPS-MS in the analysis of the beta-blocker's atenolol, metoprolol, labetalol, propranolol, nadolol and pindolol in human plasma. M-MIP showed satisfactory selectivity for beta-blockers in comparison with non-analogous molecules, in addition to exhibiting a heterogeneous surface on which, according to isotherm studies, a monolayer adsorption process occurs. Chemisorption was the predominant interaction between M-MIP and analytes, as indicated by adsorption kinetic experiments. The analytical curves resulted in linearities (r^2 greater than 0.98), and the limits of quantification for all analytes were three $\mu\text{g L}^{-1}$. Precision (expressed as relative standard deviation) and accuracy (expressed as relative error) varied between 3.95 and 21.20% and between -17.05 and 18.93%, respectively. The MPS-MS technique has proven to be extremely simple, sensitive, and advantageous compared to conventional approaches. Analyzes are quick, do not require chromatographic separation, and have a minimum of ion suppression. The sample volumes, solvent, and sorbent mass used in MPS-MS were significantly reduced, in full compliance with the principles of green chemistry. MPS-MS presents a new perspective on the interaction between sample preparation and ambient ionization mass spectrometry, with potential for use with other sorbents and different samples and analytes.

Keywords: Magnetic particle spray mass spectrometry, ambient ionization; mass spectrometry; molecular impression polymers; dispersive solid phase extraction; magnetic sorbent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de ionização por spray sônico ambiente fácil (EASI), ionização por spray sônico ambiente Venturi-Easy (V-EASI) e Spartan-easy ionização por spray sônico ambiente (S-EASI)	25
Figura 2 -	Diagrama esquemático da ionização por eletropulverização extrativa mostrando sprays ionizantes e de amostra	26
Figura 3 -	Ionização de plasma de baixa temperatura- LTP	27
Figura 4 -	O diagrama esquemático da fonte de íons DBDI	28
Figura 5 -	Diagrama esquemático da fonte de ionização química da pressão atmosférica de dessorção de superfície	29
Figura 6 -	Esquema da fonte de ionização por spray de papel	30
Figura 7 -	(A) Extração dispersiva em fase sólida dos analitos de uma amostra de plasma usando M-RACNTs. No primeiro tubo, as partículas se dispersam na amostra. No segundo tubo, as partículas são atraídas para o fundo usando um ímã. No terceiro tubo, as partículas são capturadas na ponta de uma sonda magnética. (B) Dessorção/ionização e análise dos analitos por espectrometria de massa através da pulverização de partículas magnéticas (MPS-MS)	33
Figura 8 -	Uma representação esquemática de um processo de impressão molecular	35
Figura 9 -	Etapas de preparo do M-MIP magnético	36
Figura 10 -	Esquema de como funciona o RAM	40
Figura 11 -	Estrutura molecular de betabloqueadores comuns que são proibidos em alguns esportes pela Agência Mundial Antidoping (WADA)	41
Figura 12 -	Método de sinalização	50
Figura 13 -	Ilustração da extração em fase sólida dispersa	58
Figura 14 -	Esquema de formação de M-MIP usando a molécula molde	62

Figura 15 - Na etapa 1 está representado a reação que ocorre entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído. Em 2 está representado a reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula de albumina, permitindo assim a formação da rede de BSA em volta do RAMIP. Por fim, em 3 está representado a conversão das iminas em aminas com a adição do borohidreto	62
Figura 16 - M-MIPs sendo atraídos pelo imã durante a etapa de lavagem	63
Figura 17 - Foto contemplando cada etapa de sintetização das nanopartículas M-MIP usada para preparo de amostras deste trabalho	64
Figura 18 - Gráficos de área x meio de extração para os betabloqueadores e o desempenho dos materiais quanto a sua capacidade de adsorção e dessorção de analitos ...	66
Figura 19 - O perfil dos Cromatogramas obtidos por LC-MS-MS fonte ESI, sem coluna, com um misto de padrões nas concentrações de 500 µg.L-1, M-MIP como sorvente e meio de extração básico (Intensidade x tempo em minutos)	68
Figura 20 - Espectros de infravermelho	70
Figura 21 - A imagem SEM mostrou nanopartículas de magnetite (Fe ₃ O ₄) em várias sínteses	73
Figura 22 - Imagens SEM do Fe ₃ O ₄ (a-i), em diferentes ampliações, mostrando	73
Figura 23 - Imagens SEM do F ₃ O ₄ @SiO ₂ -TEOS em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas	74
Figura 24 - Imagens SEM do F ₃ O ₄ @SiO ₂ -TEOS-MPS, em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas	75
Figura 25 - Imagens SEM do M-MIP, em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas	76

Figura 26 -	Imagens SEM do M-NIP, em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas	77
Figura 27 -	Modelos teóricos de pseudoprimeira ordem, pseudosegunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.....	80
Figura 28 -	Modelo de difusão intra-partícula	81
Figura 29 -	Modelos teóricos de Langmuir, Freundlich e Sips, tratados pelo aplicativo OriginLab®	83
Figura 30 -	Influência do tipo de solvente na resposta analítica. Concentração de misto de padrão de 50 ug.L-1, ângulo, α 60 °, vazão 0,1 mL/min por MPS-MS	87
Figura 31 -	Influência da vazão de solvente na resposta analítica. Concentração de misto de padrão de 50 ug.L-1, ângulo, α 60 °, solvente metanol acidificado com ácido fórmico na proporção de (99:1, v/v), por MPS-MS	89
Figura 32 -	Curva analítica de padrões dos betabloqueadores com P. I. em água	92
Figura 33 -	Cromatogramas de um branco com P.I. (Intensidade x tempo em minutos)	94
Figura 34 -	Cromatogramas dos betabloqueadores do ponto 500 μ g L-1 da curva analítica em água, com ajuste do angulo da fonte para α 90 ° e alteração do método do MS para o protocolo 2	95
Figura 35 -	Espectro de massas dos betabloqueadores do ponto 500 μ g L-1 da curva analítica em água, com ajuste do angulo da fonte para α 90 ° e alteração do método do MS para o protocolo 2 (Abundância relativa x Razão massa/carga (m/z))	96
Figura 36 -	Gráficos Área X vazão de solvente para a MPS-MS com angulo α de 90 ° e método do MS referentes ao protocolo 3.....	98
Figura 37 -	Gráficos Área X voltagem para a MPS-MS com angulo α de 90 ° e método do MS referentes ao protocolo 3	100
Figura 38 -	Curva analítica de padrões dos betabloqueadores com P. I. em plasma. Gráficos eixo x= concentração e eixo y= área relativa	103

Figura 39 - Sinais transientes obtidos para análises de atenolol, atenolol D7, labetalol, metoprolol, pindolol, nadolol e propranolol num conjunto de amostras de plasma fortificadas a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a). b) Espectro de massa com todos os íons de monitorização 106

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Propriedades Físico-Químicas dos betabloqueadores.....	42
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros de estrutura de poros de M-NIP, M-MIP, M-RANIP e M-RAMIP	71
Tabela 2 -	Íon precursor, energia de colisão e íons produtos referentes à fragmentação de cada betabloqueador	78
Tabela 3 -	Estudo cinético contemplando modelo cinético, equação, parâmetros e valores obtidos	79
Tabela 4 -	Estudo de isotérmica contemplando modelo de isotérmica, equação, parâmetros e valores obtidos	82
Tabela 5 -	A seletividade dos polímeros M-MIP e M-NIP foi testada com soluções binárias contendo análogos estruturais e fármacos de diferentes estruturas	85
Tabela 6 -	Precisão e exatidão do método (Protocolo 2) dos betabloqueadores em água por MPS-MS	91
Tabela 7 -	Figuras de méritos obtidas com amostras de plasma fortificado analisadas por MPS-MS	105
Tabela 8 -	Aplicação do método validado em amostras reais por MPS-MS	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCVA	Ácido 4,4' –azobis (4-cianoaléxico)
AIMS	Espectrometria de massa de ionização de ambiente
ACN	Acetonitrila
ATE	Atenolol
BSA	Albumina sérica bovina
DAPCI	<i>Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization</i> (dessorção de superfície por ionização química à pressão atmosférica)
DART	<i>Direct analysis in real time</i> (análise direta em tempo real)
DBDI	<i>Dielectric barrier discharge ionization</i> (ionização por descarga de barreira dielétrica)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz)
DESI	<i>Desorption electrospray ionization</i> (ionização por eletrospray de dessorção)
D-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
EASI	<i>Easy ambient sonic-spray ionization</i> (ionização ambiente por spray sônico)
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
EESI	<i>Extractive electrospray ionization</i> (ionização por eletro pulverização extrativa)
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
LAB	Labetalol
LTP	<i>Low-temperature plasma</i> (ionização de plasma de baixa temperatura)
MAA	Ácido metacrílico
MEOH	Metanol
MET	Metoprolol
MIPs	Polímeros de impressão molecular
M-MIPs	Polímeros de impressão molecular magnéticos
MS	<i>mass spectrometry</i>
MPS–3	(trimetoxisilil) propil metacrilato

MPS-MS	Magnetic particles spray - mass spectrometry (spray a partir de partículas magnéticas acoplado ao espectrômetro de massas)
m/z	relação massa/carga
NAD	Nadolol
OXP	Oxprenolol
PI	Padrão interno
PIN	Pindolol
PROP	Propranolol

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Microgramas
μL	Microlitros
%	Porcentagem
Min	Minuto
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
r^2	Coefficiente de determinação
kV	kilovolts
A	angstrom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	OBJETIVOS.....	23
1.1.1	Objetivo Geral.....	23
1.1.2	Objetivos Específicos.....	23
2	DESENVOLVIMENTO.....	24
2.1	TÉCNICAS DE IONIZAÇÃO AMBIENTE EM ESPECTOMETRIA DE MASSAS	24
2.2	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR MAGNÉTICOS	33
2.3	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO	39
2.4	ANTI-HIPERTENSIVOS (PROPRANOLOL, ATENOLOL, OXPRENOLOL, PINDOLOL, NADOLOL, LABETOLOL, METROPOLOL)	40
3	METODOLOGIA	47
3.1	AMOSTRAS	47
3.2	REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO	48
3.3	SÍNTESE DO M-MIP	48
3.3.1	Síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄	49
3.3.2	Síntese do M-MIP	50
3.4	REVESTIMENTO DO M-MIP COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BS) PARA OBTENÇÃO DO M-RAMIP	51
3.4.1	FT-IR	51
3.4.2	Porosimetria de sorção de nitrogênio – BET	52
3.4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura – SEM	52
3.5	TESTES DE EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS	52
3.6	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE DE BETABLOQUEADORES EM LC-MS/MS	53
3.6.1	Teste de pH de extração e avaliação da capacidade adsorptiva do M-NIP, M-MIP, M-RANIP e M-RAMIP	54
3.7	ESTUDOS DE ADSORÇÃO	54
3.8	ESTUDOS DE SELETIVIDADE	56

3.9	PROTÓCOLOS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA SEGUIDA DE ANÁLISE POR MPS-MS	57
3.9.1	Construção de curva analítica em água e plasma por MPS-MS de acordo com os protocolos 2 e 3	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	SÍNTESE DO M-MIP	61
4.2	TESTE DE PH DE EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ADSORTIVA DO M-NIP, M-MIP, M-RANIP E M-RAMIP	65
4.3	CARACTERIZAÇÃO	69
4.3.1	Caracterização dos materiais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	69
4.3.2	Porosimetria de sorção de nitrogênio – BET	71
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Veredura – SEM	72
4.3.4	Teste de exclusão de proteínas	77
4.4	OTIMIZAÇÃO DOS BETABLOQUEADORES EM LC-ESI-MS/MS ..	78
4.5	ESTUDOS DE ADSORÇÃO	79
4.6	ESTUDOS DE SELETIVIDADE	83
4.7	ESTUDOS DE PERFORMANCE DA TÉCNICA MPS-MS EXECUTADA CONFORME O PROTOCOLO 1	85
4.8	ESTUDOS DE PERFORMANCE DA TÉCNICA MPS-MS EXECUTADA CONFORME O PROTOCOLO 2	91
4.9	ESTUDOS DE PERFORMANCE DA TÉCNICA MPS-MS EXECUTADA CONFORME O PROTOCOLO 3	96
4.9.1	Estudo de vazões e voltagem para a MPS-MS referente ao protocolo 3	96
4.9.2	Construção de curva analítica em plasma humano por mps- ms de acordo com o protocolo 3	102
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
	REFERÊNCIAS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Nanomateriais magnéticos seletivos, sensíveis e de rápida aplicação têm sido desenvolvidos nos últimos anos para aplicações em análise ambiental, clínica, alimentar e bioanalítica. A possibilidade de recuperar o nanomaterial magnético por meio de um campo magnético externo o torna um adsorvente perfeito para a extração em fase sólida dispersiva, uma das técnicas de preparo de amostras mais empregadas ultimamente (Huang *et al.*, 2018).

Após a extração, os analitos são desorvidos das partículas usando solventes, que são injetados nos equipamentos de análise e então separados pela coluna cromatográfica. No entanto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu recentemente uma tecnologia denominada spray a partir de partículas magnéticas em espectrometria de massas (MPS-MS, do inglês: *magnetic particles spray - mass spectrometry*) empregada para promover a desorção dos analito retidos nos sorventes magnéticos diretamente na fonte de ionização do espectrômetro de massas (Mendes, 2023 [Não publicado]). Trata-se de um processo muito mais simples e eficiente, e que não requer uma prévia separação cromatográfica. Partículas magnéticas foram atraídas magneticamente para a ponta de uma sonda metálica que foi acoplada na entrada do espectrômetro de massas.

A desorção/ionização das moléculas, ou seja, a liberação das moléculas, foi conseguida com emprego de um solvente orgânico bem como pela aplicação de uma tensão de cerca de 4 kV (Mendes, 2023 [Não publicado]), portanto seu funcionamento se assemelha as técnicas da fonte de ionização por desorção por electrospray (DESI), que emprega uma voltagem e um de electrospray é gerado por um fluxo baixo de solvente para a ionização de moléculas orgânicas (SUN *et al.*, 2022). Contudo, a MPS-MS possui a vantagem de estar associada a um tratamento prévio de amostra, suprimindo o efeito da matriz e adicionando sensibilidade e precisão da análise, com reprodutibilidade, rapidez e a necessidade de quantidades mínimas de partículas magnéticas, amostra e solvente.

Os polímeros de impressão molecular (MIPs) são polímeros dotados de sítios seletivos de reconhecimento molecular, capazes de capturar seletivamente uma molécula e análogos em meios complexos (Fapa-Ms; Esi-Ms; Gu, 2019; Huang *et al.*, 2018;). Desta forma, é possível que a extração seletiva, torne desprezível o efeito da supressão iônica, permitindo que a análise seja feita diretamente por

espectrometria de massas, sem a necessidade de uma separação prévia (Allochio Filho *et al.*, 2023). Assim, este trabalho vai avaliar a eficiência de MIP magnético (M-MIP) em extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) seguido de análise por MPS-MS.

Os anti-hipertensivos betabloqueadores em sangue foram escolhidos como analitos tendo em vista serem muito utilizados no tratamento de hipertensão arterial crônica. Os betabloqueadores possuem ações farmacológicas complexas, sendo uma delas a promoção da diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas, o que também diminui o tremor periférico (Barroso *et al.*, 2020), sendo então proibidos para atletas que participem de competições de precisão (estão na lista proibida do código antidoping internacional padrão) (Wada, 2021).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Emprego de M-MIPs e da técnica MPS-MS para extração/análise de anti-hipertensivos em plasma humano.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar um M-MIP seletivo a betabloqueadores;
- b) Caracterizar o M-MIP sintetizados por meio infravermelho, porosímetria de sorção de gases, microscopia eletrônica de varredura, estudos de adsorção e estudos de seletividade;
- c) Otimizar o sistema de MPS-MS.
- d) Otimizar a d-SPE dos fármacos com o M-MIP obtido;
- e) Validar a metodologia de acordo com os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação;
- f) Aplicar o método em amostras reais e avaliar sua potencialidade.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 TÉCNICAS DE IONIZAÇÃO AMBIENTE EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massa de ionização de ambiente (AIMS) foi descrita pela primeira vez na literatura no começo dos anos 2000, com a introdução da técnica DESI (do inglês: *desorption electrospray ionization*), seguida pela técnica (DART do inglês: *direct analysis in real time*). A grande vantagem das técnicas AIMS é justamente a rapidez e a capacidade de ionizar amostras minimamente processadas ou sem nenhum preparo em seus ambientes nativo (Feider *et al.*, 2019).

Melhorias têm sido implementadas nas técnicas de AIMS, tanto no desempenho analítico como no *design* para permitir suas aplicações, desde análises clínicas, forenses, incluindo imagens moleculares de tecidos. Conjuntamente, novas técnicas e variações das mesmas aplicando outros processos físico-químicos, como dessorção térmica, ablação a laser e excitação vibracional, trabalhando em condições atmosféricas, foram desenvolvidos nas últimas décadas, tendo sido vastamente utilizadas em todo o mundo (Feider *et al.*, 2019).

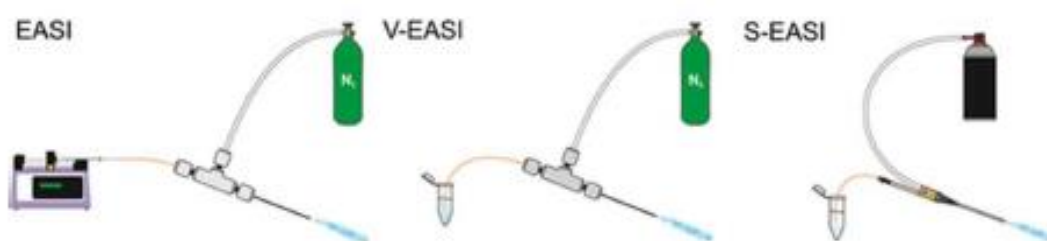
As técnicas de AIMS permitem análises rápidas, em tempo real e de alto rendimento. Porém, desafios como promoção de análise quantitativa, reprodutibilidade, sensibilidade, cobertura molecular e complexidade no tratamento de dados devem ser destacadas. Pode-se dizer, nesse sentido, que o progresso dessas áreas críticas tornará um conjunto de tecnologias mais robusto e eficiente em análises químicas cotidianas (Kuo *et al.*, 2020).

Uma derivação da AIMS é a espectrometria de massa de ionização por spray sônico ambiente (EASI-MS). Trata-se de uma técnica de ionização ambiente que viabiliza a análise MS direta e rápida de amostras na atmosfera aberta com pouca ou nenhuma manipulação de amostra. No EASI-MS, o spray sônico cria gotículas de solvente (por exemplo, ácido fórmico em metanol) que terminam sendo carregadas (positiva e negativamente) devido ao arranjo estatisticamente desequilibrado de cátions e ânions nessas gotículas minúsculas com capacidade restrita de transporte de carga. O fluxo denso das gotículas carregadas sônicas (bipolares) proporciona a captação do analito da superfície, a ionização concomitante como cátions ou ânions e, imediatamente, a transferência dos íons do analito para a fase gasosa para posterior análise de massa. A ionização por EASI é suave, causando nenhuma ou

pequena fragmentação (Alberici *et al.*, 2011).

A EASI é uma técnica de ionização que depende tão somente de um solvente e de um fluxo de alta velocidade de um gás nebulizador coaxial, sem auxílio de energia de ionização empregada externamente. A Figura 1 mostra o esquema da EASI e duas variedades derivadas da técnica (Lyu *et al.*, 2019).

Figura 1 - Esquema de ionização por spray sônico ambiente fácil (EASI), ionização por spray sônico ambiente Venturi-Easy (V-EASI) e Spartan-easy ionização por spray sônico ambiente (S-EASI).



Fonte: Lyu *et al.* (2019, p.5).

A ionização por spray sônico ambiente usando efeito Venturi (V-EASI), incorporou o auto bombeamento Venturi no lugar da bomba. Comparando com outras técnicas a seletividade de ionização e sensibilidade de detecção foram melhoradas. (Lyu *et al.*, 2019).

Já, a ionização por spray sônico ambiente do tipo espartano (S-EASI), foi simplificada, utilizando uma lata de ar comprimido, uma peça disponível e barata. O ar comprimido substituiu os cilindros de nitrogênio usuais e reguladores de gás. Os outros objetos também são de fácil obtenção e baratos, como um cateter cirúrgico bidirecional e uma agulha hipodérmica, que propiciava um equipamento auto montável e portátil (Lyu *et al.*, 2019).

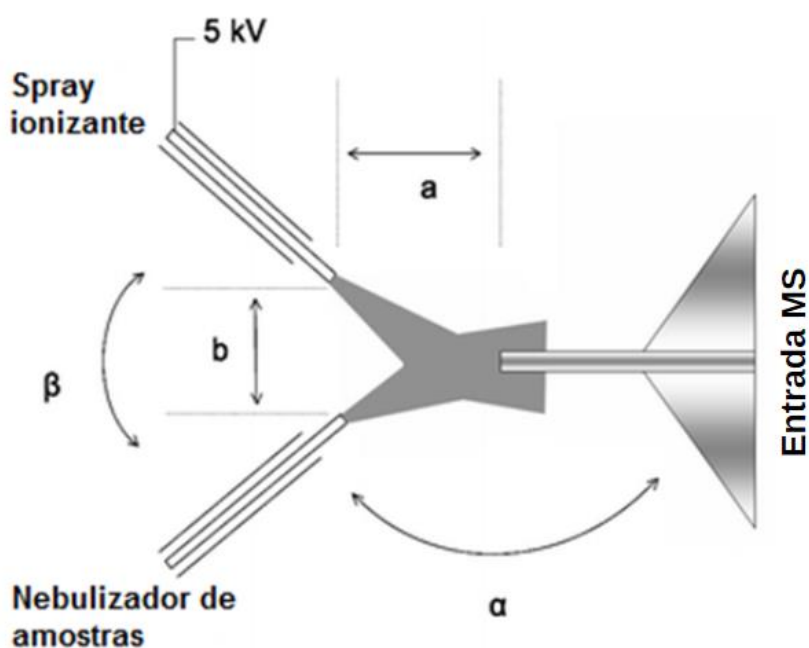
Atualmente, diferentes tecnologias de ionização ambiente foram desenvolvidas para o estudo de amostras complexas sólidas, gasosas, líquidas e até mesmo viscosas (Zhang *et al.*, 2018). E métodos de ionização ambiente foram introduzidos no aspecto do processo de transferência de energia e carga (Zhang *et al.*, 2018). E os novos dispositivos de ionização ambiente desenvolvidos serão brevemente resumidos e discutidos.

A DART análise direta em espectrometria de massa em tempo real (do inglês: *Ion source for direct analysis in real time*), permitem o exame de amostras sólidas

em ambiente aberto sem preparação de amostras. As amostras sólidas são introduzidas manualmente para o fluxo de gás DART. O fosso entre a fonte de íons e a entrada do espectrômetro era de 2,5 cm. As amostras são inseridas no meio da brecha. As DART-MS e DART-MS/MS podem ser aplicado eficazmente para a detecção de uma vasta gama de produtos químicos (Antal *et al.*, 2016) .

A ionização por eletropulverização extrativa (EESI, do inglês: *extractive electrospray ionization*) usa dois pulverizadores separados, um para nebulizar a solução da amostra e o outro para produzir micro gotículas carregadas de solvente. Essa abordagem depende da extração líquido-líquido entre as micro gotículas em colisão. Os compostos de interesse são extraídos da solução do analito para o spray de solvente de forma automática contínua, sem etapas de preparação da amostra. Esta técnica de ionização baseada em eletrospray permite a análise direta de compostos traço em matrizes complexas, como urina crua, leite e água poluída por longos períodos de tempo (Chen; Venter; Cooks, 2006; chen *et al.*, 2007a). Uma geometria da fonte típica é mostrada na (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama esquemático da ionização por eletropulverização extrativa mostrando sprays ionizantes e de amostra.

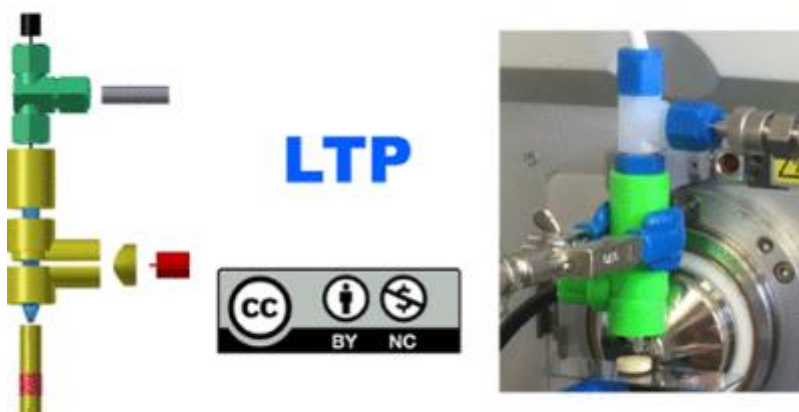


Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2007^a, p. 2042).

Já a ionização de plasma de baixa temperatura- (LTP do inglês: *Low-temperature plasma*) representa uma tecnologia emergente em espectrometria de massa de ionização ambiente. O LTP permite a detecção direta sem solvente de uma ampla gama de moléculas e imagens de espectrometria de massa (MSI). O baixo consumo de energia e os requisitos técnicos modestos dessas fontes de íons favorecem seu emprego em aplicações móveis e como um meio de atualizar os analisadores de massa existentes.

No entanto, a ampla adoção do LTP é dificultada pela falta de dispositivos comerciais, e a construção de dispositivos homemade é complicada. A configuração inadequada pode resultar em mau funcionamento do equipamento ou pode causar sérios danos aos instrumentos devido a fortes campos eletromagnéticos ou arcs (Martínez-Jarquín *et al.*, 2016). Com isso em mente, esses autores desenvolveram uma sonda LTP reproduzível, projetada exclusivamente a partir de componentes comerciais e impressos em 3D (Figura 3).

Figura 3 - Ionização de plasma de baixa temperatura- LTP



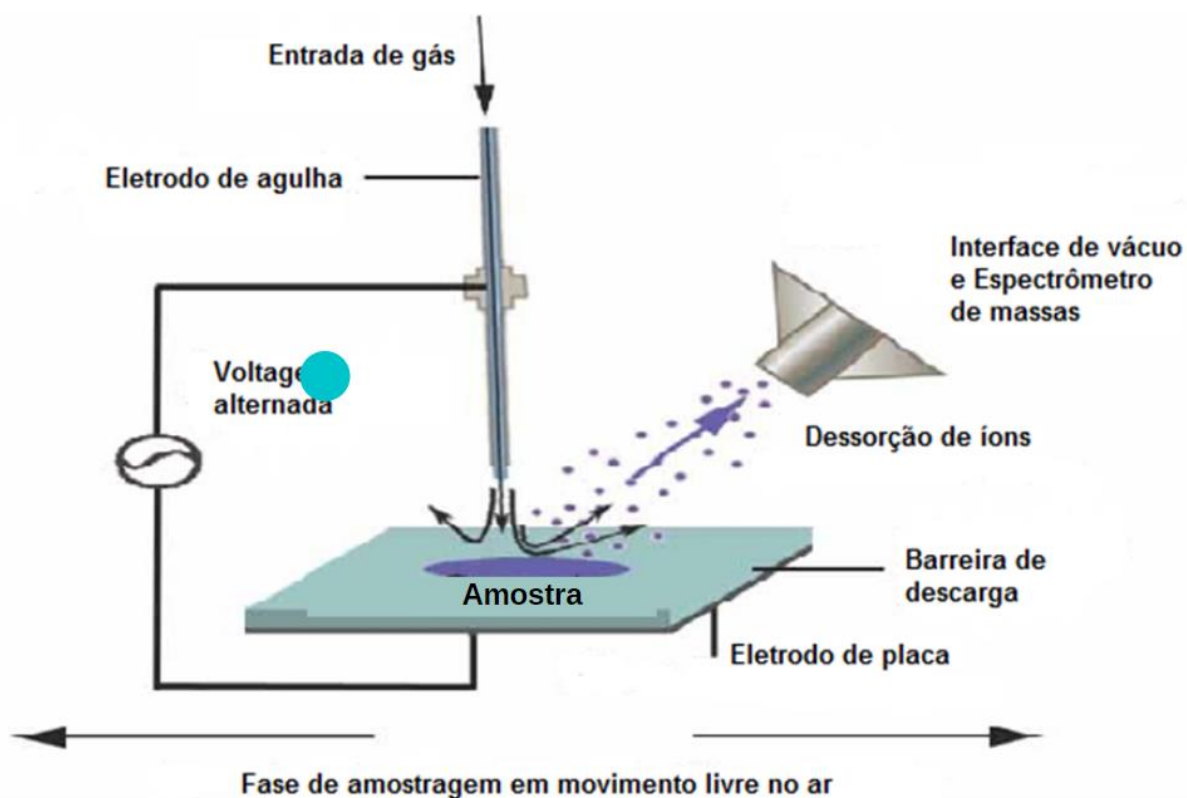
Fonte: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b01019>.

A ionização por descarga de barreira dielétrica (DBDI, do inglês: *dielectric barrier discharge ionization*) foi proposta para a detecção de aminoácidos de superfícies sólidas sem nenhuma preparação de amostra em condições ambientais. Esta técnica é baseada na produção de plasma de não-equilíbrio 'frio' de DBD com a facilidade de operação à pressão atmosférica para gerar os íons do analito. O DBD é composto por uma camada dielétrica inserida entre dois eletrodos e pode ser obtido

à pressão ambiente com operação em corrente alternada.

O dielétrico limita a densidade média de corrente no espaço do gás, formando um plasma estável e de baixa temperatura (ligeiramente acima da temperatura ambiente) com elétrons de alta energia. Os analitos podem ser desorvidos e ionizados da superfície por bombardeio de íons através da formação da bainha de plasma (Figura 4). Sem o solvente eletropulverizado, como DESI, e estruturas complexas como DART, a fonte de ionização muito simples tem as características de tamanho pequeno com facilidade de operação, o que poderia ser potencialmente acoplado a espectrômetros de massa portáteis (Na *et al.*, 2007).

Figura 4 - O diagrama esquemático da fonte de íons DBDI.



Fonte: Adaptado de Na *et al.* (2007, p. 1080).

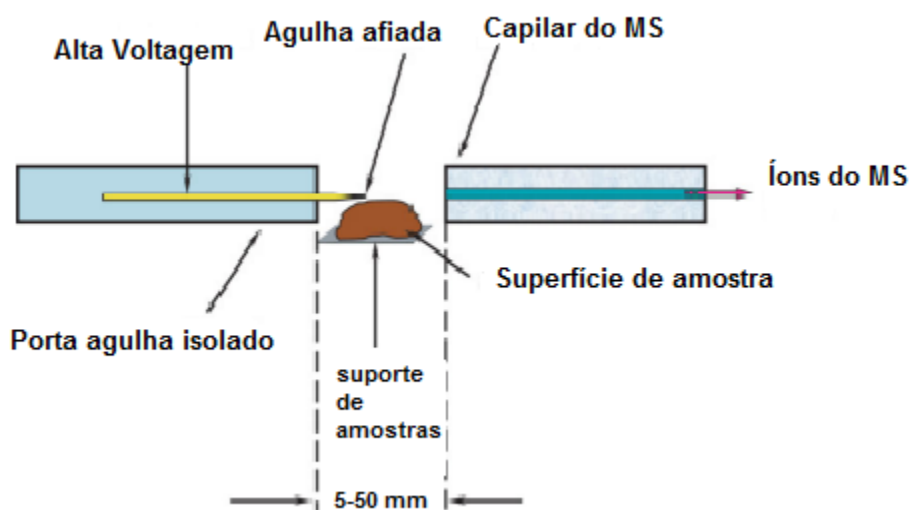
Por outro lado, a DAPCI- dessorção de superfície por ionização química à pressão atmosférica (Do inglês: *surface desorption atmospheric pressure chemical ionization*) foi inicialmente utilizado para a melhoria da sensibilidade do DESI utilizando tolueno como um reagente. Sucessivamente, o DAPCI foi implementado por (Williams *et al.*, 2006). Como um método alternativo de DESI para detecções de

várias drogas e amostras biológicas.

Williams *et al.* (2006) descobriram que o DAPCI era mais sensível do que o DART e DESI. Por exemplo, uma melhoria de 50 vezes na sensibilidade foi obtida em DAPCI contra DESI para a detecção de hidrocortisona. Contudo, o emprego de reagentes tóxicos como o tolueno e o metanol priva o DAPCI para muitas aplicações, e especialmente restrito as análises de amostras (por exemplo, alimentos, drogas, peles humanas etc.) que não permitem contaminação por produtos químicos tóxicos.

Teoricamente, a ionização química não ocorre sem um composto reagente. No entanto, isto não significa que os reagentes químicos devem ser tóxicos. Uma fonte de descarga corona é construído, e o ar ambiente é diretamente utilizado como um produto químico reagente para a produção primária de íons. Acredita-se que a água presente no ar é o componente ativo responsável pela geração de íons primários em descarga corona. Assim, esta técnica é utilizada para monitorizar amostras relacionadas com o ser humano, tais como: preparações farmacêuticas, alimentos, amostras de pele humana e vestuário. De forma consistente, uma elevada sensibilidade é alcançada em DAPCI (Figura 5), e não há a necessidade de pré-tratamento de amostras (Chen *et al.*, 2007b).

Figura 5 - Diagrama esquemático da fonte de ionização química da pressão atmosférica de dessorção de superfície

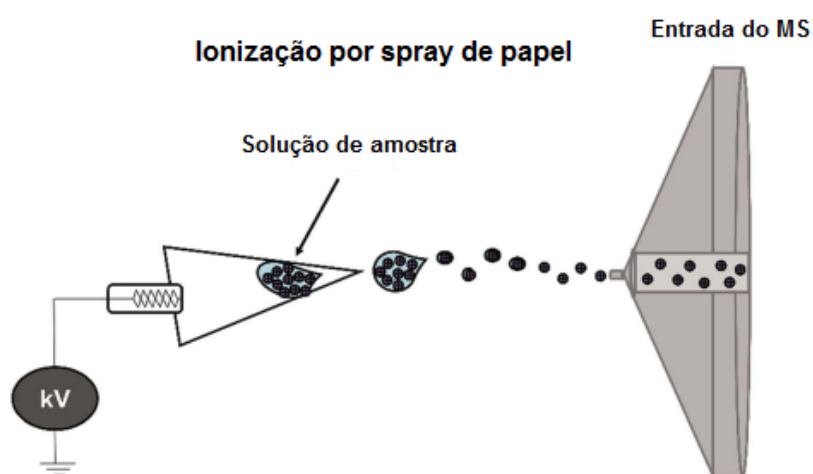


Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2007b, p.1047).

A ionização por spray de papel- (PSI do inglês: *Paper spray ionization*) é uma técnica AIMS bem estabelecida e fácil de usar. No PSI (Figura 6), o papel triangular é usado como substrato para gerar íons de analito pela aplicação de alta voltagem e um spray de solvente no papel (Da Silva *et al.*, 2019). Acoplar a simplicidade do PSI à portabilidade dos espectrômetros de massa pode tirar o MS do laboratório e viabilizar a análise do MS em ambientes exigentes. O grupo do Dr. Graham Cooks criou a ionização por spray de papel (PSI) em 2010. A fonte PSI pode ser facilmente montada usando um fio condutor soldado a um clipe jacaré preso a um suporte universal. Basicamente, uma alta tensão (por exemplo, 3-5 kV) é aplicado no papel triangular contendo uma amostra, que pode ser uma amostra extraída ou não.

A amostra é colocada no centro do papel e espalha-se através do efeito capilar; depois, um efeito ácido ou o solvente básico de pulverização é aplicado sobre o papel, e um campo elétrico induz a formação de um spray na forma de um cone de Taylor, isso é, o cone observado em processos de eletrofiação, eletropulverização e pulverização hidrodinâmica, a partir dos quais emana um jato de partículas carregadas acima de uma tensão limite. O mecanismo de ionização é semelhante ao do ESI: íons são formados em solução e fortes campos elétricos na ponta do papel resulta na formação de uma pluma carregada de gotículas que são desolvadas e dirigidas para o espectrômetro de massas. Os compostos neutros podem ser convertidos para o iônico e formar por protonação, desprotonação ou cationização (por exemplo, metal cationização) (Da Silva *et al.*, 2019) .

Figura 6 - Esquema da fonte de Ionização por spray de papel



Fonte: Adaptado Da Silva *et al.* (2019 , p. 1002).

A química analítica passou por uma revolução desde que a ionização ambiente foi introduzida, tornando a análise de amostras mais rápida, fácil e eficaz. O rápido surgimento de novos métodos e os esforços contínuos para aumentar a eficácia dos procedimentos antigos servem como indicadores do crescente interesse no AIMS a cada ano. Aplicações novas e fascinantes surgirão inevitavelmente à medida que as técnicas neste campo continuarem a serem desenvolvidas e aprimoradas, garantindo que o AIMS seja amplamente utilizado na pesquisa acadêmica, na indústria e na sociedade em geral (Shi *et al.*, 2022) .

Neste sentido, de acordo com os autores, a espectrometria de massa de ionização ambiente (AIMS) fornece ionização direta de analitos na superfície e subsuperfície de amostras sob condições ambientais, com manipulação mínima da amostra. Nos últimos anos, uma série de novas técnicas de ionização foram desenvolvidas para aumentar a capacidade do AIMS e expandir suas aplicações. Simultaneamente, o uso de nanomateriais em AIMS tem atraído atenção considerável para melhorar o desempenho e a diversidade de aplicações, através da contribuição para a seletividade e eficiência de ionização, explorando as propriedades únicas dos nanomateriais selecionados. O pré-tratamento da amostra é uma etapa fundamental para eliminar as interferências da matriz, aumentar a sensibilidade e a precisão na análise MS de amostras de matrizes complexas.

Apesar das vantagens do AIMS para análises rápidas e diretas, a análise de amostras com matrizes complicadas pode frequentemente causar alto ruído de fundo e supressão de ionização. Isso também pode potencialmente contaminar o sistema MS e causar complicações posteriores. Como mencionado anteriormente, para resolver essas limitações, tem havido um interesse crescente no uso de nanomateriais para extração seletiva, particularmente materiais com grandes áreas superficiais específicas, capacidade de alta sorção e meios econômicos de síntese. Os analitos de interesse podem ser extraídos seletivamente de matrizes complexas com base em interações específicas com os nanomateriais funcionalizados e tempos de extração mais curtos podem ser alcançados devido à alta área de superfície e essa afinidade aprimorada (Chen *et al.*, 2021) .

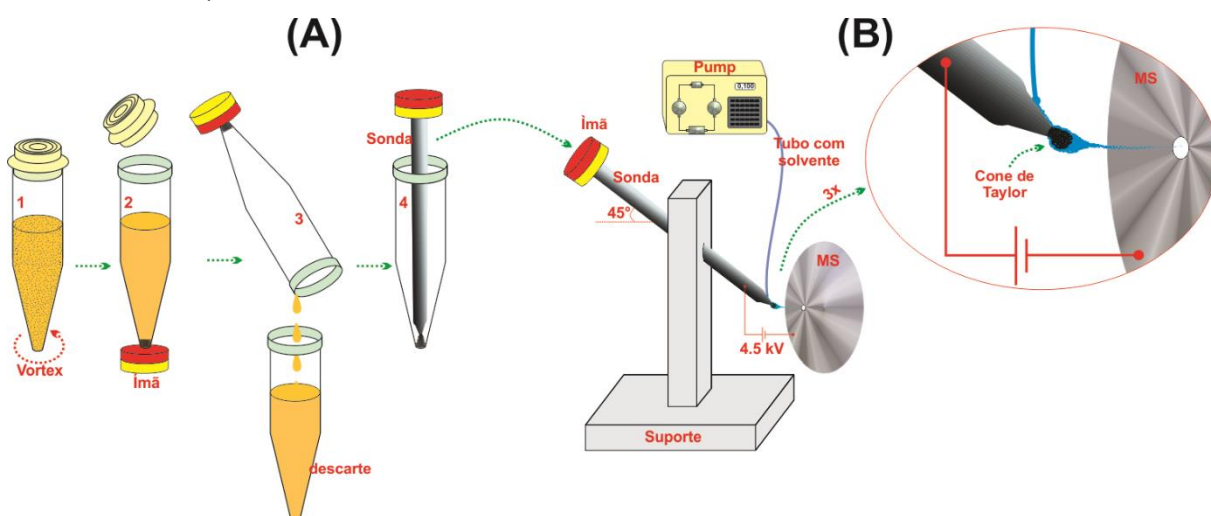
E por último a MPS-MS (figura 7), uma técnica de AIMS recentemente desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa. O MPS-MS possui configuração inspirada na fonte ESI, mas o preparo da amostra é totalmente integrado ao processo, que é muito rápido e com efeito de diluição mínimo (são necessários

cerca de 75 μL de solvente para eluir/ionizar os analitos por ciclo). Além disso, o spray formado não necessita de fluxo auxiliar de nitrogênio, como ocorre no DESI e EASI, por exemplo. O MPS-MS pode ser operado imediatamente após a amostragem, ao contrário do PS-MS, que requer muito tempo para o papel secar. Porém, o preparo integrado de amostras é certamente a principal vantagem do MPS-MS, devido à real possibilidade de minimizar a supressão iônica, à substituição muito rápida do sorvente magnético em análises sequenciais e ao elevado número de sorventes magnéticos já consolidados na literatura para d-SPE que pode ser avaliado para análises de diferentes moléculas e amostras (Mendes; Figueiredo, 2024).

No primeiro trabalho, amitriptilina, citalopram, clomipramina, clorpromazina, doxepina, haloperidol, nortriptilina e venlafaxina foram extraídos de amostras de plasma humano empregando-se partículas de nanotubos de carbono magnéticas. As partículas foram então atraídas magneticamente para a ponta de uma sonda magnética, que foi posicionada na entrada do espectrômetro de massa. Um solvente foi aplicado nas partículas e uma alta tensão provocou a formação do cone de Taylor em torno do aglomerado de partículas. Os analitos foram liberados pelo solvente, ionizados e analisados no espectrômetro de massa.

A MPS-MS é totalmente compatível com os princípios da química verde, principalmente em comparação com a SPE convencional seguida de análise LC-MS/MS. A MPS-MS necessitou de um consumo mínimo de amostra (cerca de 100 μL por análise), solvente (34 μL por análise) e sorvente magnético (500 μg por análise) para apresentar desempenho similar às técnicas já consolidadas. Para todos os analitos, foram obtidos limites de quantificação de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e coeficientes de correlação superiores a 0,98. A precisão, medida pelo desvio padrão relativo, e a exatidão, medida pelo erro relativo, variaram entre 3,6 e 23,6%, e entre -12,8 e 18,7%, respectivamente. A técnica MPS-MS possibilitou novos avanços na combinação de preparação de amostras e ionização ambiente. Técnicas como novos sorventes, diferentes configurações de dispositivos e condições físicas e químicas podem ser avaliadas para a análise de diversos outros analitos em amostras variadas (Mendes; Figueiredo, 2024).

Figura 7 - (A) Extração dispersiva em fase sólida dos analitos de uma amostra de plasma usando M-RACNTs. No primeiro tubo, as partículas se dispersam na amostra. No segundo tubo, as partículas são atraídas para o fundo usando um ímã. No terceiro tubo, as partículas são capturadas na ponta de uma sonda magnética. (B) Dessorção/ionização e análise dos analitos por espectrometria de massa através da pulverização de partículas magnéticas (MPS-MS).



Autor: Mendes e Figueiredo, ([2024 em publicação])

2.2 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR MAGNÉTICOS

Linus Pauling assumiu que certas moléculas, como monômeros funcionais, criam estruturas auto-organizadas em torno de outra partícula chamada modelo ou selo molecular. Embora essa teoria tenha se mostrado errada nos termos sugeridos por Pauling, ela se tornou a base para a síntese de materiais inteiramente novos denominados polímeros de impressão molecular (MIPs) que entraram com grande dinamismo no mundo da ciência no início dos anos 90 do século passado e aos poucos foram ganhando cada vez mais popularidade. Esses materiais são criados usando técnicas de impressão molecular, fornecendo propriedade de ligação seletiva dos espaços dentro da molécula do polímero de uma substância usada como "carimbo molecular".

A versatilidade do processo de sintetizar certas moléculas nesses materiais (que podem ser drogas, pesticidas, carboidratos, nucleotídeos, proteínas) de acordo

com propriedades de modificação simples obtidas de uma matriz, selecionando o monômero funcional apropriado e as condições do processo. Esses enchimentos fornecem reconhecimento e diferenciação muito seletivos dos enantiômeros que são particularmente úteis na química medicinal. Por essa razão, eles encontram aplicação em quase todas as áreas da vida, onde a análise química é necessária. Os MIPs, devido à sua compatibilidade com matrizes altamente complexas, são frequentemente usados para estimativas farmacêuticas e biológicas (Szatkowska *et al.*, 2013).

Os polímeros de impressão molecular (MIPs) são definidos como materiais sintéticos dotados de sítios seletivos de reconhecimento capazes de se ligar seletivamente a uma molécula-alvo. Têm sido usados com êxito como sorbente em variadas metodologias de preparo de amostras como extração e microextração em fase sólida, extração em fase sólida dispersiva, extração sortiva em barra de agitação, microextração com sorvente empacotado, dentre outros (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015).

Os MIPs se tornaram atrativos para empregos em preparo de amostras por serem seletivos, resistentes a solventes orgânicos, altas temperaturas e extremos de pH. O aumento de trabalhos publicados na literatura sobre esse tema é notoriamente constatado a partir da década de 1990 (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015). Uma relevante utilização de MIPs em preparo de amostras é a alternativa de conferir a esses polímeros propriedades magnéticas, resultando nos M-MIPs. Nano partículas magnéticas como o Fe_2O_3 são ligadas quimicamente aos MIPs, ou incorporadas durante a síntese. Dessa forma, por meio da aplicação de campo magnético os polímeros dispersos nas amostras para extração são separados (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015). A extração em fase sólida dispersa (d-SPE) é uma variante da SPE convencional, de simples execução, com melhores recuperações de extração e seletividade (Mendes *et al.*, 2020).

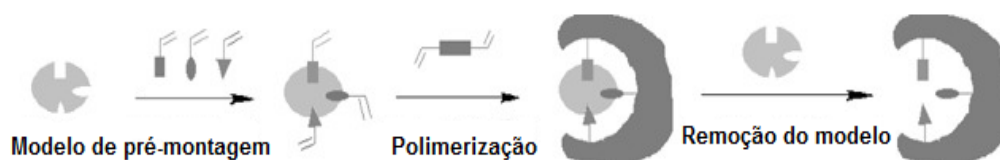
Vários protocolos sintéticos foram desenvolvidos para obter MIPs. Desde o primeiro aparecimento dos MIPs, o protocolo sintético mais utilizado tem sido a polimerização em *bulk*. Neste processo, o monômero funcional polimerizável (mais frequentemente ácido metacrílico) é pré-arranjado em torno de uma molécula modelo em solvente orgânico (por exemplo, clorofórmio, acetonitrila). Os complexos pré-poliméricos são copolimerizados com um excesso de reticulante (por exemplo, dimetacrilato de etilenoglicol) na presença de um iniciador de radicalar livres em

condições térmicas ou fotoquímicas.

O bloco de polímero resultante é então estruturado e selecionados à mão para produzir partículas de tamanho único para experimentos. Após a remoção do molde por extração, os locais de ligação complementares à molécula do molde, tanto na forma como na funcionalidade química, são deixados dentro das matrizes poliméricas que permitem a reconexão do molde com bastante especificidade (Yemiş *et al.*, 2013)

MIPs são projetados para possuir seletividade semelhante a anticorpo, mas ao contrário desses materiais, podem ser projetados para possuir estabilidade física/mecânica, resistência a condições adversas (por exemplo, alta temperatura, pressão, ácidos, bases, e alguns solventes orgânicos), e ser produzidos de forma mais fácil e econômica. A chave para MIPs eficazes é produzir um “dispositivo” que possua locais de reconhecimento com arranjo espacial apropriado e afinidade específica para um modelo. A abordagem padrão para preparar MIPs é ilustrada esquematicamente na (figura 8), (Ding; Heiden, 2014)

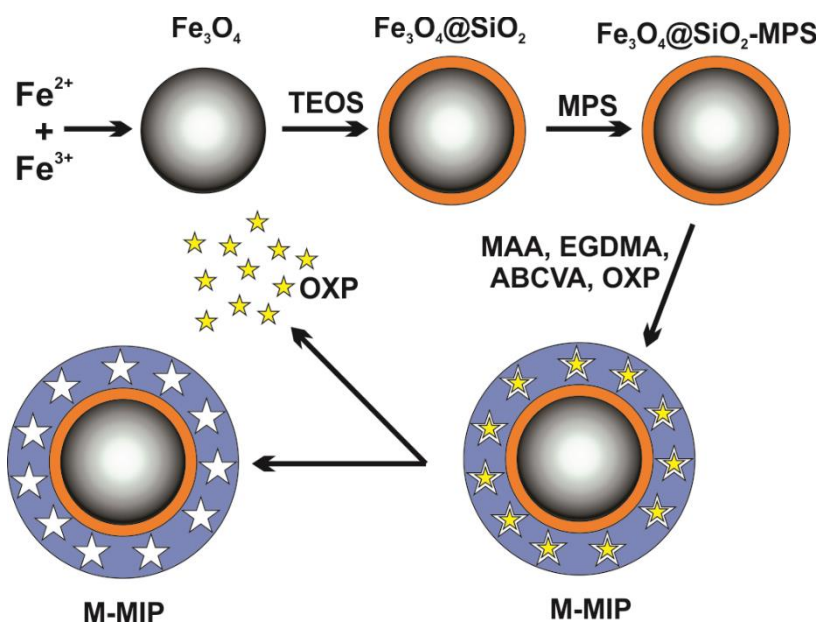
Figura 8 - Uma representação esquemática de um processo de impressão molecular.



Fonte: Adaptado de Ding e Heiden (2014, p. 269)

Já, o modo de preparação dos M-MIPs, polímeros usados neste trabalho é normalmente dividido em quatro partes (Figura 9). A primeira etapa é a fabricação de nanopartículas magnéticas (magnetita, Fe_3O_4). A segunda parte é a modificação da superfície ou funcionalização das partículas magnéticas. A terceira fase é a polimerização do MIP ancorado sobre a superfície das partículas. A quarta etapa é a lavagem do material. (Chen; Li, 2012).

Figura 9 - Etapas de preparo do M-MIP magnético.



Fonte: Autor (2024).

O Fe₃O₄ é o material magnético mais utilizado por ser de fácil fabricação, possuir baixa toxicidade e múltiplas hidroxilas na superfície, que viabilizam modificações posteriores satisfatórias (Huang *et al.*, 2018).

O tamanho e a forma das partículas de magnetita são geralmente controlados pelo método de síntese. Uma variedade de métodos tem sido relatada na literatura sobre a síntese de nanopartículas de magnetita, como a coprecipitação química (usado neste estudo). A maioria das aplicações exige que as nanopartículas sejam uniformes em tamanho, forma e bem dispersas em um solvente. O tamanho da partícula é o principal fator que afeta muitas propriedades interessantes. Tamanhos de partículas magnéticas de nanômetros a micrômetros são materiais atraentes no campo da gravação magnética (Petcharoen; Sirivat, 2012).

Os M-MIPs foram usados como sorventes na extração em fase sólida dispersiva de amostras complexas em muitos estudos. A utilização de MIPs no método de preparação de amostras melhora a performance analítica de amostras complexas (Huang *et al.*, 2018).

Santos e colaboradores (2015), desenvolveram e validaram um método de análise para beta-bloqueadores, fármacos que demandam por procedimentos analíticos dinâmicos, rápidos e sem preparação manual da amostra. Por serem proibidos em alguns esportes, devido a melhora no desempenho esportivo. Portanto,

a utilização de um MIP em um sistema de cromatografia líquida multidimensional acoplado a um espectrômetro de massa ofereceu uma boa alternativa para melhorar a seletividade e praticidade das análises dos beta-bloqueadores, conforme descrito no trabalho. Um MIP compatível com água para oxprenolol foi sintetizado pelo método de precipitação, usando ácido metacrílico como monômero funcional e 2-hidroxietil metacrilato e glicerol dimetacrilato como monômeros hidrofílicos.

Uma coluna preenchida com MIP foi acoplada a um instrumento LC-MS / MS na configuração multidimensional, com 10,0 mmol L⁻¹ tampão de formato de amônio (pH 5,0) como a fase móvel de carregamento e recondicionamento e uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,01% - metanol (30: 70 v: v) como a fase móvel de eluição. O sistema foi usado para extração e quantização on-line de oxprenolol (de 1,0 a 75,0 µg L⁻¹), atenolol, propranolol, nadolol, pindolol, labetalol e metoprolol (todos de 3,0 a 50 µg L⁻¹) simultaneamente, da urina amostras. O coeficiente de correlação foi superior a 0,99 para todos os analitos. Precisão e exatidão adequadas foram obtidas.

Yu e colaboradores (2011) prepararam microesferas de polímero de impressão molecular para ligação seletiva e reconhecimento de atenolol por meio do método de polimerização por precipitação usando ácido metacrílico como monômero funcional e trimetilolpropano trimetacrilato como reticulador na presença de atenolol como molécula molde em solução de acetonitrila. A simulação computacional foi empregada para demonstrar o mecanismo da interação entre o ácido metacrílico e o atenolol.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que os polímeros eram esferas uniformes com diâmetro de cerca de 0,6 µm. As propriedades de adsorção do atenolol para microesferas impressas foram avaliadas por experimentos de religação de equilíbrio. A análise do gráfico de Scatchard revelou que havia duas classes de locais de ligação nas microesferas impressas. A constante de dissociação e a capacidade de ligação máxima aparente foram 4,56×10⁻⁴ mol/L e 186,46 µmol/g para os sítios de ligação de alta afinidade, 2,40×10⁻² mol/L e 4,01mmol/g para os sítios de ligação de baixa afinidade. Em comparação com os análogos estruturalmente, as microesferas impressas exibiram uma alta capacidade reconhecível seletiva em relação ao molde.

Da Silva *et al.* (2021) sintetizaram um novo polímero magnético impresso molecularmente (M-MIP) pela primeira vez usando ácido tereftálico como um

monômero funcional para extrair atenolol (ATL) do plasma humano por extração magnética em fase sólida (MSPE). A separação dos enantiômeros ATL foi realizada por eletroforese capilar utilizando carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD: 5,5 mg) como seletor quiral em eletrólito de fundo com 125 mmol L⁻¹ trietilamina pH 6,0 utilizando um capilar com 75 μ m de diâmetro interno. Após a otimização do MSPE, as melhores condições foram: 500 μ L de água ultrapura como solvente de lavagem, 1000 μ L de metanol como solvente de eluição, 25 mg de M-MIP e 250 μ L de amostra (plasma humano em pH 12,5). As recuperações/porcentagem de desvio padrão relativo foram $75,8 \pm 6,3\%$ e $76,1 \pm 5,7\%$ para (-)-(S)-ATL e (+)-(R)-ATL, respectivamente. O método foi linear na faixa de concentração de 5,0 a 1500,0 ng mL⁻¹, com coeficientes de correlação maiores que 0,99 para ambos os enantiômeros. O método foi aplicado com sucesso em amostras de plasma de voluntários em uso contínuo de racemato ATL. Finalmente, o teste de impressão M-MIP confirmou que o material era seletivo para ATL, com baixas recuperações para outras drogas.

Barde e autores (2013) relatam que as aplicações de polímeros molecularmente impressos (MIPs) estão aumentando rapidamente, especialmente no campo de distribuição de medicamentos. Polímeros molecularmente impressos são as armadilhas moleculares, que podem aprisionar a molécula específica e também controlar sua liberação. Complexos poliméricos foram preparados com e sem propranolol HCl como molde, MAA (ácido metacrílico) como monômero e EGDMA (dimetacrilato de etilenoglicol) como reticulador pela técnica de polimerização com solvente. O padrão de liberação do fármaco desses complexos poliméricos foi comparado e a liberação máxima do fármaco em 12 h foi considerada para otimizar a proporção de MAA e EGDMA.

Como a liberação máxima de propranolol HCl do complexo polimérico foi baixa (62,15%) no lote otimizado, complexos de inclusão de fármaco com β -ciclodextrina foram preparados para maior liberação do fármaco (80,32%). Os complexos poliméricos selecionados foram tratados com metanol para remoção completa da droga para formar MIPs. Esses MIPs foram recarregados com a droga e submetidos à liberação da droga. Observou-se que os padrões de liberação dos MIPs recarregados são ligeiramente mais rápidos do que os MIPs correspondentes.

E por fim, Liu, Holdsworth e Ye (2020) apresentaram uma nova abordagem para a síntese de polímeros molecularmente impressos, utilizando um iniciador

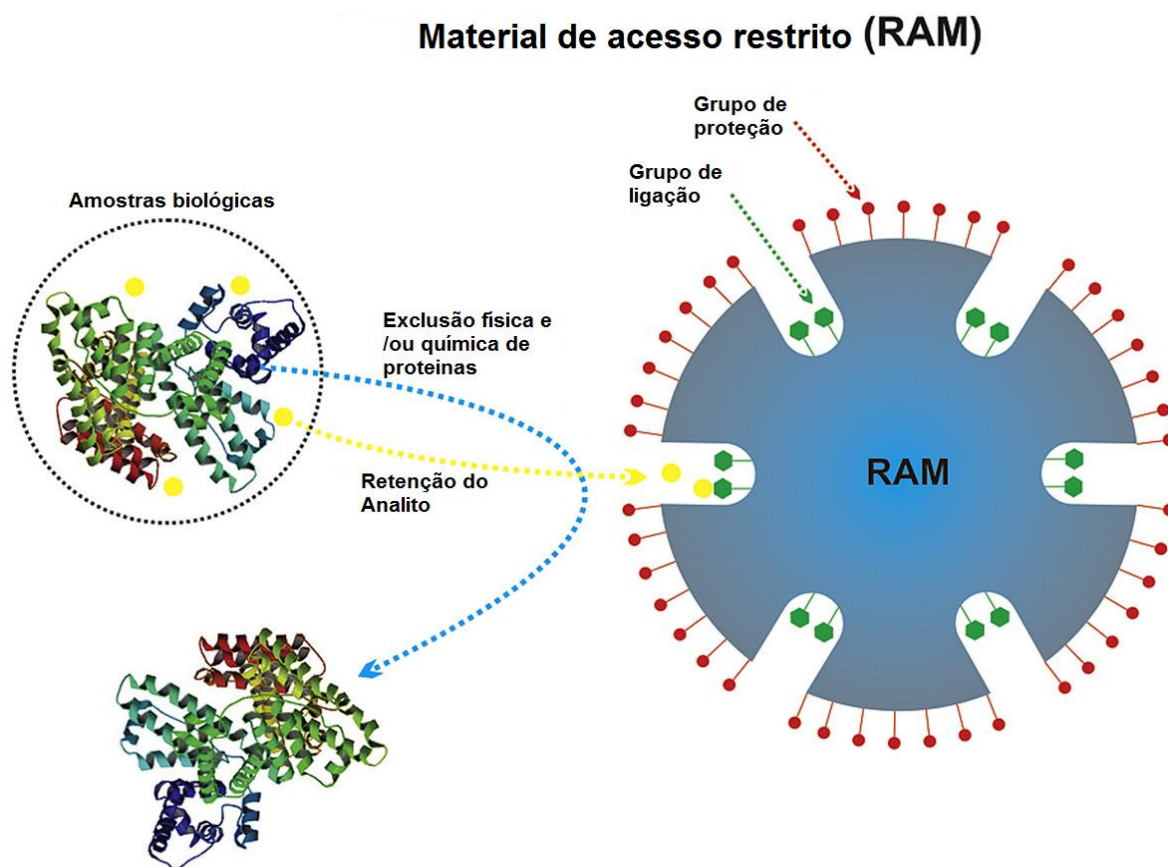
funcionalizado em substituição ao tradicional monômero funcional. Ao utilizar o propranolol como modelo, demonstraram que um iniciador radicalar com carboxila leva à formação de partículas poliméricas altamente seletivas em um sistema de polimerização por precipitação padrão. Quando utilizamos apenas um enantiômero de propranolol como modelo, as partículas poliméricas impressas exibiram seletividade quiral evidente em um experimento de ligação em equilíbrio. Ao contrário dos sistemas de impressão molecular anteriores, nos quais os radicais livres ativos podem estar distantes do complexo de monômeros funcionais do modelo, o método descrito neste estudo garante que a polimerização radicalar ocorre próxima aos grupos funcionais associados ao modelo. A utilização efetiva do iniciador funcional na síntese de polímeros com impressão molecular traz consigo novas oportunidades para aprimorar o desempenho funcional dos receptores sintéticos com impressão molecular.

2.3 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO

A detecção de compostos orgânicos e inorgânicos em amostras biológicas requer métodos de preparação de amostras eficientes para capturar os compostos em meio a muitas macromoléculas, que podem gerar erros e afetar os instrumentos de análise. Por esse motivo, o uso dos chamados materiais de acesso restrito (RAM) (Figura 10) tem se mostrado muito útil nesses casos, pois são capazes de reter os compostos desejados enquanto excluem as macromoléculas indesejáveis. Esses materiais são obtidos pela modificação das superfícies externas de sorventes convencionais (como polímeros, nanotubos de carbono, carbono ativado e materiais à base de sílica) com grupos hidrofílicos (que funcionam como uma barreira química) e poros pequenos (que funcionam como uma barreira física) que são acessíveis apenas para moléculas de baixo peso molecular (De Faria *et al.*, 2017).

Os solventes supramoleculares, conhecidos como SUPRAs, têm sido utilizados como RAMs devido à sua capacidade de excluir proteínas com base em seu tamanho ou por meio de precipitação com solventes. Assim, em virtude da importância desses materiais, tem sido descrito na literatura variadas formas de obtê-los, assim como, suas aplicações na preparação de amostras biológicas (De Faria *et al.*, 2017).

Figura 10 - Esquema de como funciona o RAM

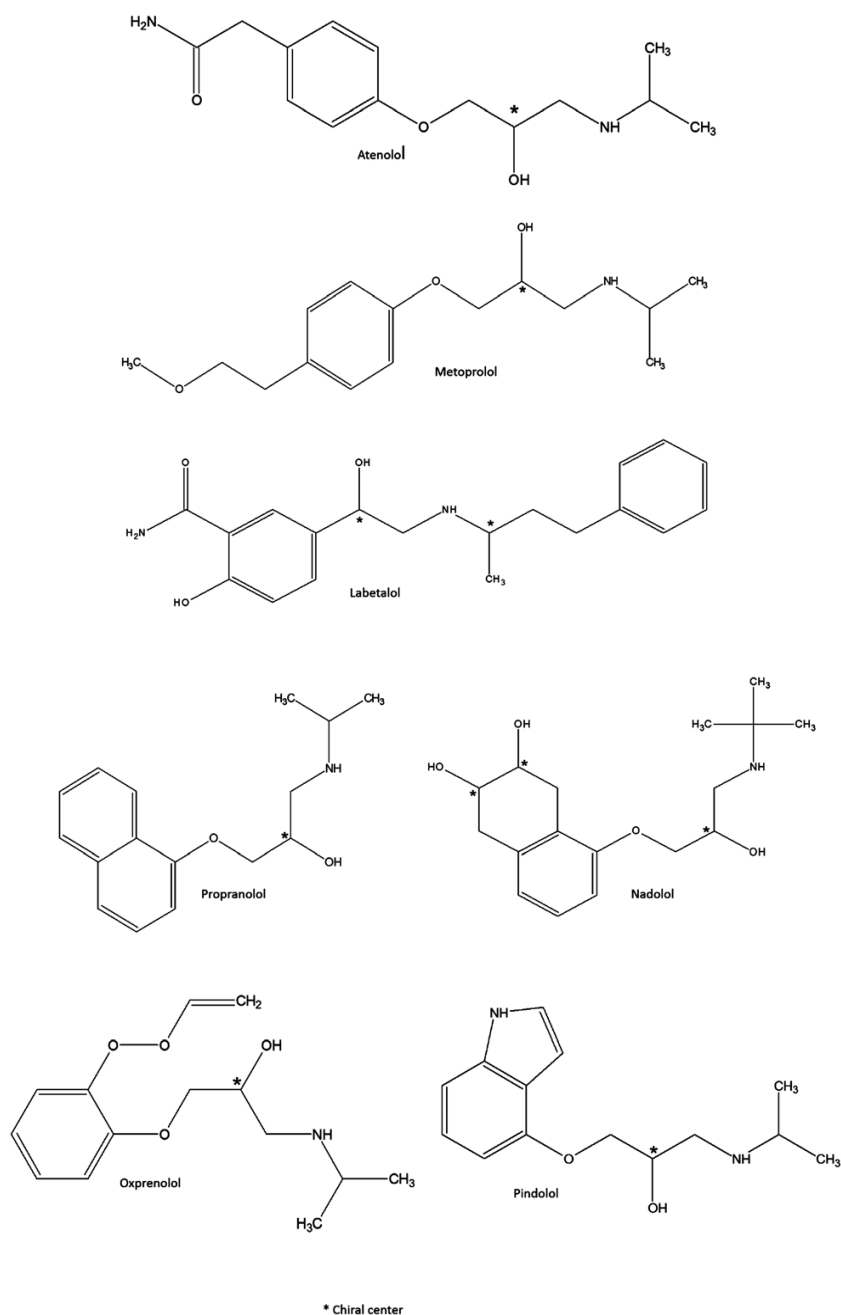


Fonte: De Faria *et al.* (2017)

2.4 ANTI-HIPERTENSIVOS (PROPRANOLOL, ATENOLOL, OXPRENOLOL, PINDOLOL, NADOLOL, LABETOLOL, METOPROLOL).

Os betabloqueadores propranolol (PROP), atenolol (ATE), oxprenolol (OX), pindolol (PIN), nadolol (NAD), labetalol (LAB) e metoprolol (MET) (figura 11) são fármacos normalmente usados no tratamento da angina de peito e da hipertensão. Esses fármacos são classificados como antagonistas adrenérgicos β_1 ou β_2 e agem relaxando os músculos e reduzindo a frequência cardíaca. Por essas razões, podem ser utilizados para melhorar o desempenho em esportes que demandam estabilidade, equilíbrio, concentração e precisão, como, tiro com arco, tiro, bilhar, golfe, dardos e corrida de automóveis, dentre outros (Santos *et al.*, 2015; tomková *et al.*, 2017).

Figura 11 - Estrutura molecular de betabloqueadores comuns que são proibidos em alguns esportes pela Agência Mundial Antidoping (WADA).



Fonte: Santos *et al.* (2015 p. 2697).

De acordo com a literatura, betabloqueadores (β -bloqueadores) (Quadro 1) são clinicamente vistos na concentração de $0,1-1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ no plasma humano (Gu *et al.*, 2014).

Quadro 1 - Propriedades Físico-Químicas dos betabloqueadores.

Fármaco	pKa	Massa Molar g / mol	Ponto de Fusão ° C	Solubilidade em água mg / L (a 25 ° C)
Propranolol (C ₁₆ H ₂₁ NO ₂)	9,42	259,34	96	61,7
Atenolol (C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃)	9,6	266,34	147	13.300
Oxprenolol (C ₁₅ H ₂₃ NO ₃)	-	265,35	-	680
Pindolol (C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₂)	9,25	248,32	171	7.880
Nadolol (C ₁₇ H ₂₇ NO ₄)	9,67	309,4	130,0	8.330
Labetolol (C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃)	9,3	328,4	188	5,78
Metoprolol (C ₁₅ H ₂₅ NO ₃)	9,7	267,36	120	>10 ⁶

Fonte: Pubchem, 2021

Betabloqueadores são um tipo especial de fármacos prescrito para uma ampla gama de problemas de saúde, incluindo doenças cardiovasculares. Há uma fronteira estreita entre os níveis terapêuticos e tóxicos dos β -bloqueadores e em altas dosagens. β -bloqueadores podem causar efeitos colaterais graves. Além disso, os β -bloqueadores são usados como agentes antidoping em alguns esportes e seu uso é proibido pela Agência Mundial *Antidoping* (WADA). Portanto, desenvolver uma metodologia simples, precisa e sensível para determinar β -bloqueadores é muito importante (Sarvestani; Madrakian; Afkhami, 2021).

Desde janeiro de 1988, os betabloqueadores constam na lista de substâncias proibidas em competições atléticas da Agência Mundial *Antidoping* (Pujos *et al.*, 2009).

Van Domburg (2019) e colaboradores apresentaram em seu artigo um método para analisar dez drogas antiarrítmicas (atenolol, bisoprolol, carvedilol, diltiazem, flecainide, lidocaína, metoprolol, propranolol, sotalol e verapamil). Foi utilizado um

protocolo simples e rápido de preparação de amostras com precipitação de proteínas seguido de cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC) para separação cromatográfica e detecção espectroscópica de massa aplicando ionização por electrospray (ESI+) e modo de monitorização de reação selecionado (MS/MS).

Apenas 50 μL de amostra de plasma são necessários para a quantificação simultânea de todos os compostos dentro de um tempo de análise de 5 minutos de execução. Sotalol-D₆, carvedilol-D₅ e verapamil-D₆ foram usados como padrões internos. O método foi validado de acordo com as diretrizes da FDA. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,998 para todos os compostos. A precisão intra e inter-dia estava dentro de 15 CV (%) para todos os analitos. O método é neste momento aplicado com sucesso para análises de rotina no hospital dos autores.

Yildirim e colaboradores (2023) desenvolveram um método de preparação de amostra envolvendo implementação em tandem de precipitação de proteínas e extração de líquido-líquido homogêneo *salting-out* para a determinação de beta-bloqueadores no soro. Todo o procedimento foi automatizado usando uma bomba de seringa controlada por computador seguindo a abordagem *Lab-In-Syringe*. Baseia-se na desnaturação de proteínas séricas com acetonitrila, seguida de separação de fase induzida por sal, na qual as proteínas se acumulam como uma camada compacta na interfase das soluções.

O extrato é então separado e diluído em seringa antes de ser analisado por UHPLC-MS/MS. Uma seringa de vidro de 1 mL contendo uma pequena barra de agitação para misturar a solução em até 3.000 rpm foi usada para lidar com volumes de amostra tão pequenos quanto 100 μL . Um rendimento de amostra de 7 h⁻¹ foi obtido executando a corrida cromatográfica e o procedimento de preparação da amostra em paralelo. Faixas lineares de trabalho foram obtidas para todos os analitos entre 5 e 100 ng mL⁻¹, com valores de LOD variando de 0,4 a 1,5 ng mL⁻¹. Valores de precisão na faixa de 88,2–106% e alta precisão de <11% RSD sugerem aplicabilidade para análises de rotina que podem ser melhoradas usando padrões deuterados.

Parr e colaboradores (2016) consideram que a técnica de HPLC é um método de escolha para a separação de várias classes de fármacos. No entanto, alguns analitos ainda são desafiadores, pois o HPLC mostra capacidades de resolução limitadas para analitos altamente polares, pois eles interagem

insuficientemente em colunas convencionais de fase reversa (RP). Especialmente em combinação com detecção por espectrometria de massa, limitações se aplicam a alterações de fases estacionárias. Algumas drogas simpaticomiméticas altamente polares e seus metabólitos quase não mostraram retenção em diferentes colunas de RP. Sua retenção permanece pobre mesmo em fases fenilhexila que mostram seletividade diferente devido a interações π - π .

A cromatografia de fluido supercrítico (SFC) como uma técnica de separação ortogonal para HPLC pode ajudar a superar esses problemas. Fármacos polares selecionados (alprenolol, bambuterol, bisoprolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, etilefrina, nadolol, nebivolol, niketamida, norfenefrina, octopamina, oxilofrina, oxprenolol, penbutolol, foledrina, procaterol, sotalol e terbutalina) e metabólitos foram analisados utilizando separação SFC. Todos os compostos apresentaram picos acentuados e boa retenção mesmo para os analitos muito polares, como os sulfo conjugados. Os tempos de retenção e as ordens de eluição em SFC são diferentes das separações RP e HILIC como resultado da ortogonalidade. Tempos de ciclo curtos podem ser realizados.

Como a temperatura e a pressão influenciam fortemente a polaridade dos fluidos supercríticos, é necessária uma regulação precisa da temperatura e da contrapressão para a estabilidade dos tempos de retenção. Como CO a regulação precisa da temperatura e da contrapressão é necessária para a estabilidade dos tempos de retenção. Como CO₂ é o principal constituinte da fase móvel no SFC, o consumo de solvente e o desperdício de solvente são consideravelmente reduzidos.

Para Van Eenoo e autores (2011) é proibido o uso de drogas para melhorar o desempenho nos esportes. Para a detecção do uso indevido dessas substâncias, a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa são as técnicas de detecção mais utilizadas. Neste trabalho eles descreveram o desenvolvimento e validação de um método de espectrometria de massa tandem de cromatografia gasosa rápida para a detecção de uma ampla gama de agentes dopantes.

O método pode determinar 13 esteróides endógenos (o perfil de esteróides), 19 norandrosteronas, salbutamol e ácido 11-nor- Δ 9-tetrahydrocannabinol, 9 ácidos carboxílicos nas faixas aplicáveis e detectar qualitativamente mais de 140 substâncias de acordo com os níveis mínimos de desempenho exigidos do Agência Mundial Antidopagem em 1 mL de urina. As classes de substâncias incluídas no

método são esteroides anabolizantes, β 2-agonistas, estimulantes, narcóticos, antagonistas e moduladores hormonais e betabloqueadores. Além disso, usando uma coluna capilar curta e hidrogênio como gás de arraste, o tempo de execução do método é inferior a 8 minutos.

Por último, Miller e colaboradores (2019) afirmam que os testes antidoping atuais são realizados principalmente na urina e no sangue. Recentemente, devido a fatores de confusão com coletas de urina e sangue, como invasividade, custo e condições de transporte rigorosas, houve um esforço para o uso de matrizes de amostras alternativas para melhorar esses problemas. Ganhar apoio no campo *antidoping* é o uso de fluido oral e, mais recentemente, respiração exalada, como alternativas viáveis ou matrizes complementares à urina e ao sangue tradicional para testes de drogas. Assim, projetaram um primeiro estudo de campo com o objetivo de investigar a utilidade do teste de fluido oral e expiração e a preferência dos atletas participantes, comparando com os métodos *antidoping* convencionais de teste de urina.

Para conseguir isso, 521 amostras combinadas totais, consistindo em amostras de ar exalado, fluido oral e urina, foram coletados e analisados, e os resultados comparados entre as matrizes. Os participantes deste estudo preferiram a coleta de ar exalado (avaliação de $4,90 \pm 0,34$ de 5, média \pm DP) ao procedimento de coleta de fluido oral ($4,29 \pm 0,85$), e a maioria preferiu ambas as coletas de urina. A respiração exalada resultou no menor tempo de coleta ($2,58 \pm 1,00$ min, média \pm DP), seguida pela urina ($3,08 \pm 1,50$ min) e, finalmente, fluido oral ($4,14 \pm 1,94$ min). Substâncias proibidas das categorias de drogas de estimulantes, média \pm DP), seguida de urina ($3,08 \pm 1,50$ min) e, finalmente, fluido oral ($4,14 \pm 1,94$ min). Substâncias proibidas das categorias de drogas de estimulantes, média \pm DP), seguida de urina ($3,08 \pm 1,50$ min) e, finalmente, fluido oral ($4,14 \pm 1,94$ min).

Substâncias proibidas das categorias de drogas de estimulantes, narcóticos, canabinóides, diuréticos, glicocorticóides, betabloqueadores e outros, foram analisados neste estudo para uma comparação da eficácia do teste. Do total de achados, 49% foram detectáveis apenas na urina, 38% na urina + fluido oral e 9% nas três matrizes. Dos achados únicos, 3% foram detectáveis apenas no fluido oral, 1% no fluido oral + respiração e 0% dos achados únicos estavam presentes apenas na respiração expirada. As descobertas deste estudo fornecem uma base sólida para o uso futuro de fluido oral e respiração exalada como alternativas viáveis ou

matrizes complementares para testes *antidopings* em competição.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

O presente estudo foi submetido ao CEP/CONEP e se encontra aprovado sob o número CAAE 48071221.5.0000.5142. Dez amostras branco de plasma humano foram colhidas de voluntários saudáveis com idade mínima de 18 anos que não fazem uso dos medicamentos anti-hipertensivos (PROP, ATE, OXP, PIN, NAD, LAB e MET) e foram utilizadas como *pool* no processo de otimização e validação. Os voluntários foram alunos e funcionários do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unifal-MG) que concordaram em participar da pesquisa. O procedimento que foi realizado com cada voluntário refere-se a coleta de 5 mL de sangue total. Destaca-se que a coleta de sangue foi realizada por profissional habilitado, seguindo os padrões de segurança necessários para tal atividade.

Para comprovar a ausência de anti-hipertensivos, as amostras foram testadas previamente pelo método desenvolvido. Todas as amostras foram coletadas em tubos a vácuo e heparina como anticoagulante no laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unifal-MG) e foram devidamente armazenadas neste mesmo laboratório em frascos e conservadas a -18°C .

Como as coletas foram feitas ainda no período de pandemia do coronavírus (COVID-19), medidas de segurança extra para voluntários e pesquisadores foram adotadas, especificamente: uso de máscaras tanto pelo voluntário quanto pelo responsável pela coleta. Para as amostras de sangue, as coletas foram agendadas e realizadas de modo individual, foram efetuadas a desinfecção dos aparatos (como cadeiras e suportes de braço) dentre outros procedimentos adotados para segurança de ambos. As amostras de sangue primeiro foram centrifugadas por 15 min a $2.000 \times g$ para promover a separação entre o plasma e os componentes vermelhos. O plasma foi coletado, submetido a extração por d-SPE e posteriormente analisado por análise direta no MPS-MS.

3.2 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO

Para síntese do M-MIP, os equipamentos utilizados foram: banho ultrassônico, modelo USC2800A (Unique, São Paulo, Brasil); chapa aquecedora, modelo NT103 (Novatécnica, São Paulo, Brasil); agitador mecânico, modelo TE-099 Unidade Potter (Tecnal, São Paulo, Brasil); banho-maria (Frigomix B) acoplado com termostato Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemanha); agitador de tubos horizontal (Glas-Col, Washington, EUA); e estufa à vácuo (Novatécnica, São Paulo, Brasil). A lavagem do material foi processada com auxílio de um agitador de tubos Vibrax VXR basic (IKA®, São Paulo, Brasil); agitador vórtex Lab Dancer S25 (IKA®, São Paulo, Brasil); e um ímã ferromagnético. Para o preparo das soluções foi utilizada balança analítica (Shimadzu®, Kyoto, Japão), e sistema de purificação de água MILLI-Q (Mendes *et al.*, 2020).

Para a caracterização dos materiais foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) IR System Shimadzu®; Termobalança, modelo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, EUA); espectrômetro UV/VIS KASUAKI Model: IL-593-BI Power: AC110/220 60Hz 3.15 A. Para a realização das análises dos analitos foi usada a técnica MPS-MS em um analisador de massa triplo-quadrupolo (LCMS8030, Shimadzu).

Foram preparadas soluções estoques de OXP, ATE, MET, LAB, PROP, NAD e PIN (todos da Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em metanol grau HPLC, colocadas em frascos âmbar e armazenadas a $-18,0^\circ \text{C}$ por até 30 dias. Soluções de trabalho de $0,1$ a $500,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram feitas diariamente diluindo as soluções estoque em metanol, secando as soluções padrão em secadora CentriVap® Concentrator LABCONCO e ressuspensando os padrões em um volume correspondente pool de amostra plasma humano branco (Santos *et al.*, 2015).

3.3 SÍNTESE DO M-MIP

A síntese do M-MIP foi executada em quatro etapas. Na primeira etapa foi feita a síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 pela metodologia de coprecipitação. Logo após, foi preparada uma etapa de modificação da superfície das nanopartículas magnéticas, com a finalidade de se impedir a agregação dessas nanopartículas, facilitando assim sua boa dispersão em solução, além de fixar em

sua superfície grupamentos vinílicos indispensáveis para a realização da próxima etapa que é a polimerização molecularmente impressa. Por fim, a última etapa foi o revestimento das partículas de M-MIP com albumina sérica bovina- BSA, com o intuito de excluir macromoléculas como as proteínas.

3.3.1 Síntese e modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4

A metodologia foi executada conforme protocolo pré-estabelecido por Franqui *et al.* (2015) no qual nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, em concordância com o trabalho de (Chen; Xie; Shi, 2013). 15 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10 mmol de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada, anteriormente aquecida à 80°C , sob fluxo de N_2 e agitação vigorosa. A em seguida, gotejou-se 50 mL de solução de hidróxido de amônio 28%. A reação foi mantida por 30 min, sob agitação contínua e fluxo de N_2 . Concluída a reação, o precipitado negro foi coletado e lavado com água deionizada até que o pH do sobrenadante se tornou neutro. Por último, o material foi seco em estufa à vácuo à 60°C por 24h.

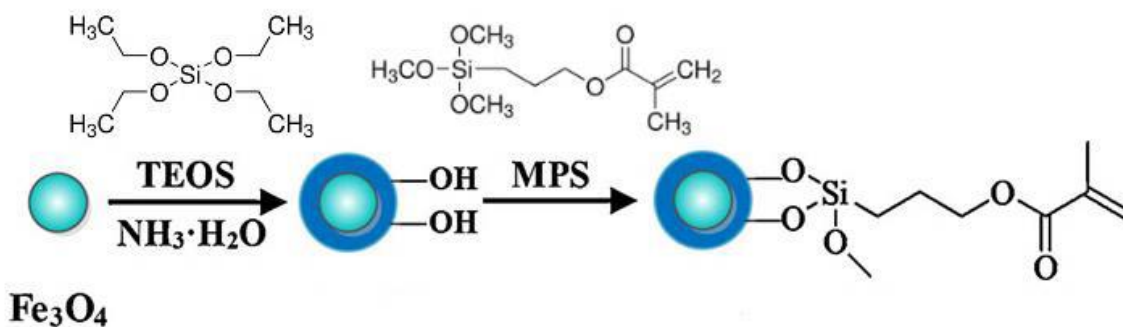
Posteriormente foi executada a etapa de modificação da superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 por silanização, a qual envolveu duas etapas: 1) estabilização das nanopartículas com tetraetilortosilicato (TEOS), 2) funcionalização com (trimethoxysilyl) propyl methacrylate (MPS), conforme ilustrado na (Figura 12).

A estabilização com TEOS foi efetuada segundo o trabalho de Zeng *et al.*, (2012). Para isto, foram acrescentados 300 mg de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 em 30 mL de um misto isopropanol-água deionizada (5:1, v/v). A mistura foi sonicada por 20 min para proporcionar a dispersão das nanopartículas. Então, 5 mL de solução de hidróxido de amônio 28% e 2 mL de TEOS foram adicionados rapidamente e sob agitação mecânica constante. A reação foi mantida por 12h, à temperatura ambiente e agitação frequente. As nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ foram recolhidas com imã externo, lavadas com água deionizada até o sobrenadante alcançou pH neutro e secas em estufa à vácuo, à 60°C por 24 h.

Finalmente a funcionalização com MPS foi realizada de acordo com o trabalho de Kong *et al.* (2012), com algumas modificações. Deste modo, 200 mg de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ foram dispersas em 50 mL de metanol e sonicadas

por 30 min. Logo após, 3 mL de MPS foram gotejados sob agitação vigorosa. A reação foi mantida à temperatura ambiente sob constante agitação por 48h. As nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$ obtidas foram então apanhadas com imã externo, lavadas com metanol até que o sobrenadante se tornasse cristalino e secas em estufa à vácuo, à 60°C por 24h.

Figura 12 - Método de sinalização.



Fonte: Chen, Xie e Shi (2013, p. 113); Franqui (2015, p. 31).

3.3.2 Síntese do M-Mip

A síntese do M-MIP foi executada conforme procedimento adaptados de Chen *et al.* (2013) e Figueiredo *et al.*, (2009), empregando-se o método de polimerização por precipitação. 0,4 mmol de OXP e 2,0 mmol de ácido metacrílico (MAA) como monômero funcional (MF) foram adicionados em 20 mL de acetonitrila (solvente de síntese) em um frasco 50 mL. 489 mg de nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$ foram adicionados em uma ampola de síntese contendo 20 mL de acetonitrila. Ambos os frascos foram sonicados por 1h. Em seguida, a solução contendo OXP e MF, foi vertida na ampola de síntese. 12,0 mmol de etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) como agente de ligação cruzada (ALC) e 80,0 mg de ácido 4,4' -azobis (4-cianoalérico) (ABCVA) como iniciador radicalar (IR) foram adicionados à ampola de síntese.

A mistura reacional foi submetida ao ultrassom por mais 30 minutos e purgada com nitrogênio por 15 minutos, com a finalidade de eliminar o oxigênio presente no meio reacional. Em seguida, a ampola foi selada e imersa em banho-maria a 75°C , sob agitação mecânica por 24 h, tempo este necessário para a completa reação de polimerização. O material resultante foi recolhido com um imã externo e lavado várias vezes com uma mistura de metanol: ácido acético (9:1, v/v) para a completa

eliminação do OXP. Logo após, foi efetuada a lavagem com metanol puro a fim de se eliminar resquícios de ácido acético. Finalmente as partículas obtidas foram secas a 60°C em estufa por 24 h.

Um polímero não impresso magnético (M-NIP) foi sintetizado de acordo com mesmo protocolo, mas na ausência da molécula modelo.

3.4 REVESTIMENTO DO M-MIP COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) PARA OBTENÇÃO DO M-RAMIP

A obtenção do M-RAMIP foi conduzida por metodologia adaptada dos trabalhos de Moraes et al. (2013) e de (Mendes et al., 2020). Para tal, adicionou-se 500 mg do material (M-MIP) e 20 mL de uma solução de BSA 1% preparada em solução tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 6,0 em um tubo de vidro com tampa de 50 mL. O tubo foi levado ao banho ultrassônico por 10 min. Após estes primeiros 10 min, o tubo ficou em repouso por mais 10 min fora do banho ultrassônico e sendo agitado manualmente de tempos em tempos. Com o auxílio de um imã permanente que foi aproximado até a parede do tubo, o material foi separado do sobrenadante.

O sobrenadante foi descartado. Posteriormente, 5mL de uma solução de glutaraldeído 25% (m/v) foi adicionada ao tubo e o tubo foi agitado em agitador horizontal por 5 h em velocidade mínima. Após este tempo, o sobrenadante foi desprezado com a ajuda do imã permanente. Adicionou-se, logo após, 10 mL de borohidreto 1% (m/v) e após agitação manual por alguns minutos (para dispersar um pouco o gás produzido), o tubo foi fechado e agitado por 15 min em velocidade mínima no agitador horizontal. Desprezou-se o sobrenadante mais uma vez com a ajuda do imã permanente e lavou-se o material com água várias vezes a fim de retirar resquícios das soluções utilizadas. O M-RANIP (polímero de impressão molecular de acesso restrito magnético) foi obtido pelo mesmo protocolo de revestimento, mas partindo-se do do M-NIP.

3.4.1 FT-IR

A investigação da eficiência das distintas etapas de revestimento das nanopartículas magnéticas se deu por meio de análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Para obtenção dos espectros de

infravermelho foi utilizado um espectrofotômetro FT-IR com refletância total atenuada (ATR). A análise foi feita por contato direto das nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$, M-MIP e M-RAMIP sob o feixe de IV, com resolução 4 cm^{-1} , 128 scan e limites entre 4000 a 400 cm^{-1} .

3.4.2 Porosimetria de sorção de nitrogênio- BET

A análise da área superficial e porosidade (BET) foi obtida utilizando nitrogênio gás como adsorvente, um tempo de equilíbrio de 10 segundos e a pressão relativa de 0,01 a 0,3. O equipamento usado foi um Gemini VII, versão 3.03 (modelo 2390 t).

3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura- SEM

O tamanho e a morfologia das amostras de F_3O_4 , $\text{F}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-TEOS}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$, M-MIP e M-NIP foram analisados utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). Foi utilizado um microscópio Zeiss Supra 35VP Field Effect Electron Gun (FEG-SEM), operando a 10 keV e spot 3. Para preparar as amostras, foram colocados pequenos fragmentos de amostras num substrato de silício, fixados com fita de carbono. Finalmente, as amostras foram secas em estufa a 40°C durante 12 horas. A SEM é uma técnica de análise de alta resolução normalmente utilizada para investigar a estrutura e a morfologia dos materiais a escalas micro e manométricas.

A SEM-EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) é particularmente valiosa para examinar a interação entre as nanopartículas e a superfície dos nanotubos, especificamente a distribuição das nanopartículas de magnetita. A análise utilizando um detetor de raios X dispersivos em energia 2D (EDX ou EDS) foi efetuada com mapeamento 2D a 25 keV e ponto 4. As imagens EDS 2D foram geradas com base na energia libertada pela emissão de $\text{O K}\alpha$ e $\text{Fe L}\alpha 1$.

3.5 TESTES DE EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS

Os testes de exclusão de proteínas foram realizados em triplicata e a partir de adaptações de metodologias revisadas em literatura (De Oliveira *et al.*, 2019).

Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mg do material e 1 mL de uma solução de albumina sérica humana (HSA), 200 mg L⁻¹, preparada em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 7,2). Os tubos foram agitados a 1200 rpm por 10 min. Após a agitação, os materiais foram separados com o auxílio de um ímã externo e uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo. Nesse recipiente, foram adicionados 2,8 mL do reagente de Bradford. Esperou-se 10 min para que ocorresse a reação e as amostras foram lidas a 595 nm. Destacando que o espectrofotômetro foi zerado com tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 7,2) mais o reagente de Bradford (após 10 min de reação).

Um padrão de HSA (200 mg L⁻¹), que não passou pelo processo de extração, foi tratado com o reagente de Bradford e lido em espectrofotômetro, assim como descrito logo acima. A absorbância desse padrão foi empregada como correspondente a 100% de BSA. Desse modo, foi possível calcular a porcentagem de HSA que permaneceu no sobrenadante após a extração com os M-MIPs, M-NIPs, M-RAMIPs e M-RANIPs sintetizados. Ou seja, a quantidade de proteínas excluídas pelos materiais.

3.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE DE BETABLOQUEADORES EM LC-MS/MS

Para otimizar as condições do espectrômetro de massas foram realizadas injeções diretas de solução analítica padrão de 1 mg/L dos anti-hipertensivos (PROP, ATE, OXP, PIN, NAD, LAB e MET e atenolol deuterado (ATE D₇), de maneira individual. Foi possível escolher o melhor modo de ionização da fonte, a voltagem do cone, a energia de colisão e a temperatura da fonte, dentro da faixa indicada pelo fabricante. O modo *Eletrospray ionization* (ESI) foi selecionado em positivo para todos os fármacos.

O solvente usado foi o metanol: água ultrapura na proporção (90:10 v/v). O tempo de corrida foi programado para 1 min, sem uso de coluna analítica. Fluxo total de solvente foi de 0,4 mL/min. *Nebulizing gas flow* de 2 L/min. Temperatura da DL de 250 °C. Temperatura da *Heat block* a 400 °C. Fluxo do gás de secagem a 15 L/min. Em seguida a otimização dessas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para a qualificação e quantificação dos betabloqueadores e o método foi criado no modo *multiple reaction monitoring* (MRM).

3.6.1 Teste de pH de extração e avaliação da capacidade adsortiva do M- NIP, M-MIP, M-RANIP e M-RAMIP

Este teste teve como objetivo avaliar qual seria o pH ótimo para a extração dos fármacos, bem como a capacidade adsortiva dos materiais sintetizados. O teste foi realizado da seguinte maneira:

- a) 500 μL de um padrão misto contendo na concentração de 1 mg/L foram adicionados em três tubos Eppendorf de 1,5 mL;
- b) 1 mL de uma solução padrão mista de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de OXP, ATE, MET, LAB, PROP, NAD e PIN em água foi adicionado em três Eppendorf de 1,5 mL, sendo pH de cada uma ajustado para i) básico (adicionando 1 gota de hidróxido de amônio concentrado); ii) neutro (não adicionando nada) e iii) pH ácido (adicionando 1 gota de ácido fórmico concentrado);
- c) Em seguida, adicionou-se em cada tubo 0,5 mg de M-MIP, e os tubos foram agitados por 30 min.;
- d) As partículas de M-MIP foram atraídas por um ímã de neodímio e o sobrenadante foi descartado;
- e) Em seguida, adicionou-se 1 mL de metanol em cada tubo, seguido de agitação por mais 30 min;
- f) Finalmente, as partículas foram atraídas pelo ímã de neodímio, e o sobrenadante foi transferido para um vial e analisado por LC-MS/MS com fonte ESI.

O procedimento foi executado em triplicata. O mesmo experimento foi conduzido também para M-NIP.

3.7 ESTUDOS DE ADSORÇÃO

Para os estudos cinéticos, 10 mg do M-MIP e 2 mL de solução de propranolol 50 mg L^{-1} , preparada em tampão fosfato (0,01 mol L^{-1} , pH 7,0), foram adicionados a 8 tubos que foram agitados durante 0,3; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 ou 45,0 min, a 25 °C. Após cada tempo de agitação, os tubos foram centrifugados (1.000 g durante 5 min), e o propranolol remanescente no sobrenadante (concentração de equilíbrio, C_e) foi determinado por LC-ESI-MS/MS. Foi utilizado metanol: ácido fórmico (9:1, v/v) como fase móvel (0,4 mL min^{-1}) e foram injetados 10 μL da amostra.

A concentração inicial (C_0 , em mg L^{-1}), a concentração de equilíbrio (C_e , em mg L^{-1}), a massa do adsorvente (m , em g) e o volume da solução (V , em L) foram as outras variáveis utilizadas para calcular a capacidade de adsorção (q_e , em mg g^{-1}), de acordo com a Equação 1:

$$q_e = [(C_0 - C_e)/m] \times V \quad (\text{Equação 1})$$

Os dados foram tratados com modelos de cinética de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, ordem fracionária e Elovich. O que melhor se ajustou aos dados foi selecionado pelo elevado coeficiente de correlação (R^2) e pelas baixas funções de erro (F_{error}) (Equação 2), em que n e p são o número de experiências e parâmetros, respectivamente, e $q_{e,\text{teórico}}$ é cada valor de q_e obtido pelo modelo ajustado.

$$F_{\text{error}} = \sqrt{\left[1/(n-p)\right] \sum_i^n (q_e - q_{e \text{ theoretical}})^2} \quad (\text{Equação 2})$$

Para os estudos de absorção isotérmica, 2 mL de 10, 50, 100, 150, 200 e 300 mg L^{-1} de solução de propranolol (preparada em tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} , pH 7,0) foram adicionados individualmente a 6 tubos contendo 10 mg de M-MIP. Os tubos foram agitados durante 15 min e centrifugados (1.000 g durante 5 min), e o propranolol remanescente no sobrenadante foi analisado por LC-MS/MS como descrito acima. Os valores de q_e foram calculados pela Equação 2, e os dados foram tratados com os modelos de isoterma de Freundlich, Langmuir e Sips. Como descrito acima, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi selecionado pelo coeficiente de correlação elevado (R^2) e pelas funções de erro baixas (F_{error}) (Equação 2).

Todas as experiências cinéticas e isotérmicas foram efetuadas em triplicata, tendo sido realizados os mesmos protocolos para empregando o M-NIP.

3.8 ESTUDOS DE SELETIVIDADE

Para as experiências de seletividade, foram avaliadas as seguintes soluções binárias:

- a) pindolol/propranolol;
- b) pindolol/metoprolol;
- c) pindolol/nadolol;
- d) pindolol/labetalol;
- e) propranolol/metoprolol;
- f) propranolol/nadolol;
- g) propranolol/labetalol;
- h) metoprolol/propranolol;
- i) metoprolol/nadolol;
- j) metoprolol/labetalol;
- k) nadolol/propranolol;
- l) nadolol/metoprolol;
- m) nadolol/labetalol;
- n) pindolol/haloperidol;
- o) pindolol/fluoxetina;
- p) pindolol/amitriptilina;
- q) pindolol/diazepan;
- r) pindolol/carbamazepina;
- s) pindolol/haloperidol;
- t) pindolol/tetraciclina.

Cada solução consistia em dois fármacos, ambos a uma concentração de 50 mg L⁻¹, preparados em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7.

Para as experiências, 10 mg de M-MIP e 2 mL das soluções binárias foram adicionados individualmente em tubos falcon de 15 mL. Os tubos foram agitados durante 15 minutos e depois centrifugados (1.000 g, 5 min). O sobrenadante foi recolhido para ser analisado por LC-ESI-MS/MS, utilizando metanol: ácido fórmico (9:1, v/v) como fase móvel (0,4 mL min⁻¹) e foram injetados 10 µL da amostra. O mesmo foi feito com o M-NIP, alterando apenas o material adicionado.

As capacidades de adsorção do M-MIP e do M-NIP para cada composto foram calculadas pela Equação 1, e a constante de ligação (k) foi determinada de

acordo com a Equação 3, em que q_1 e q_2 são as capacidades de adsorção do M-MIP para cada um dos fármacos na solução binária.

$$k = \frac{q_1}{q_2} \quad (\text{Equação 3})$$

Finalmente, as constantes de seletividade (α) foram obtidas de acordo com a Equação 4. k_{M-MIP} é a constante de ligação das partículas M-MIP e k_{M-NIP} das M-NIPs.

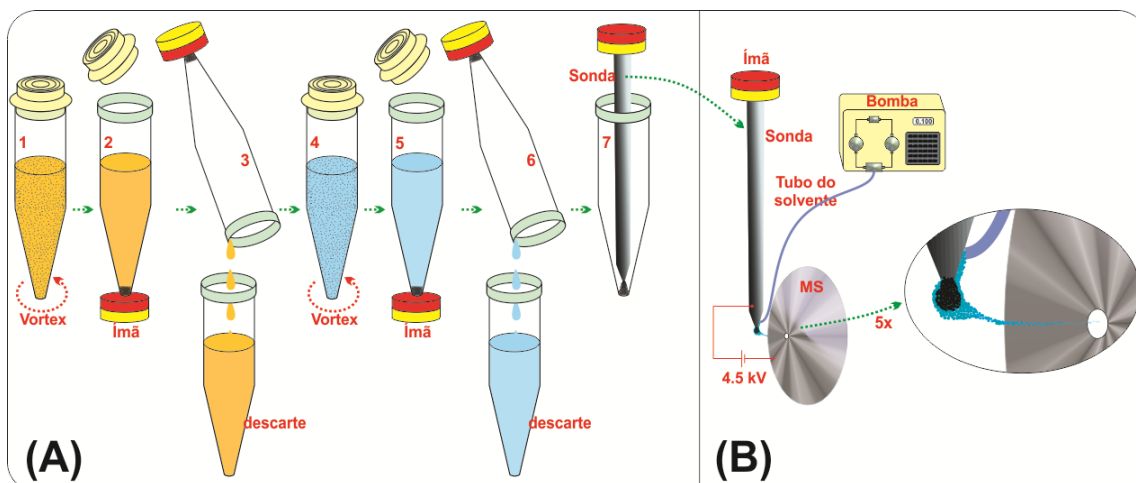
$$\alpha = \frac{k_{M-MIP}}{k_{M-NIP}} \quad (\text{Equação 4})$$

3.9 PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DISPERSIVA SEGUIDA DE ANÁLISE POR MPS-MS

A d-SPE (figura 13 (A)) foi feita com 0,5 mg de M-MIP. Para transferir essa pequena quantidade de sorvente foi preparada uma suspensão de 25 mg de M-MIP em 2,5 mL de água, que foi colocada em um tubo falcon de 15 mL, e agitado em vórtex constantemente, enquanto uma alíquota de 50 μ L da suspensão foi colhida e adicionada em um Eppendorf de 1,5 mL, contendo 100 μ L de plasma fortificado com os betabloqueadores e o P.I. A suspensão foi agitada por 20 min, e o material foi separado por um imã, e lavado com 200 μ L de água para eliminar o plasma residual. Um imã de neodímio foi colocado para atrair todo o material magnético para o fundo do tubo.

O imã foi então afastado (movimento vertical descendente) do fundo do eppendorf, e uma sonda metálica cilíndrica pontiaguda (com um imã em sua extremidade superior) foi inserida dentro eppendorf de modo a atrair as partículas de M-MIP para ponta da sonda (Figura 13 (A)). A sonda foi posicionada em frente à entrada do espectrômetro de massas, de modo que o capilar responsável por direcionar o solvente e o fio de alta tensão estivessem encostados na sonda, como na Figura 13 (B). Metanol acidificado com 1% de ácido fórmico a um fluxo de 0,1 mL min^{-1} e 4,5 kV de tensão foram empregados durante as análises (Mendes, 2023 (Não publicado)).

Figura 13 - Ilustração da extração em fase sólida dispersiva



Fonte: Autor (2024)

Legenda: (A) e espectrometria de massas com ionização a partir de partículas magnéticas (MPS-MS) (B). 1) amostra de plasma com as partículas de M-MIP. 2) Atração das partículas de M-MIP para o fundo do tubo por um ímã. 3) Descarte do plasma. 4) adição de água como solução de lavagem. 5) Atração das partículas de M-MIP para o fundo do tubo por um ímã. 6) Descarte da água de lavagem. 7) Captura das partículas de M-MIP pela sonda magnética.

Três protocolos de análise no MS foram avaliados para os anti-hipertensivos OXP, ATE, MET, LAB, PROP, NAD e PIN. A corrida de 1 minuto para o protocolo 1 e 2 e 1,10 min para o protocolo 3, foi programada da seguinte forma:

1) Protocolo 1

- Ângulo α de inclinação da sonda metálica com a horizontal foi de 60° ;
- Temperatura da *DL*: 250°C e *Heat Block Temperature*: 400°C , durante toda a análise;
- 0,01-0,35 minutos: as condições de fluxo do *nebulizing gas*, fluxo do solvente e voltagem da interface (+) foram $0,5\text{ L min}^{-1}$, $0,0\text{ mL min}^{-1}$ e $0,0\text{ kV}$;
- 0,36-0,70 minutos: o fluxo do solvente foi aumentado para $0,1\text{ mL min}^{-1}$;
- 0,50-0,69 minutos: a voltagem da interface foi aumentada para $4,5\text{ kV}$;
- 0,70-0,99 minutos: a voltagem da interface foi diminuída para $0,0\text{ kV}$ e o fluxo do solvente foi reduzido a $0,0\text{ mL min}^{-1}$;

- g) 0,99- 1,00 minutos: o detector da alta voltagem e o fluxo do *nebulizing gas* foram desabilitados.

Todas as etapas da análise foram feitas com o *drying gas* desabilitado (Mendes, 2023, [Não publicado]).

2) Protocolo 2

- a) Ângulo α de inclinação entre a sonda metálica e a horizontal foi de 90° (exatamente como na Figura 13 B);
- b) O fluxo do *Nebulizing Gas*: 0,5 L/min, temperatura da DL: 250°C e temperatura do *Heat Block T*: 400°C , durante toda a análise;
- c) 0,01- 0,19 minutos: as condições de fluxo de solvente, voltagem da interface (+) são de $0,0\text{ mL min}^{-1}$ e 0,0 kV; e *drying gas flow* de $3,0\text{ L min}^{-1}$;
- d) 0,20- 0,30 minutos: o fluxo de solvente foi aumentado para $0,05\text{ mL min}^{-1}$ e o *drying gas flow* foi desligado;
- e) 0,31- 0,55 minutos: o fluxo de solvente foi zerado;
- f) 0,55 a 0,6 minutos: o fluxo de solvente foi aumentado para $0,1\text{ mL min}^{-1}$ e a voltagem da interface (+) foi aumentada para 5,0 kV;
- g) 0,9 minutos: O detector HV e o *nebulizing Gas Flow* foram desligados.

3) Protocolo 3

- a) Ângulo α de inclinação entre a sonda metálica e a horizontal foi de 90° .
- b) O fluxo do *Nebulizing Gas*: 2 L min^{-1} , temperatura da DL: 250°C e temperatura do *Heat Block T*: 400°C , durante toda a análise.
- c) de 0,001- 0,19 minutos: acionamento da voltagem da interface para +4,50 kV; *drying gas flow* de $3,0\text{ L min}^{-1}$; e fluxo de solvente $0,0\text{ mL min}^{-1}$.
- d) 0,2 minutos: o *drying gas flow* foi desligado;
- e) 0,25 - 0,70 minutos: o fluxo de solvente foi aumentado para $0,14\text{ mL min}^{-1}$
- f) 0,80 minutos: o fluxo de solvente foi zerado;
- g) 0,20 - 1,08 minutos: a voltagem da interface (+) foi aumentada para 5,0 kV;
- h) 1,09 minutos: O detector HV e o *nebulizing Gas Flow* foram desligados.

3.9.1 Construção de curva analítica em água e plasma por MPS-MS de acordo com os protocolos 2 e 3

Para o protocolo 2, curvas analíticas foram construídas em água ultrapura usando do dispositivo MPS-MS, com o objetivo de testar os novos ajustes e avaliar as figuras de mérito. Foram feitos os seguintes pontos: branco; 20; 50; 100; 150; 200; 300; 400 e 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ dos betabloqueadores e 300 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de P.I para todos os pontos, incluindo o branco. Foi usado como solvente metanol- ácido fórmico (99:1 v/v) e 0,5 mg de M-MIP.

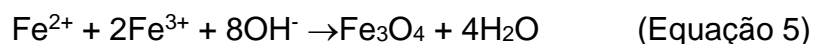
Para o protocolo 3, as curvas analíticas foram construídas a partir de um conjunto de amostras de plasma humano em branco ($n = 10$) simultaneamente fortificadas com ATE, MET, LAB, PROP, NAD, PIN e OXP. As concentrações de 3, 6, 10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram analisadas em sextuplicatas. O ATE D7 foi utilizado como padrão interno a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os sinais analíticos foram obtidos pelas áreas relativas dos picos entre a substância a analisar e o padrão interno. Os dados foram ajustados de acordo com o modelo linear e o coeficiente de determinação (R^2) foi utilizado para avaliar a linearidade.

A precisão e a exatidão foram expressas como desvio padrão relativo (RSD%) e erros relativos (RE%), respectivamente. Os limites de quantificação (LOQ) foram definidos como as concentrações mais baixas que podiam ser analisadas com precisão e exatidão, enquanto os limites de detecção (LOD) foram calculados a partir das curvas de calibração e definidos como 3 vezes a relação sinal-ruído.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

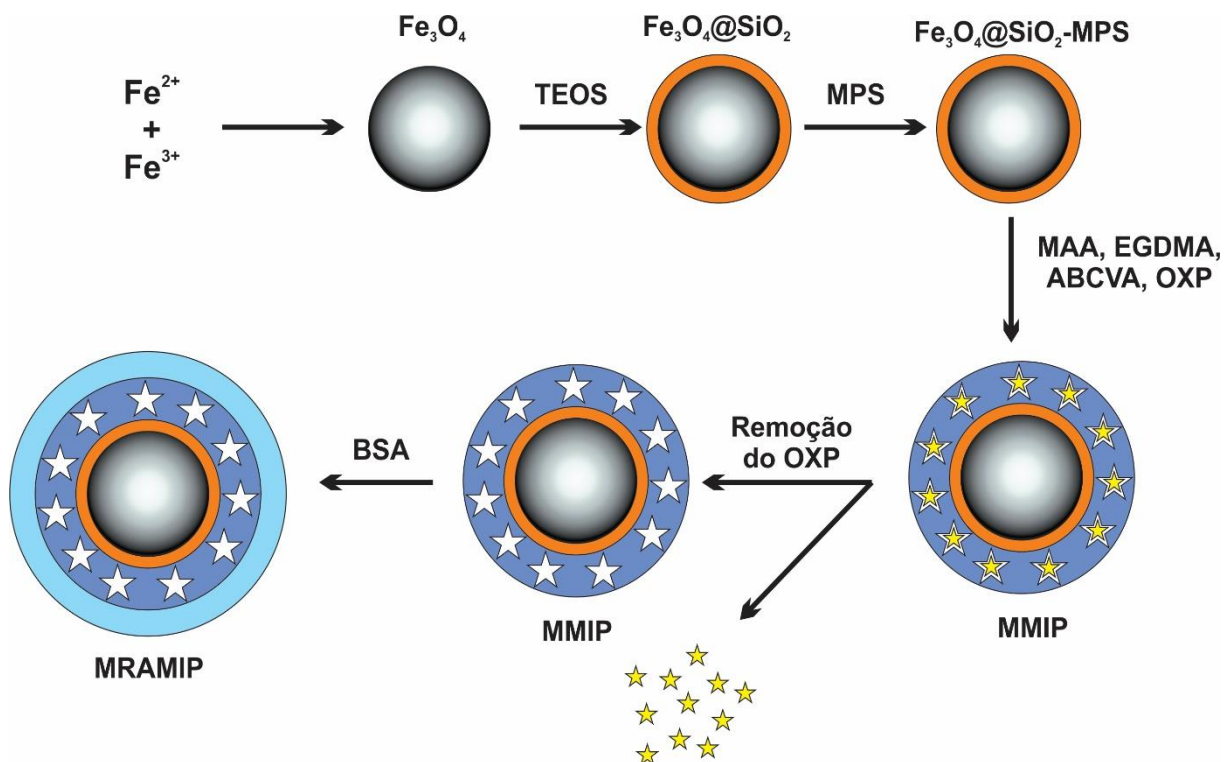
4.1 SÍNTESE DO M-MIP

Partindo da metodologia descrita acima, as nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas pelo método de co-precipitação, que é considerado por Santhosh *et al.* (Santhosh; Ulrih, 2013) um dos mais simples para a síntese de óxidos de ferro magnéticos. Essa síntese foi elaborada há mais de 30 anos, na atualidade existe uma diversidade muito grande de modificações desse método de obtenção de magnetita. Basicamente o método consiste na co-precipitação de Fe^{2+} com Fe^{3+} , conforme a Equação 5.



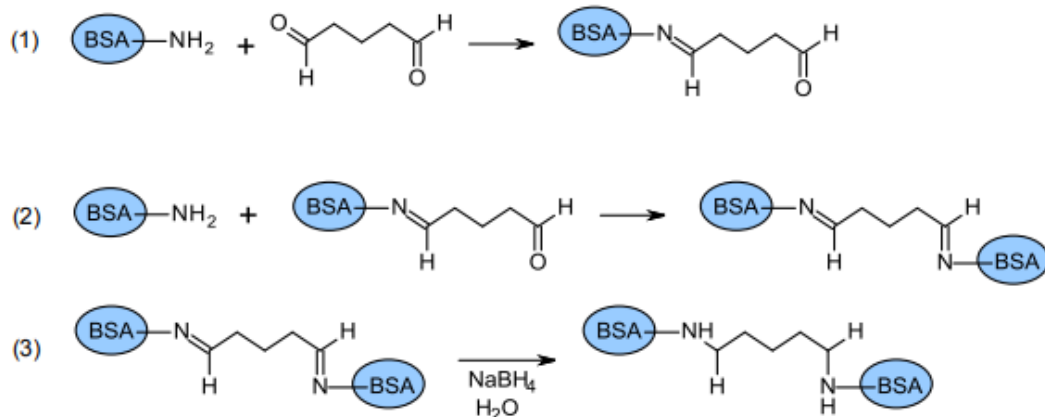
A síntese final de magnetita rendeu 1.970 mg de partículas negras com propriedade magnética. Em seguida, a magnetita foi revestida com TEOS, formando o composto $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, que rendeu 825 mg por tubo de 50 mL de síntese. Que foi funcionalizado em seguida com o MPS, resultando no material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$, com um rendimento de 743 mg. Logo em seguida, as partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$ foram usadas para sintetizar o M-MIP e M-NIP. A diferença do M-MIP (Figura 14) para o M-NIP se dá pela molécula molde (OXP) que é usada apenas no primeiro. O rendimento de M-MIP foi de 1794,3 mg e M-NIP foi de 830,60 mg. Finalmente os M-MIPs e M-NIPs foram revestidos com o BSA (Figura 15) tornando-se os M-RAMIPs com o rendimento de 482,30 mg e os M-RANIPs 430,8 mg.

Figura 14 - Esquema de formação de M-MIP usando a molécula molde



Fonte: Adaptado Huang *et al.* (2015, p. 230)

Figura 15 - Na etapa 1 está representado a reação que ocorre entre o grupamento amina da BSA e o aldeído do glutaraldeído. Em 2 está representado a reação entre o aldeído livre do complexo BSA-glutaraldeído e o grupo amina de outra molécula de albumina, permitindo assim a formação da rede de BSA em volta do RAMIP. Por fim, em 3 está representado a conversão das iminas em aminas com a adição do borohidreto.



Após serem sintetizados os M-MIPs (Figura 16) foram lavados com metanol e ácido acético (9/1, v/v), e em seguida lavados apenas com metanol para a remoção completa do ácido. A etapa de lavagem tem a finalidade de remover o OXP usado como molécula molde do M-MIP durante a síntese e tem sido uma etapa desafiadora, tendo em vista que mesmo depois de 50 etapas de lavagem o M-MIP ainda apresentou liberação de OXP (monitoramento de OXP na solução de lavagem por HPLC, figura 21). Os polímeros (Figura 17) foram secos em estufa a 60 °C por 24 h.

Figura 16 - M-MIPs sendo atraídos pelo imã durante a etapa de lavagem.



Fonte: Autora (2024).

A figura 17 apresenta os todos os passos da sintetização do M-MIP. A magnetita apresenta-se na cor preta e os outros materiais variam tons de marrons. Cada material tem sua cor característica, como na foto. Uma forma de confirmar que a síntese foi reprodutível é comparando a cor do material com sínteses anteriores.

Figura 17 - Foto contemplando cada etapa de sintetização das nanopartículas M-MIP usada para preparo de amostras deste trabalho.



Fonte: Autora (2024).

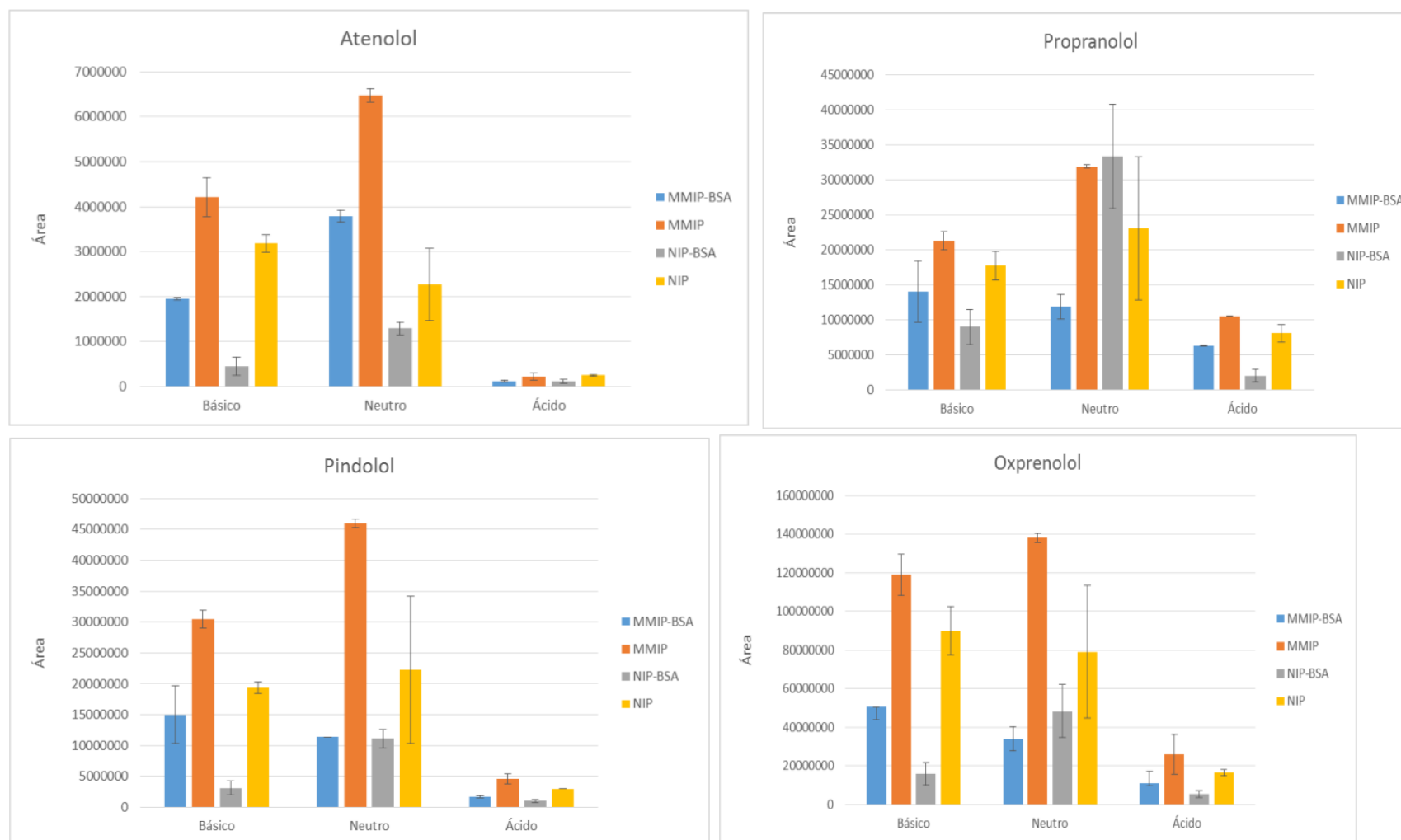
4.2 TESTE DE PH DE EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ADSORTIVA DO M-NIP, M-MIP, M-RANIP E M-RAMIP

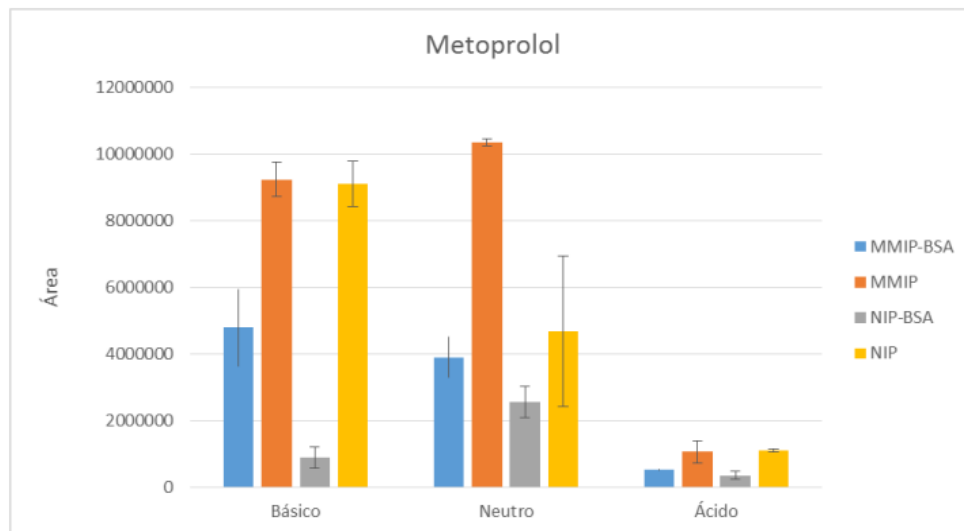
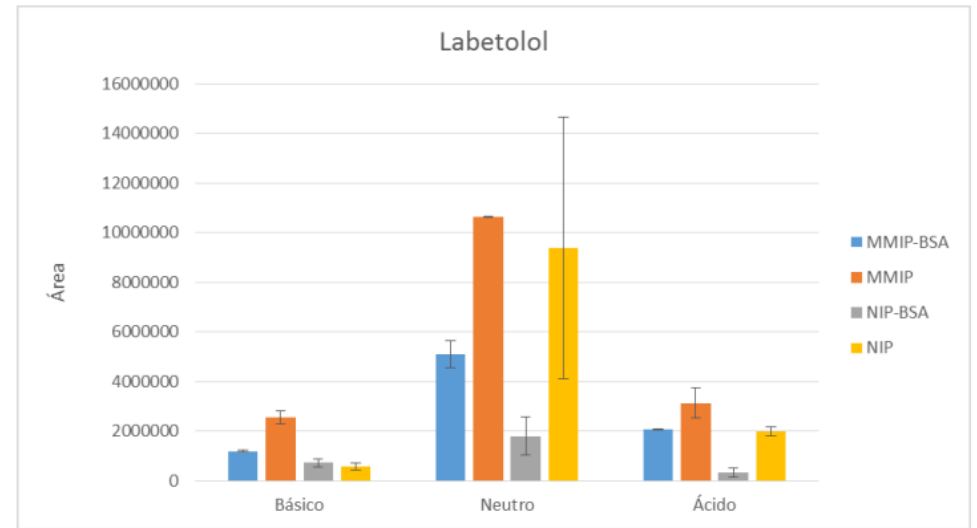
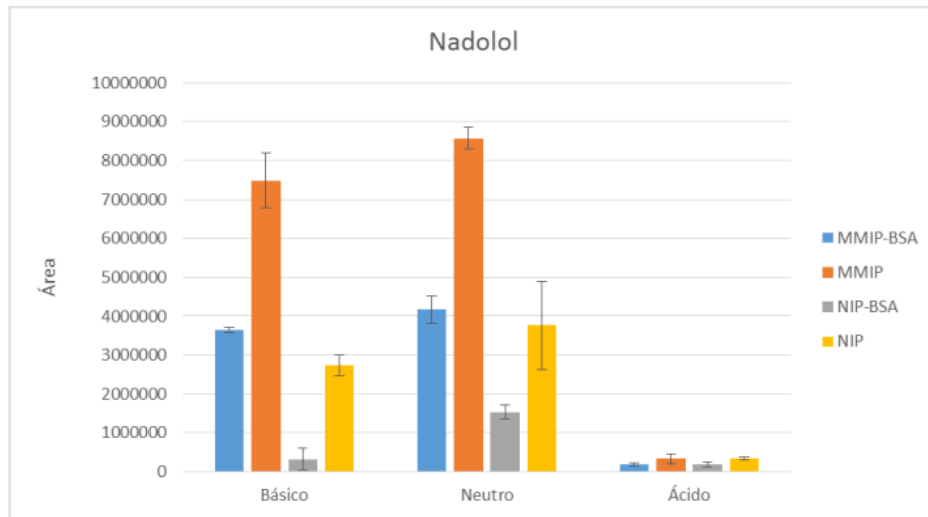
Esta análise foi feita usando a fonte ESI do LC-MS/MS, que estava sem coluna, conectado apenas pelo tubo *peek*. Foi injetado no equipamento 20 μL do eluente de extrações de soluções mistas de padrões (OXP, ATE, MET, LAB, PROP, NAD e PIN) na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, em triplicata, para as condições: básico, neutro e ácido. Os experimentos foram realizados para os materiais M-NIP, M-MIP, M-RANIP e M-RAMIP.

Por meio deste teste foi escolhido o material para a sequência do trabalho, bem como pH do meio para a extração dos fármacos. Como mostra os gráficos da figura 18, o M-MIP apresentou a melhor capacidade adsortiva para as moléculas. Com exceção para o PROP que teve a melhor performance com o M-RANIP, mas com pouca diferença para o M-MIP. Para PIN a melhor resposta foi obtida com M-RAMIP.

O melhor de meio extração para todas os anti-hipertensivos usados neste estudo foi o neutro, com maior sinal analítico. O perfil dos cromatogramas obtidos por LC-MS/MS com fonte ESI, sem coluna, com um misto de padrões nas concentrações de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$, M-MIP como sorvente e meio de extração básico está sendo mostrado na figura 19.

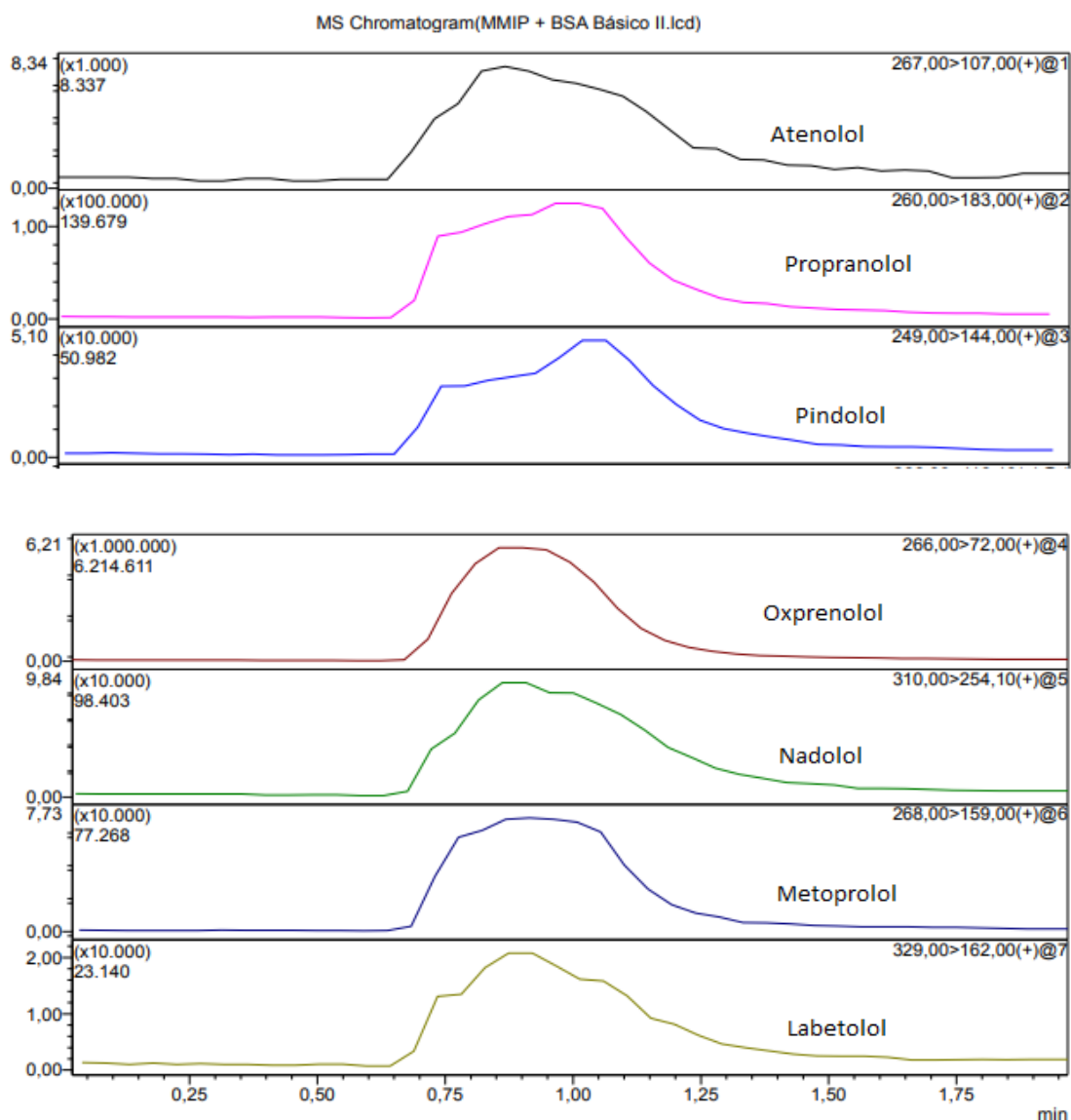
Figura 18 - Gráficos de área x meio de extração para os betabloqueadores e o desempenho dos materiais quanto a sua capacidade de adsorção e dessorção de analitos.





Fonte: Autora (2023)

Figura 19 - O perfil dos Cromatogramas obtidos por LC-MS-MS fonte ESI, sem coluna, com um misto de padrões nas concentrações de 500 µg.L-1, M-MIP como sorvente e meio de extração básico (Intensidade x tempo em minutos).



Fonte: Autora (2023).

Diante desses resultados obtidos optou-se pelo sorvente M-MIP para dar continuidade no trabalho, pois ele foi o material que apresentou os melhores resultados para a adsorção e dessorção dos fármacos e ainda é por apresentar maior suscetibilidade magnética. Outro fator que colaborou com a escolha o M-MIP foi ele ter tido uma grande porcentagem de exclusão de proteínas. O meio de extração escolhido foi o neutro pelas melhores eficiências de extração. Estas

condições ótimas foram usadas para dar seguimento neste trabalho.

4.3 CARACTERIZAÇÃO

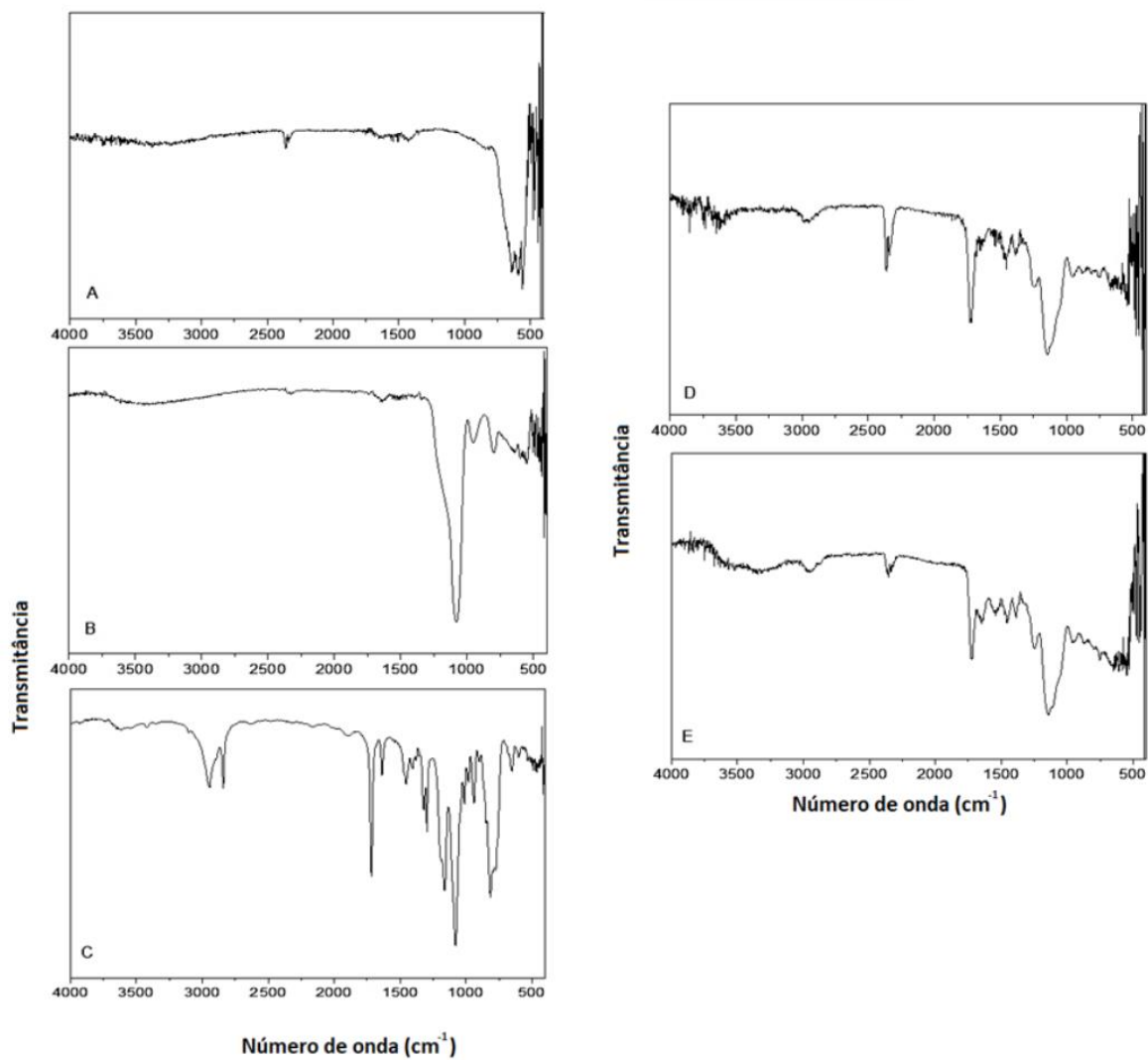
4.3.1 Caracterização dos materiais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Nos espectros de FT-IR nanopartículas de Fe_3O_4 , (Figura 20 A) há uma banda intensa em aproximadamente 550 nm, característica da vibração de estiramento da ligação Fe-O ($\nu_1 \approx 600\text{--}550\text{ cm}^{-1}$), confirmando assim a presença do ferro e de sua ligação com o oxigênio formando a estrutura da magnetita (BULÁNEK; HRDINA; HASSAN, 2019). Nos espectros referentes a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-MPS}$, (Figura 20 B e C), respectivamente, encontram-se as bandas de absorção em 1080, 950 e 800 cm^{-1} .

Estas caracterizam as vibrações de estiramento das ligações Si-O-Si, Si-O-H e Si-O, respectivamente, indicando um revestimento eficiente das partículas de Fe_3O_4 com TEOS e MPS. O espectro FT-IR do M-MIP (Figura 20 D) apresenta bandas de absorção que confirmam a presença da cadeia polimérica na superfície da partícula de Fe_3O_4 . A banda intensa de absorção que aparece em 1724 cm^{-1} caracteriza a vibração do estiramento de C=O de ésteres e, as bandas 1235 e 1147 cm^{-1} caracterizam a vibração de estiramento de C-O de ésteres. Estes ésteres são originários do EGDMA. Ademais, as bandas 2950 e 1456 cm^{-1} são pertinentes ao estiramento da ligação C-H de carbono sp^3 e a deformação assimétrica deste CH_3 , respectivamente. Isso foi observado por Bruna *et al.* (2013), confirmando a presença da camada polimérica no material

Ao comparar os espectros do material sem revestimento com BSA (Figura 20D) e com revestimento com BSA (Figura 20E), nota-se que ambos os espectros se assemelham e quase se sobrepõem. Acredita-se que, como o IV não foi capaz de especificar o suficiente para perceber o revestimento, outras técnicas de caracterizações podem ilustrar a presença da camada de BSA no M-RAMIP quando comparado ao M-MIP.

Figura 20 - Espectros de infravermelho



Fonte: Autora (2023)

Legenda: a) Fe₃O₄.

b) Fe₃O₄@SiO₂,

c) Fe₃O₄@SiO₂-MPS,

d) M-MIP,

e) M-RAMIP.

4.3.2 Porosimetria de sorção de nitrogênio- BET

A porosimetria de sorção de nitrogênio envolve uma massa fixa de polímero seco sendo exposta a um gás (geralmente nitrogênio) em uma série de pressões fixas. Informações sobre a área de superfície específica (m^2/g), volume de poro específico (mL/g), o diâmetro médio dos poros e a distribuição do tamanho dos poros podem ser extraídas. Os tamanhos dos poros também foram calculados pelo método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) assumindo um modelo de poro cilíndrico. O método é particularmente útil para analisar em detalhes poros de tamanho médio (meso) e pequeno (micro). (As definições IUPAC de tamanho aplicadas aos poros são as seguintes: microporos <2 nm; mesoporos 2 nm $<$ 50 nm; macroporos >50 nm) (CORMACK; ELORZA, 2004). A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para M-MIP, M-NIP, M-RAMIP e M-RANIP.

Tabela 1 - Parâmetros de estrutura de poros de M-NIP, M-MIP, M-RANIP e M-RAMIP

Amostra	Área de superfície (m^2/g)	Volume de poros (cm^3/g)	Diâmetro médio dos poros (A)
M-NIP	2,3102	0,000604	20,876
M-MIP	13,2364	0,005254	18,966
M-RANIP	2,6129	0,000721	19,361
M-RAMIP	9,4249	0,001889	20,193

Fonte: Autora (2023)

A área superficial calculada para M-RANIP foi apenas ligeiramente maior que a do M-NIP, provavelmente devido à presença da camada porosa de BSA. Já para o M-RAMIP, a área superficial foi menor em relação ao M-MIP. Provavelmente a presença da molécula molde também modificou o tamanho dos poros. Quando este polímero impresso, no caso o M-MIP, é revestido por BSA, esta rede de proteína pode interferir na técnica de caracterização obstruindo parte do poro e assim diminuindo seu volume e área superficial (Mendes, 2018).

O M-MIP tem um maior volume de poros em relação ao M-NIP, o que já era de se esperar, pois o primeiro foi sintetizado com uma molécula molde, agregando a esses materiais sítios seletivos de reconhecimento capazes de se ligar seletivamente a uma molécula-alvo. Já os diâmetros médios de poros dos materiais são parecidos.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura- SEM

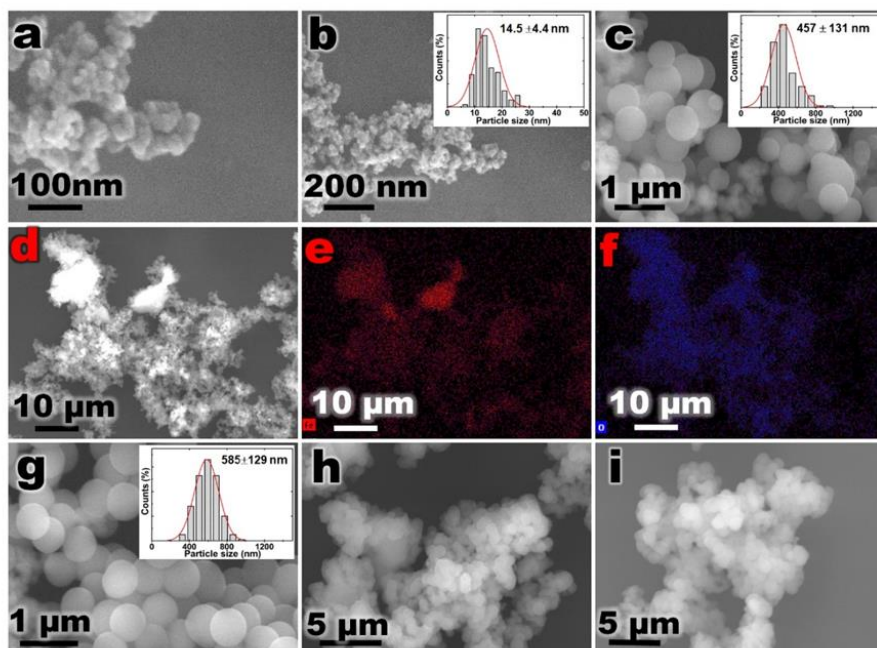
Os aspectos morfológicos e estruturais de todos os materiais (F_3O_4 , $F_3O_4@SiO_2$, $F_3O_4@SiO_2$ -MPS, M-MIP e M-NIP) foram avaliados por SEM. A análise das nanopartículas de Fe_3O_4 (Figuras 21a e 21b) mostrou que os tamanhos individuais eram menores que 15,4 nm, mas apresentavam a tendência de formar aglomerados maiores que 1 μm . As Figuras 21 mostraram que os aglomerados de nanopartículas magnéticas estavam distribuídos.

As imagens SEM também demonstraram o tamanho homogêneo de $F_3O_4@SiO_2$ (Figura 17 e Figura 21). O histograma da imagem SEM (Figura 21c) indicou um diâmetro de partícula de 457 ± 131 nm. A distribuição homogênea das nanopartículas de magnetita sugere que as partículas se encontram devidamente dispersas no material (FAKHRHOSEINI *et al.*, 2019; PISTONE *et al.*, 2014), sem concentração excessiva em áreas específicas.

A análise EDS (Figuras 21d-f) do $F_3O_4@SiO_2$ mostrou a presença de oxigênio (O) e ferro (Fe) nas nanopartículas de magnetita (manchas turquesa e vermelha, respectivamente). As imagens 2D foram geradas pela análise da energia liberada das emissões de Fe $K\alpha$ (constituintes de material magnetita) (Figura 22e), bem como das emissões de O $K\alpha$ (Figura 22f), indicando a distribuição uniforme desses elementos na área demarcada na micrografia. As imagens de SEM não permitem distinguir o tamanho das partículas de magnetita devido à sua grande proximidade, mas a análise do espectro de EDS permite confirmar a presença de óxido de ferro no $F_3O_4@SiO_2$. O espectro EDS do $F_3O_4@SiO_2$ -MPS apresenta composições semelhantes, com emissões de átomos de O e Fe. As imagens SEM demonstraram o tamanho homogêneo do $F_3O_4@SiO_2$ -MPS (Figura 24).

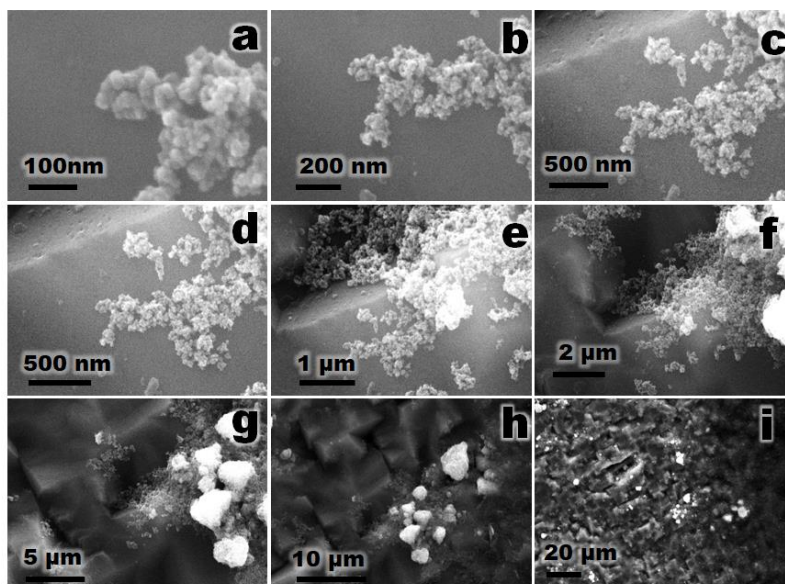
O histograma da imagem SEM (representando na Figura 25g) revelou um diâmetro de partícula de 585 ± 129 nm. A introdução de MPS durante o processo de síntese teve um impacto relevante no tamanho médio das partículas de $F_3O_4@SiO_2$ -MPS. Foi observado um aumento de 28% no tamanho dessas partículas em relação com as partículas de $F_3O_4@SiO_2$. Este aumento de tamanho é evidente nas Figuras 21c e 21g. É importante mencionar que não foram observadas diferenças significativas nas amostras M-MIP e M-NIP (Figuras 25h e 25i), o que indica que a adição de polímero não afetou o tamanho das partículas ou agregados.

Figura 21 - A imagem SEM mostrou nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4) em várias sínteses.



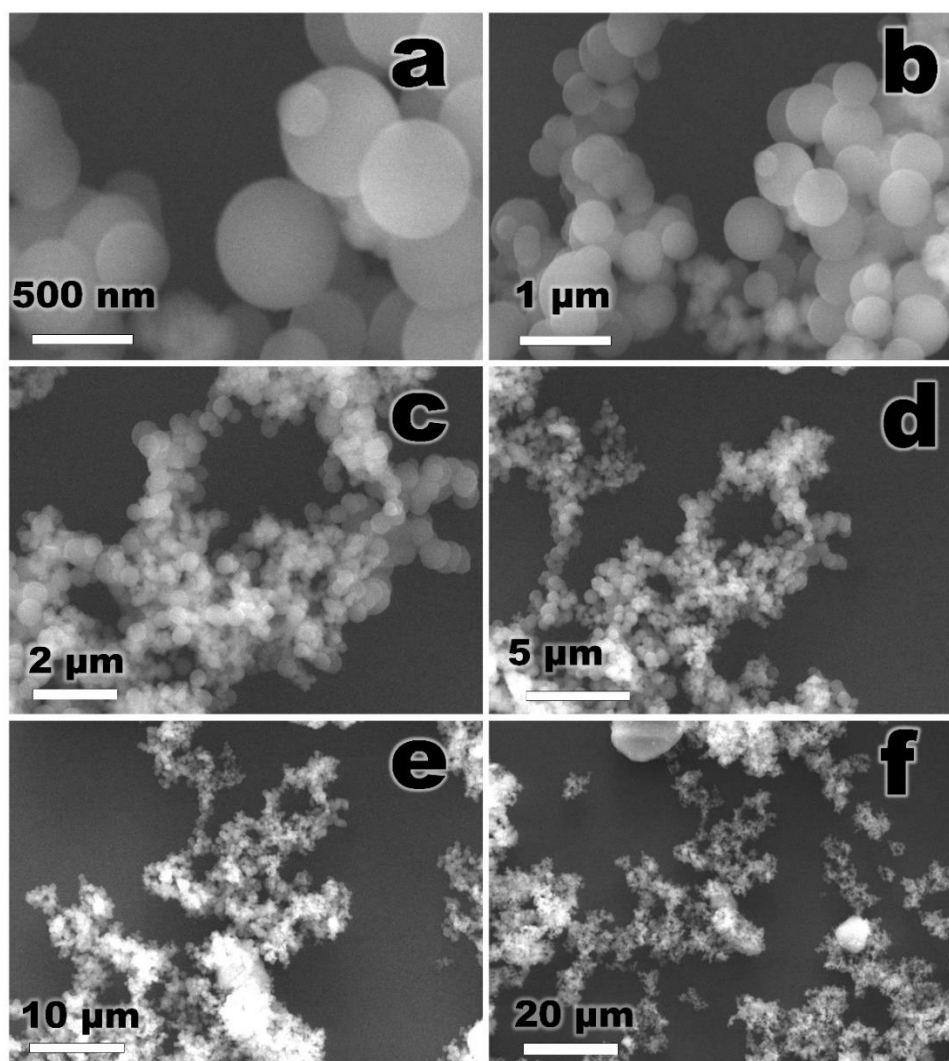
Fonte: Autora (2024).

Figura 22 - Imagens SEM do Fe_3O_4 (a-i), em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas



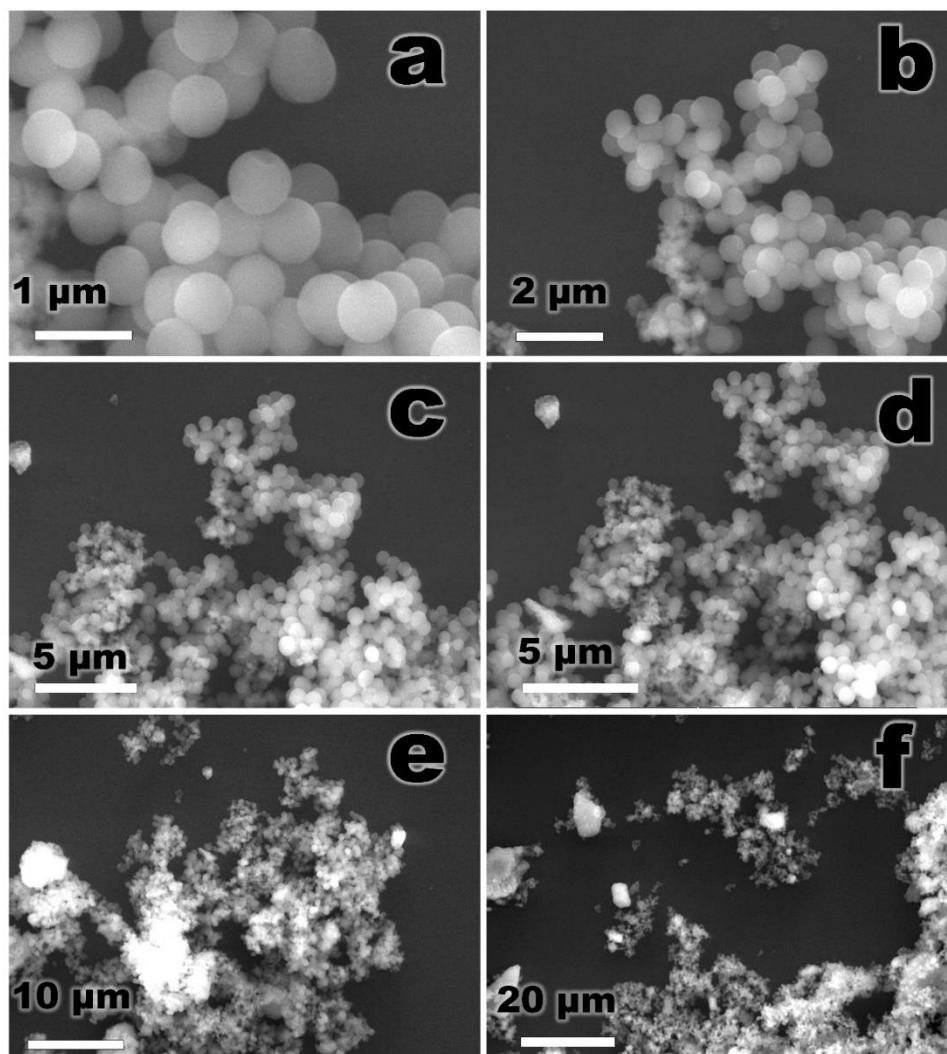
Fonte: Autora (2024).

Figura 23 - Imagens SEM do F3O4@SiO2-TEOS em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas.



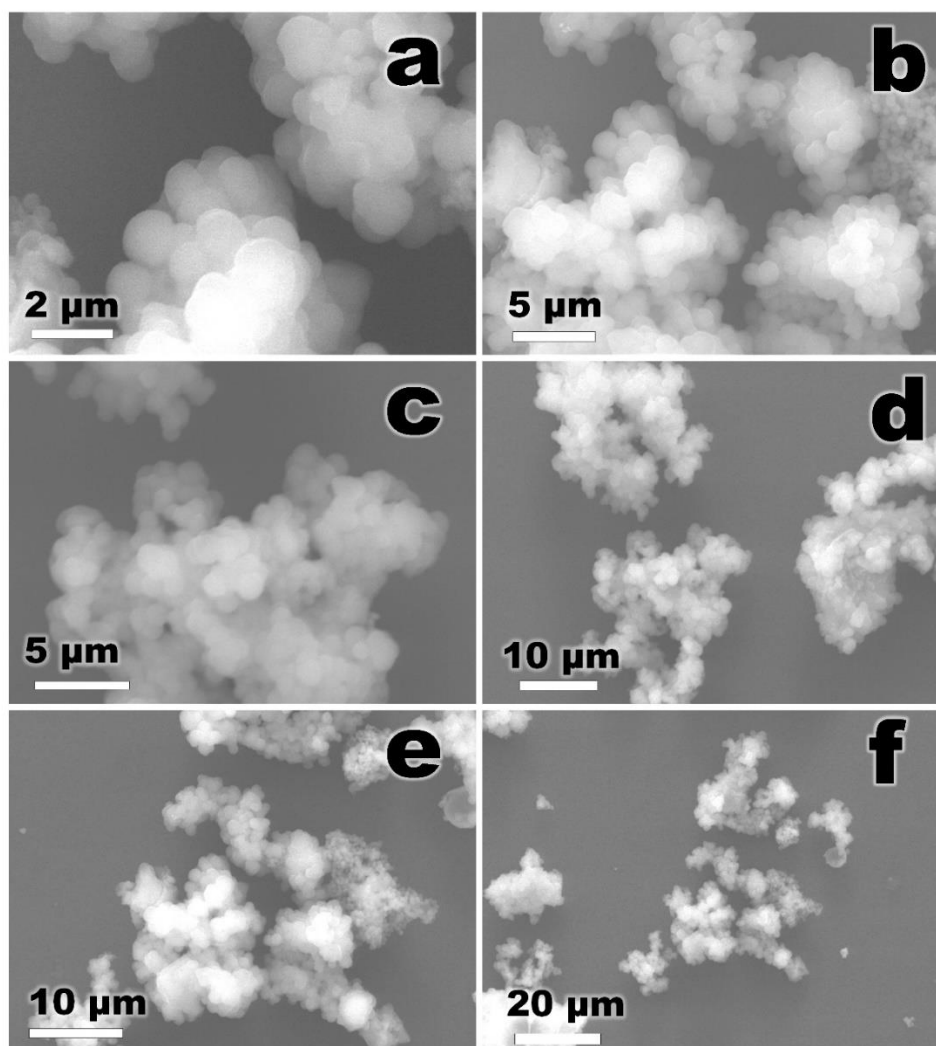
Fonte: Autora (2024).

Figura 24 - Imagens SEM do F3O4@SiO2-TEOS-MPS, em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas.



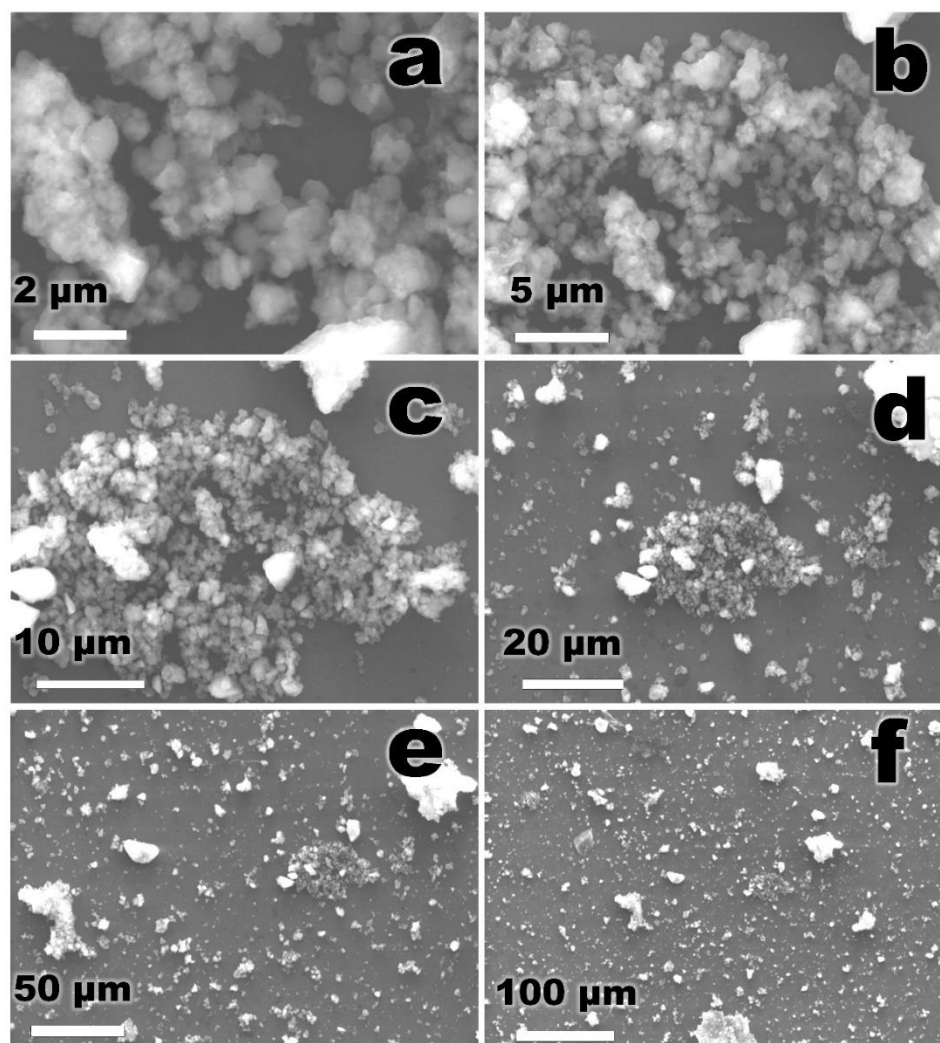
Fonte: Autora (2024).

Figura 25 - Imagens SEM do M-MIP, em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas.



Fonte: Autora (2024).

Figura 26 - Imagens SEM do M-NIP, em diferentes ampliações, mostrando o tamanho homogêneo das nanopartículas.



Fonte: Autora (2024).

4.3.4 Teste de exclusão de proteínas

Por meio do teste de exclusão de proteínas foi possível verificar se o material obtido foi revestido com BSA corretamente e se as exclusões das macromoléculas foram eficientes e influenciadas pelo revestimento (De Oliveira *et al.*, 2019). A percentagem de exclusão de proteínas para o material M-MIP foi de $95,5 \pm 0,008 \%$, e para o M-RAMIP foi de $99,0 \pm 0,007 \%$. Os resultados indicam que M-RAMIP foi revestido de modo eficaz e que o M-MIP também exclui proteínas de um modo eficiente, corroborando, assim, para sua escolha como material final para a extração em fase sólida dispersiva deste estudo.

4.4 OTIMIZAÇÃO DOS BETABLOQUEADORES EM LC-ESI-MS/MS

Soluções de 1000 mg L⁻¹ de 7 betabloqueadores OXP, ATE, MET, LAB, PROP, NAD e PIN e 1 padrão interno ATE D₇ foram injetadas no LC-MS/MS realizando análises nos modos positivos de varredura (SCAN+), monitoramento de íon selecionado (SIM+) e monitoramento de reações múltiplas (MRM+) para otimização espectrométrica dos analitos.

Na otimização por MRM+ monitorou-se pelo menos 4 íons de fragmento para cada anti-hipertensivo e estes foram correspondentes aqueles revisados em literatura (Lee *et al.*, 2020; kakadiya *et al.*, 2011). Em seguida, são apresentados os íons precursores (tabela 2), os parâmetros de energia de colisão (CE, do inglês “*collision cell*”) correspondente a cada fragmento respectivamente, e os fragmentos selecionados, otimizados no sistema LC-MS /MS para análise de cada um dos betabloqueadores e do padrão interno.

Tabela 2 - Íon precursor, energia de colisão e íons produtos referentes à fragmentação de cada betabloqueador

β-bloqueador	Íon precursor (m/z)	Q1 (V)	Energia de colisão (V)	Q3 (V)	Íon produto (m/z)
Pindolol	249	-10,-10,-11,-10	-27; -20; -25; -32	-20,-16,-17,-13	144; 116; 74; 56
Oxprenolol	266	-11,-11,-11,-11	-15; -20; -21; -32	-12,-16,-17,-14	225,10; 116,10; 72; 56
Nadolol	310	-13,-13,-13,-13	-19; -24;-29;-33	-13,-14,-11,-10	254,10; 201; 171;145
Metoprolol	268	-11,-11,-11	-23; -45; -26	-22,-24,-19	159; 103; 133
Labetolol	329	-14,-14,-14	-27; -44; -39; -18	-24,-19,-10,-17	162; 134; 91; 207
Propranolol	260	-11,-11,11,-11	-19; -28; -20; -25	-26,-23,-13,-17	183; 155; 116; 74
Atenolol	267	-11,-11,-11,-11	-20; -27; -50; -53	-28,-21,-14,-10	190; 145; 107; 91
Atenolol D₇	274,20	-16,-16,-16	-24; -26; -20	-18,-15,-20	79,1; 145; 190

Nota: Q1 e Q3: quadrupolo 1 e 3. Fonte: Autora (2023).

Os fragmentos selecionados para quantificação foram PIN 249>144, OXP 266>72, NAD 310>254,1, MET 268>159, LAB 329>162, PRO 260>183, ATE 267>107 e ATE D₇ 274>79,1. Os íons produtos escolhidos para quantificação foram os íons exclusivos mais abundantes de cada molécula. Os outros fragmentos foram utilizados para identificação dos fármacos.

4.5 ESTUDOS DE ADSORÇÃO

Por meio dos estudos cinéticos realizados, foi possível estabelecer que o ponto de equilíbrio ou saturação foi atingido aos 10 minutos, para compreender em qual modelo de cinética de adsorção o material se adequa e entender as interações adsorvente-adsorvato, os dados foram tratados com o aplicativo OriginLab®, com a utilização dos modelos teóricos de pseudoprimeira ordem, pseudosegunda ordem, quimissorção e ordem fracionária, segundo a (Tabela 3) e a (Figura 27).

Tabela 3 - Estudo cinético contemplando modelo cinético, equação, parâmetros e valores obtidos

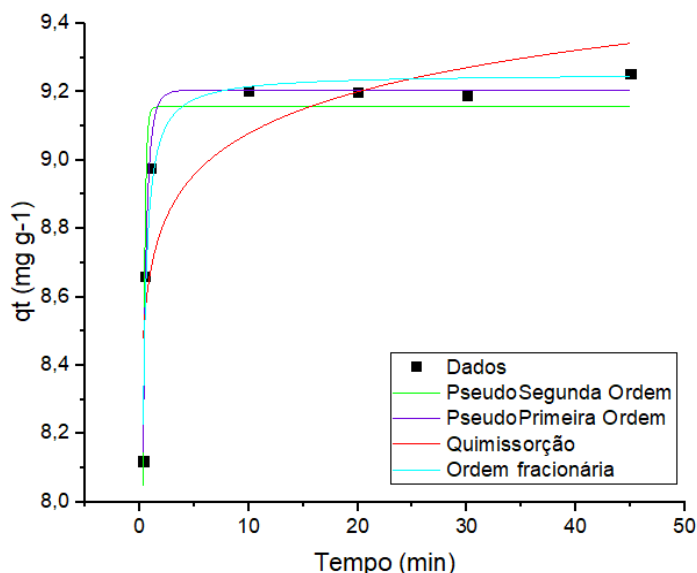
Modelo cinético	Equação	Parâmetros	Valores Obtidos
Pseudo-primeira ordem	$q_t = q_e [1 - \exp(-k_1 t)]$	q_e (mg g ⁻¹)	9,15634
		k_1 (min ⁻¹)	6,40216
		R ²	0,94123
		F _{error} (%)	4,38%
Pseudo-segunda ordem	$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$	q_e (mg g ⁻¹)	9,25313
		k_2 (g mg ⁻¹ min ⁻¹)	2,63201
		R ²	0,96584
		F _{error} (%)	0,02%
Quimissorção (Elovich)	$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln(t)$	α (mg g ⁻¹ min ⁻¹)	5,6301.10 ⁻²⁰
		β (g mg ⁻¹)	5,70836
		R ²	0,74973
		F _{error} (%)	12,38%
Ordem fracionária (Avrami)	$q_t = q_e \{ -\exp[-(k_{AV} t)^{n_{AV}}] \}$	q_e (mg g ⁻¹)	9,20611
		k_{AV} (min ⁻¹)	12,3486
		R ²	0,54903
		F _{error} (%)	0,99013
		F _{error} (%)	21.56%

Fonte: Autora (2023).

Legenda: *qt: Quantidade de analito adsorvido no tempo t; qe: Quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; t: Tempo de contacto; k1: Constante de velocidade de pseudo-primeira ordem; k2: Constante de taxa de pseudo-segunda ordem; α : Taxa de adsorção inicial da equação de Elovich; β : Constante de Elovich relacionada com a extensão da cobertura da superfície e também com a energia de ativação envolvida na quimissorção; kAV: Constante cinética de Avrami; nAV: Ordem de reação fracionada (Avrami)

relacionada com o mecanismo de adsorção.

Figura 27 - Modelos teóricos de pseudoprimeira ordem, pseudosegunda ordem, quimissorção e ordem fracionária.



Fonte: Autora (2024).

Com a observação do gráfico e a realização dos fatores de erro para cada modelo, foi observado que o modelo de PseudoSegunda Ordem foi o que melhor se ajusta, em função de seu R^2 (0,97584) e a obtenção do menor fator de erro F_{error} (0,0002), indicando a ocorrência de sorção química envolvendo troca de elétrons entre o adsorvente e o adsorvato, tendo como a quimissorção como etapa limitante da velocidade das reações (Santos *et al.*, 2017).

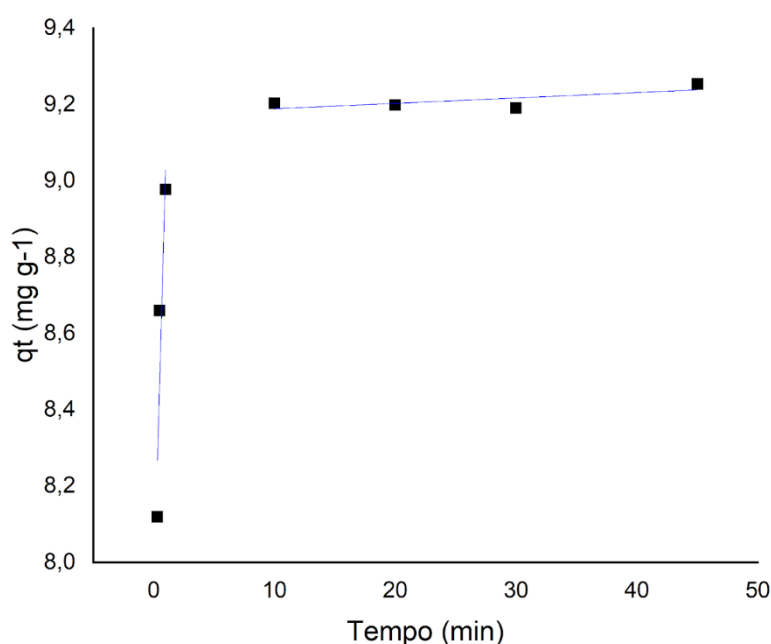
Este modelo oferece uma descrição boa de processos de adsorção química que implicam forças covalentes e troca iônica, além de considerar que durante o processo de adsorção, ocorrem duas reações, as quais podem ocorrer de forma sequencial ou paralela. Deste modo, uma das reações exibe uma cinética mais acelerada, fazendo com que o equilíbrio seja alcançado rapidamente, enquanto a outra se apresenta de forma mais lenta, permitindo sua persistência por um período de tempo maior (Ho; Mckay, 2000; Zhang *et al.*, 2017).

Juntamente com os estudos cinéticos, foi utilizado o modelo de difusão intrapartícula (Figura 28) já que o modelo de pseudosegunda ordem não pode ser utilizado para determinar o mecanismo de difusão. O modelo de difusão intrapartícula permite identificar o mecanismo de difusão que ocorre na reação de

adsorção, deste modo é possível entender a resistência na transferência de massa do analito pelos sítios do adsorvente (Royer *et al.*, 2009).

Foi obtida uma difusão intrapartículas multilinear, com duas regiões, na primeira região a reação ocorre de forma mais rápida, o que indica alta transferência de massa correspondendo a adsorção superficial externa. Na segunda etapa, que é considerada a etapa limitante, pelo fator de k_{id} (0,00141), onde ocorre um processo mais gradual, indica que o adsorvato já possui uma dificuldade para atingir os poros do material, admitindo uma adsorção interna, a etapa na qual a difusão intrapartícula controla o processo (Anacleto *et al.*, 2017) (Tonucci *et al.*, 2020)

Figura 28 - Modelo de difusão intra-partícula



Fonte: Autora (2024).

Por meio dos estudos de isoterma realizados, se tornou capaz de entender a relação entre a quantidade de adsorvato que o material reteve e a concentração do analito utilizada durante o contato entre os dois. Para entender essa relação, os dados obtidos no estudo foram tratados com o aplicativo OriginLab®, onde foram empregados os modelos teóricos de Langmuir, Freundlich e Sips (Figura 29) e (Tabela 4).

Com a análise do gráfico gerado, observa-se um ajuste satisfatório para os

três modelos. Como o modelo de Sips é intermediário entre Freundlich e Langmuir, ele é o modelo que se ajusta melhor para os dados experimentais, este modelo aprimora os benefícios e diminui as desvantagens entre os dois. O modelo teórico de Sips apresentou o maior valor de R^2 (0,99573) e função de erro semelhante aos demais modelos testados.

Esse ajuste com o modelo de Sips pode assumir que a superfície do material é heterogênea e que o processo de adsorção ocorre em monocamada, mostrando a existência de somente um ponto de saturação, se aproximando do modelo de Langmuir R^2 (0,99508), o que foi evidenciado através dos valores de R^2 muito próximos e também funções de erro muito próximas (Royer *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2017).

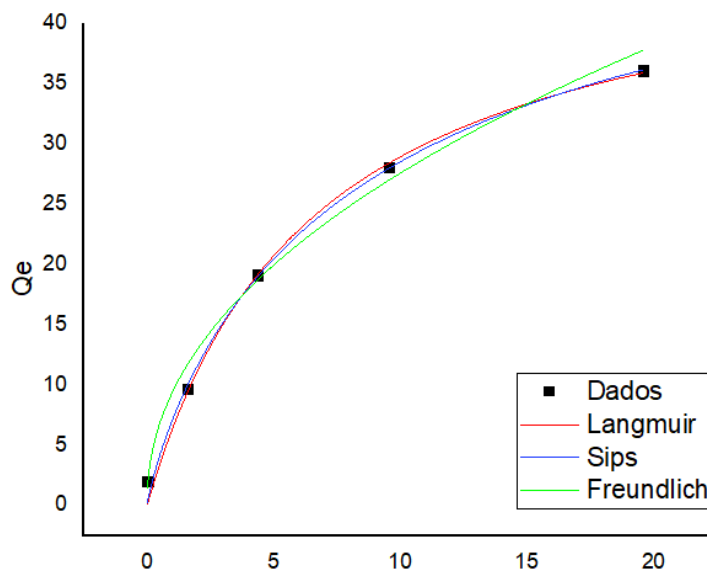
Tabela 4 -Estudo de isotérmica contemplando modelo de isotérmica, equação, parâmetros e valores obtidos.

Modelo de isotérmica	Equação	Parâmetros	Valores Obtidos
Langmuir	$q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + K_L C_e}$	q_s (mg g ⁻¹)	47,94275
		K_L (mg L ⁻¹)	0,15238
		R^2	0,99508
		F_{error} (%)	1,14%
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n_F}$	K_F (mg g ⁻¹) (mg L ⁻¹) ⁿ	9,39398
		n_F	2,13684
		R^2	0,9869
		F_{error} (%)	1,13%
Sips	$q_e = \frac{q_s K_s C_e^{1/n_s}}{1 + K_s C_e^{1/n_s}}$	q_s (mg g ⁻¹)	54,72397
		K_s (mg L ⁻¹)	0,14849
		n_s	0,86564
		R^2	0,99573
		F_{error} (%)	0,95%

Fonte: Autora (2023)

Legenda: q_e : Quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; q_s : Capacidade de saturação teórica; K_L : Constante de afinidade de Langmuir; C_e : Concentração do analito no equilíbrio; K_F e n_F : Constante e expoente do modelo de Freundlich, respectivamente; K_s e n_s : Constante e expoente do modelo de Sips.

Figura 29 - Modelos teóricos de Langmuir, Freundlich e Sips, tratados pelo aplicativo OriginLab ®.



Fonte: Autora (2024).

4.6 ESTUDOS DE SELETIVIDADE

Avaliou-se a seletividade de M-MIP e M-NIP utilizando soluções contendo análogos estruturais de OXP e fármacos com estruturas distintas. Foram avaliados os análogos estruturais ao OXP, como o beta- bloqueadores PIN, MET, PROP e NAD, além de fármacos estruturais distintos, como o haloperidol, a fluoxetina, a amitriptilina, o diazepam e a carbamazepina.

De acordo com as constantes de ligação (conforme mostrado na Tabela 5), o M-MIP apresentou maior seletividade e capacidade de adsorção quando comparado ao M-NIP. O M-MIP é polimerizado com uma molécula modelo e, durante a síntese, formam-se sítios de ligação seletivos com orientação e disposição específicas para a molécula. Por conseguinte, o M-MIP pode capturar melhor a molécula modelo e estruturas semelhantes, tais como os análogos utilizados neste ensaio. O M-NIP, por outro lado, embora semelhante em composição ao MIP, não apresenta a orientação específica do monômero-modelo, resultando numa extração mais fraca e menos seletiva (Hu *et al.*, 2009).

Os valores de α revelaram uma boa seletividade M-MIP para todos os

betabloqueadores devido ao seu tamanho semelhante ao da OXP (molécula modelo) e à presença de grupos hidroxilo em todas elas. Para tanto, o α mais elevado observado foi obtido entre as moléculas PIN e NAD (2,74). Uma explicação plausível é a estreita semelhança da estrutura química do PIN com a do OXP (utilizado como modelo), tendo ambos um grupo amino e um grupo hidroxilo nas mesmas posições e a presença de um anel aromático (Figura 11). O NAD, de outro modo, tem a estrutura mais distinta entre os betabloqueadores, pois tem um grupo terc-butil, ao contrário dos outros, que contêm grupos isopropil (Da Silva *et al.*, 2020 ; Hu *et al.*, 2009) (Figura 11).

Apenas o PIN foi empregado para testar a seletividade do M-MIP frente a fármacos com estruturas diferentes, pois apresentou a melhor adsorção e valor de α entre os betabloqueadores estudados. As constantes de ligação demonstram menor adsorção de haloperidol, fluoxetina, amitriptilina, diazepam e carbamazepina, reafirmando a formação dos sítios de ligação seletivos para betabloqueadores na síntese do M-MIP.

Tabela 5 - A seletividade dos polímeros M-MIP e M-NIP foi testada com soluções binárias contendo análogos estruturais e fármacos de diferentes estruturas.

Solução binária de fármacos	Constante de ligação (k)		Constante de seletividade (α)
	MIP	NIP	
Pindolol/Propranolol	0.86	0.53	1.61
Pindolol/Metoprolol	1.13	0.90	1.26
Pindolol/Nadolol	4.37	1.60	2.74
Pindolol/Labetalol	0.92	0.70	1.31
Propranolol/Metoprolol	0.97	0.70	1.38
Propranolol/Nadolol	5.33	3.14	1.70
Propranolol/Labetalol	0.97	0.99	0.98
Metoprolol/Nadolol	3.78	2.79	1.35
Metoprolol/Labetalol	0.62	0.73	0.86
Nadolol/Labetalol	0.15	0.09	1.67
Pindolol/Haloperidol	0.93	0.33	2.78
Pindolol/Fluoxetina	0.92	0.44	2.08
Pindolol/ amitriptilina	0.90	0.16	5.70
Pindolol/Diazepan	0.91	0.50	1.82
Pindolol/ carbamazepina	1.11	0.89	1.24

Fonte: Autora (2024).

4.7 ESTUDOS DE PERFORMANCE DA TÉCNICA MPS-MS EXECUTADA CONFORME O PROTOCOLO 1

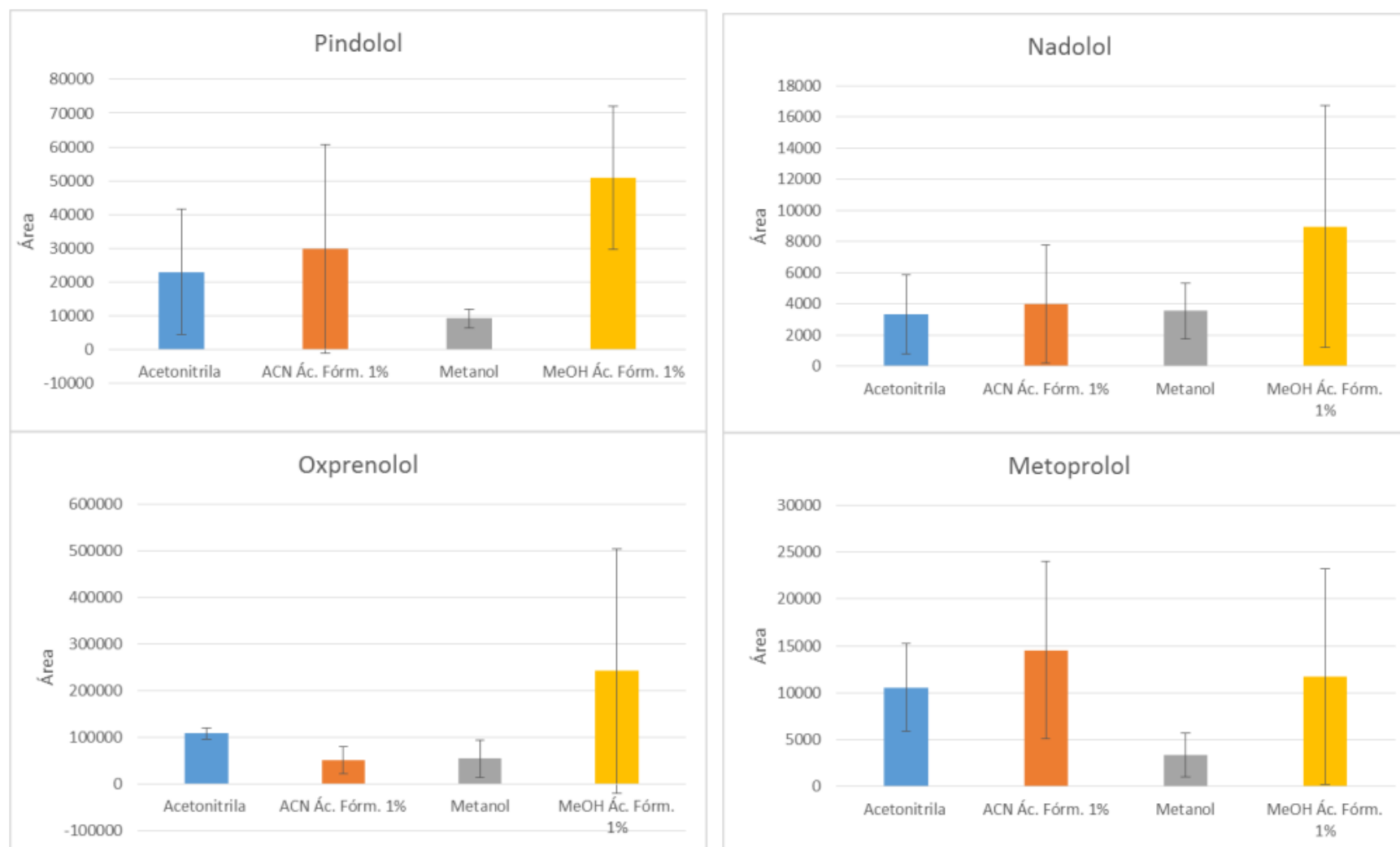
Foram testados 4 tipos de solvente para a dessorção dos betabloqueadores: acetonitrila; acetonitrila/ ácido fórmico (99:1 (v/v)); metanol e metanol/ácido fórmico (99:1 (v/v)). Também foram analisadas 4 vazões de solvente: 0,1; 0,15; 0,20 e 0,50mL/min.

O solvente mais eficiente (Figura 30) para a dessorção dos analitos foi o metanol acidificado com ácido fórmico na proporção de (99:1, v/v), com exceção para o MET que teve o melhor desempenho com a acetonitrila acidificada com ácido fórmico na proporção de (99:1, v/v). Os desvios associados a estes gráficos foram

grandes, demonstrando que a reprodutibilidade do método não estava adequada. E a vazão mais eficiente foi a de 0,1 mL/ min (Figura 27). Nesta condição, as áreas dos picos dos betabloqueadores foram maiores, com uma melhora nos desvios padrões. O solvente escolhido para o desenvolvimento do trabalho foi o metanol acidificado com 1% de ácido fórmico, pelo seu melhor desempenho.

Diante dos grandes desvios e pouca reprodutibilidade, foi tomada a decisão de mudar o ângulo α de inclinação da sonda para 90° (Figura 34) e mudar as condições de MS de acordo com o protocolo 2.

Figura 30 - Influência do tipo de solvente na resposta analítica. Concentração de misto de padrão de 50 ug.L-1, ângulo, α 60 °, vazão 0,1 mL/min por MPS-MS



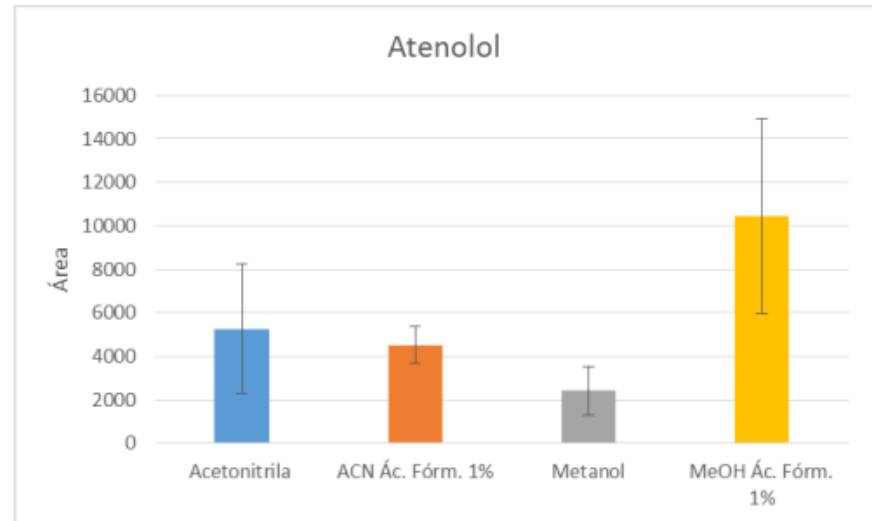
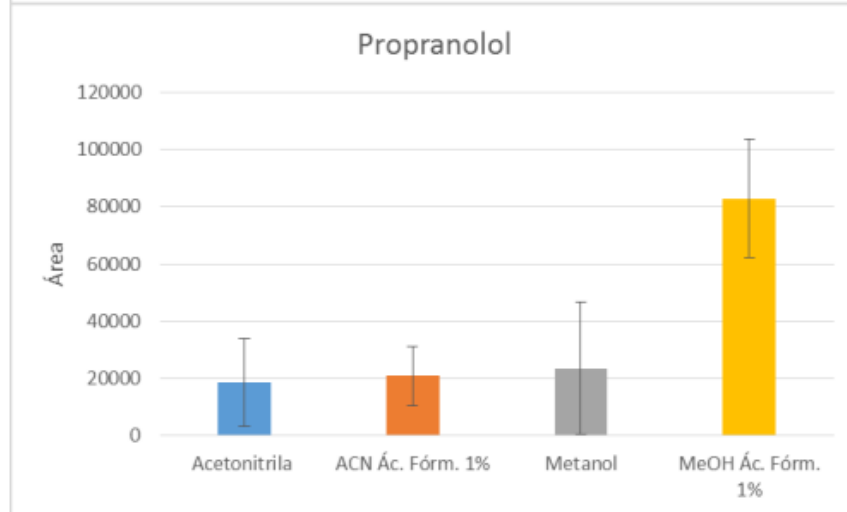
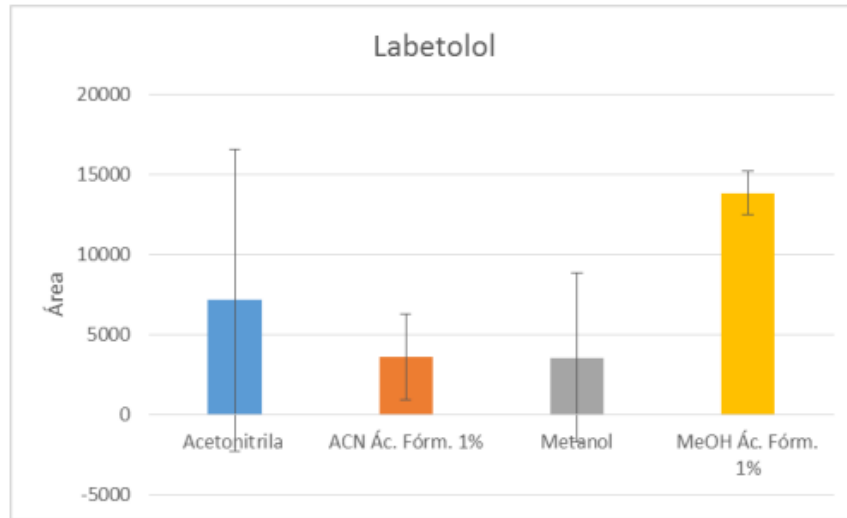
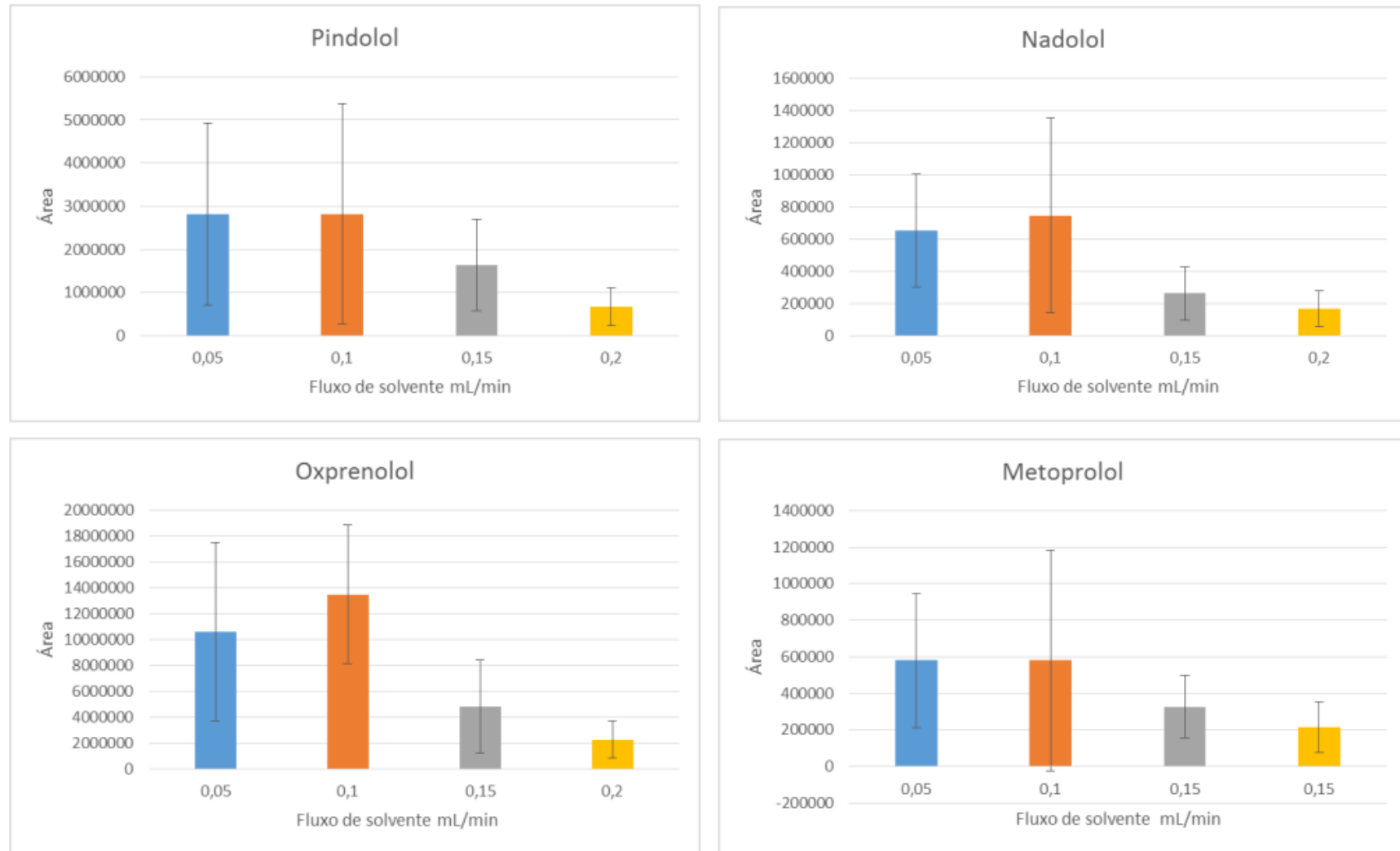
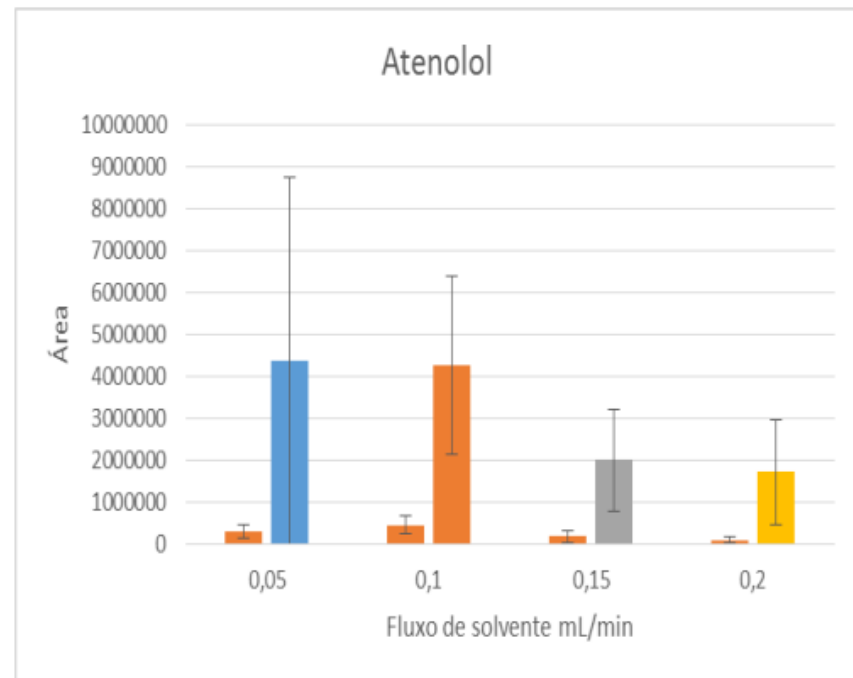
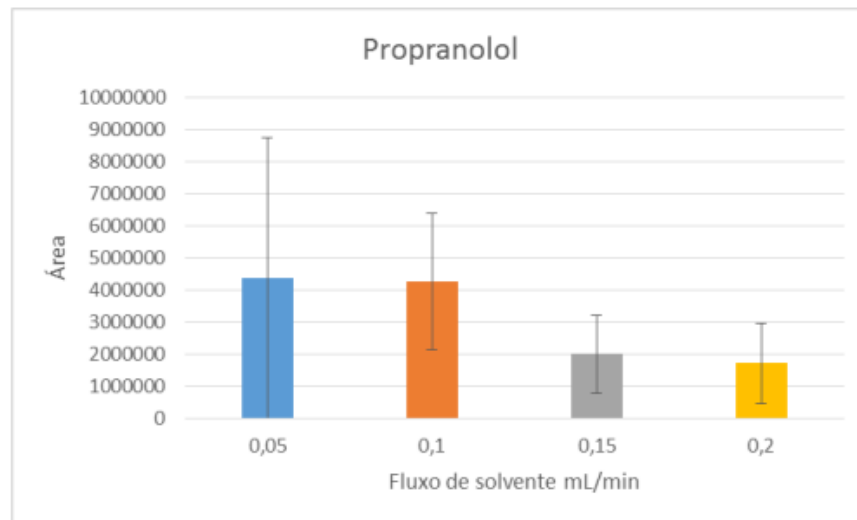
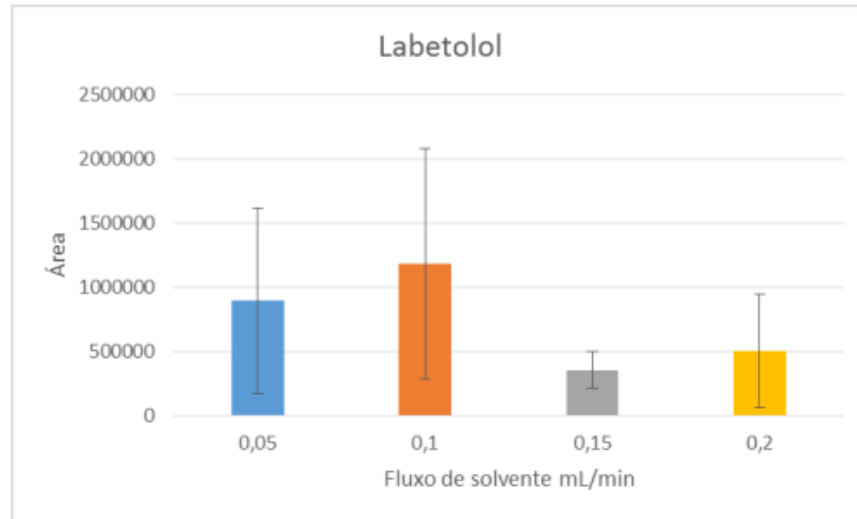


Figura 31 - Influência da vazão de solvente na resposta analítica. Concentração de misto de padrão de 50 ug.L⁻¹, ângulo, α 60 °, solvente metanol acidificado com ácido fórmico na proporção de (99:1, v/v), por MPS-MS.





Fonte: Autora (2023).

4.8 ESTUDOS DE PERFORMANCE DA TÉCNICA MPS-MS EXECUTADA CONFORME O PROTOCOLO 2

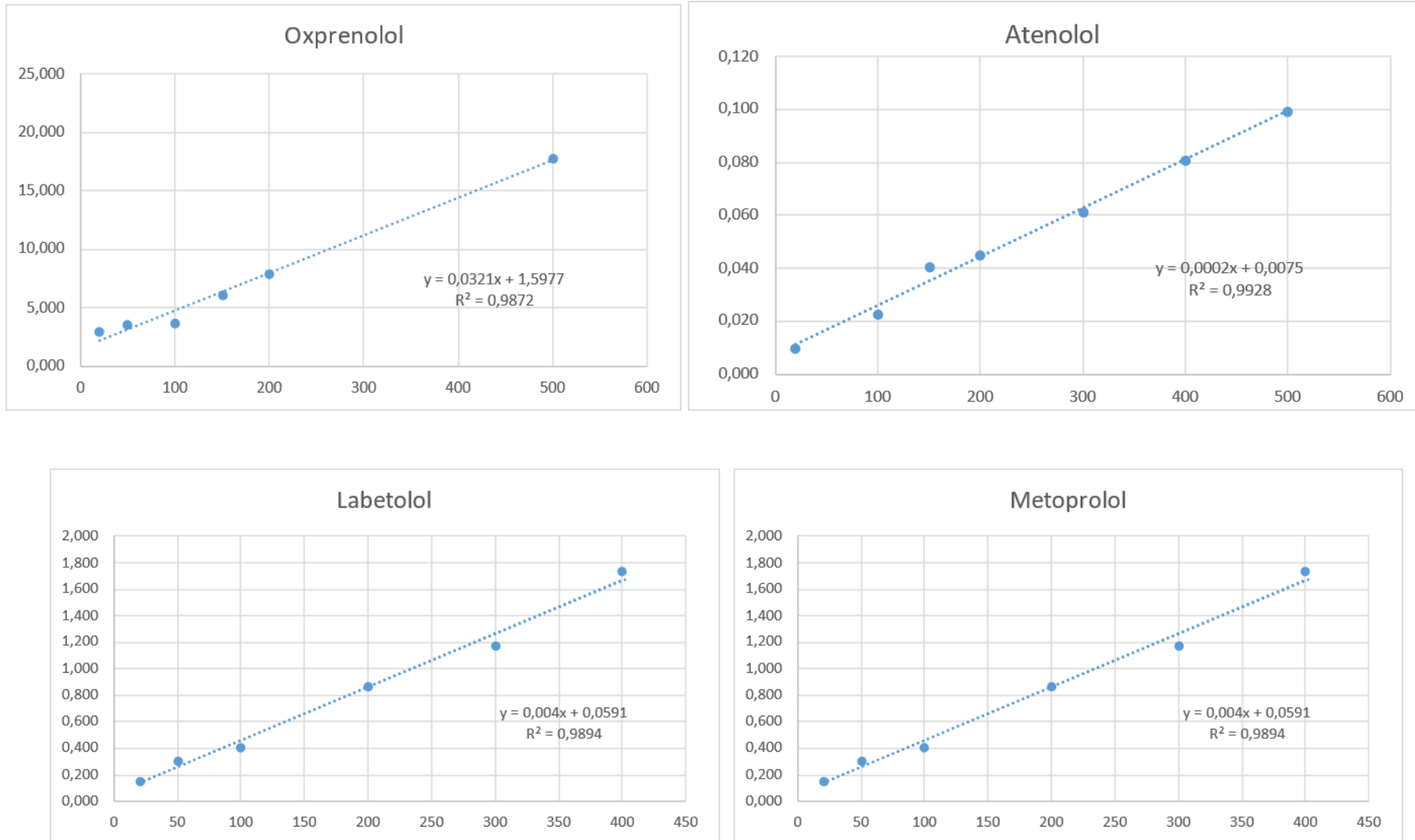
Com a regulação do ângulo da MPS/MS e a mudança de alguns parâmetros do MS de acordo com o (protocolo 2) do método foi possível melhorar a reprodutibilidade da metodologia e assim construir curvas analíticas em água (figura 28). As figuras de mérito melhoraram bastante, mas a precisão ainda não ficou dentro do ideal (Tabela 6). Então, se fez necessário estudar uma forma mais eficaz de usar a fonte, para que a mesma atinja uma melhor performance na reprodução dos resultados.

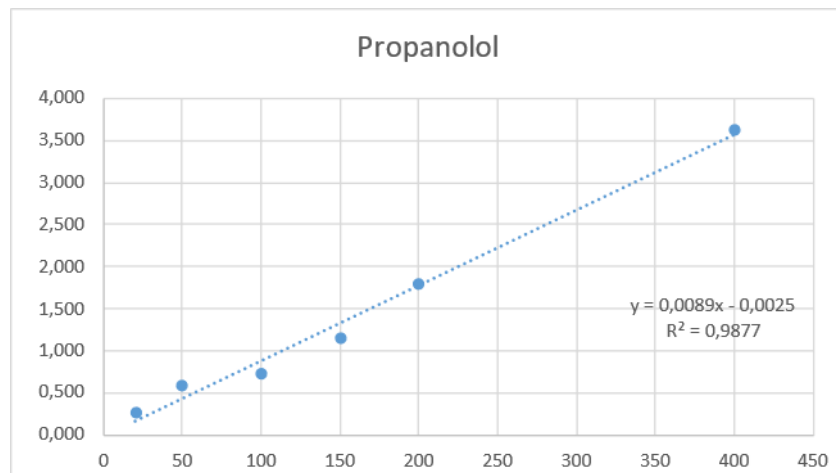
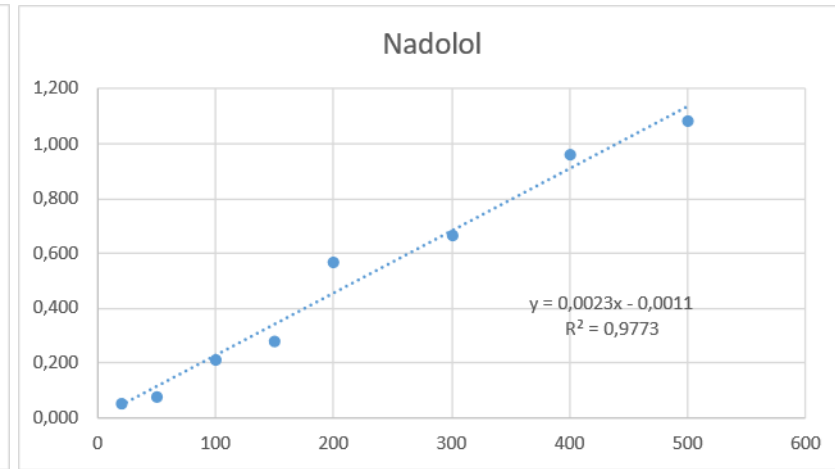
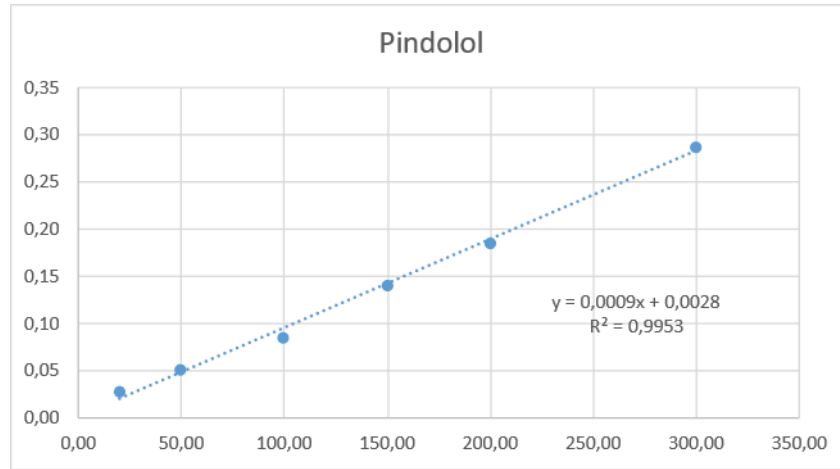
Tabela 6 - Precisão e exatidão do método (Protocolo 2) dos betabloqueadores em água por MPS-MS.

Betabloqueadores	Pontos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	ER (%)
Pindolol	20,150,500	4,78;25,37;31,63	40,49;-11,37;-100,59
Oxprenolol	20,150,500	53,81; 50,83;83,49	117,37;-34,27;1,49
Nadolol	20,150,500	35,64;39,49;42,83	19,16;-17,27;-4,86
Metoprolol	20,150,500	86,17;17,49;42,55	-5,09;17,13;-105,14
Labetolol	20,150,500	98,79;40,92;38,72	23,32;-100,00;-9,30
Propranolol	20,150,500	118,98;20,95;34,05	54,46;-13,41;-21,62
Atenolol	20,150,500	38,49;30,54;17,40	-27,82;19,50;0,02

Fonte: Autora (2024).

Figura 32 - Curva analítica de padrões dos betabloqueadores com P. I. em água.

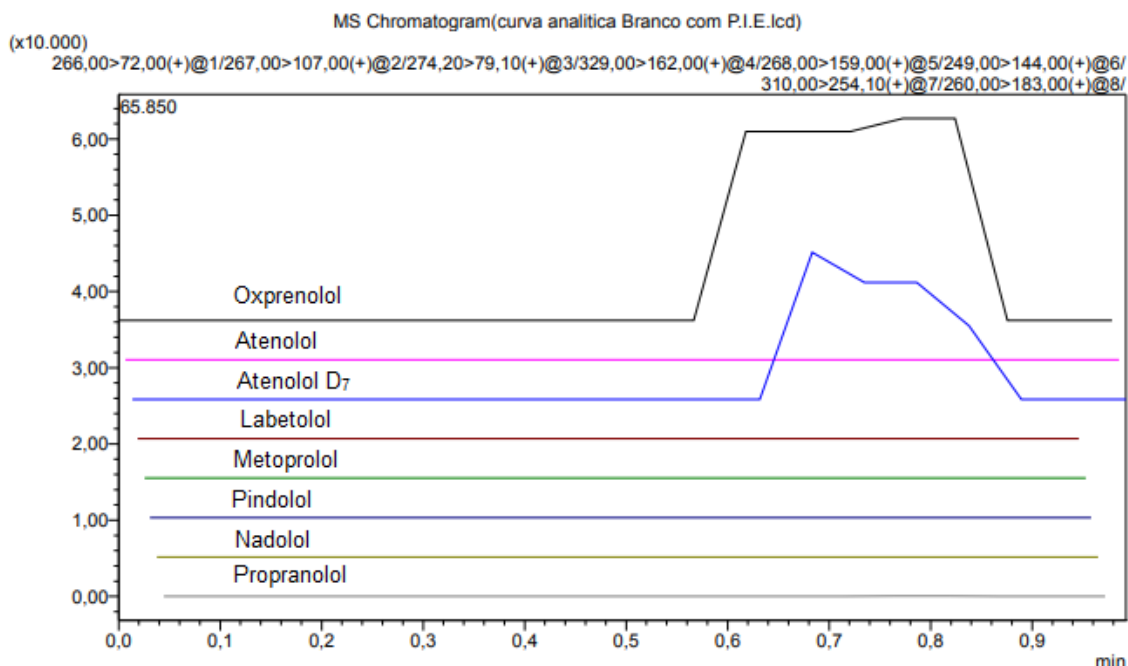




Fonte: Autora (2023)

O cromatograma de um branco com adição de padrão interno (Figura 33), evidencia que o oxprenolol que foi usado como molécula molde para a sintetização do M-MIP está sangrando, demonstrando que o mesmo não foi removido de forma eficiente, durante a lavagem do polímero.

Figura 33 - Cromatogramas de um branco com P.I. (Intensidade x tempo em minutos)

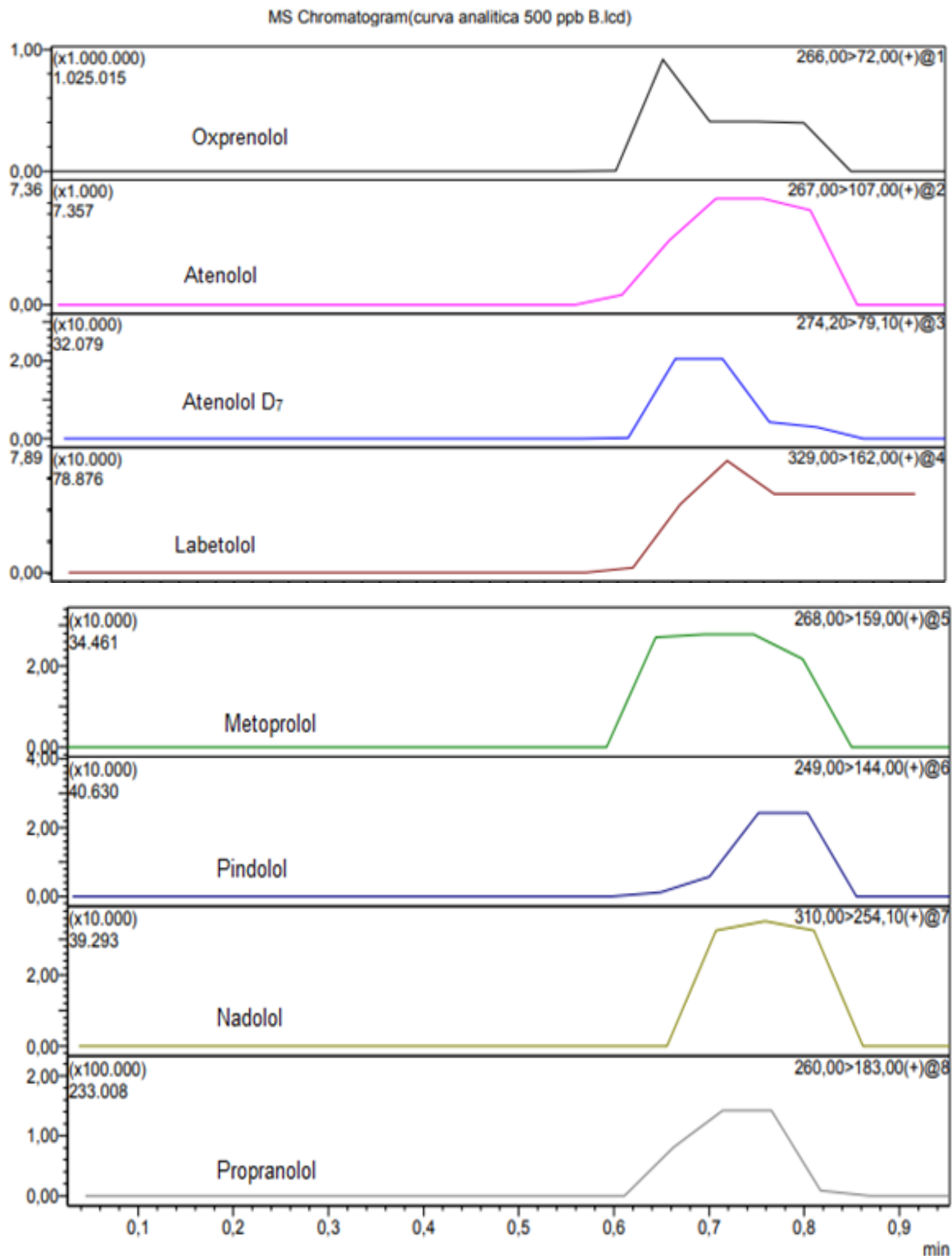


Fonte: Autora (2023).

A (figura 34) demonstra o perfil dos Cromatogramas dos betabloqueadores do ponto $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica em água. Com o decorrer da corrida que foi de um minuto o sinal do analito começa em torno de 0,6 min, vai aumentando, se mantém constante por aproximadamente 0,2 min e começa a diminuir em torno de 0,8 min, com exceção do Labetolol. Provavelmente por conta de alguma contaminação interna do espectrômetro de massas.

A (figura 34) demonstra o perfil dos Cromatogramas dos betabloqueadores do ponto $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica em água. Com o decorrer da corrida que foi de um minuto o sinal do analito começa em torno de 0,6 min, vai aumentando, se mantém constante por aproximadamente 0,2 min e começa a diminuir em torno de 0,8 min, com exceção do Labetolol. Provavelmente por conta de alguma contaminação interna do espectrômetro de massas.

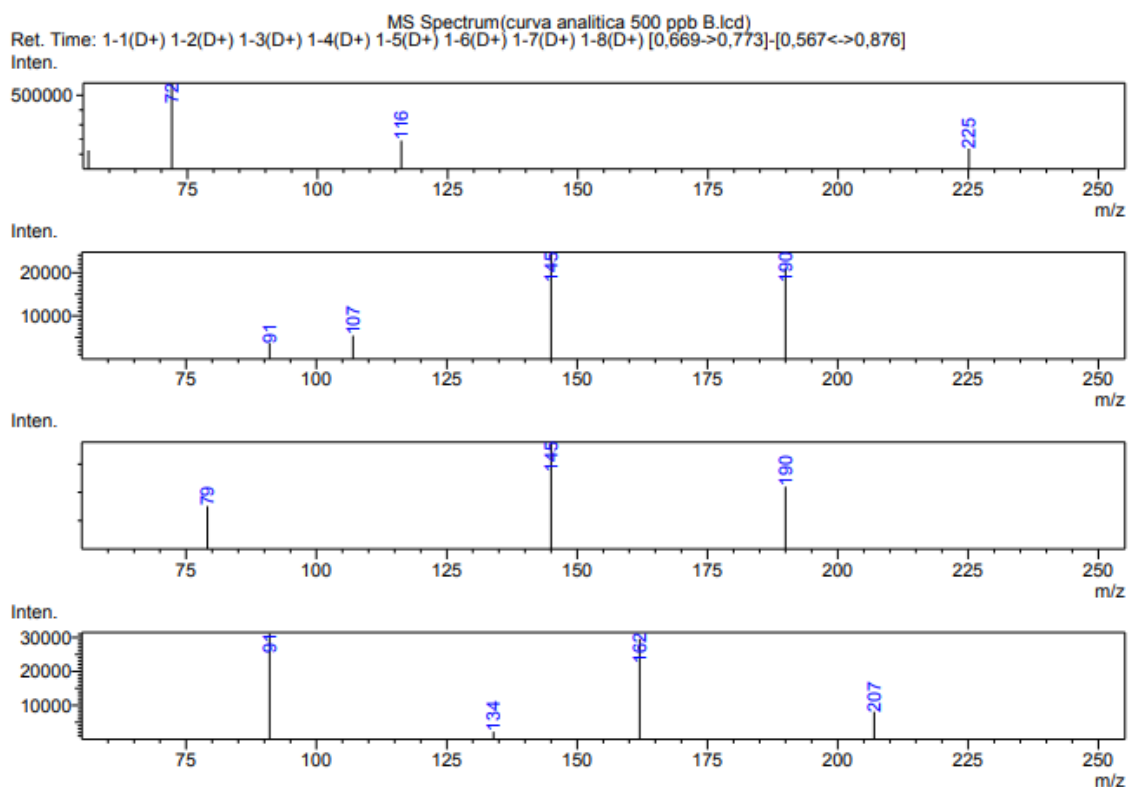
Figura 34 - Cromatogramas dos betabloqueadores do ponto 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica em água, com ajuste do ângulo da fonte para $\alpha 90^\circ$ e alteração do método do MS para o protocolo 2



Fonte: Autora (2024).

Espectro de massas dos betabloqueadores no ponto $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica em água (figura 35). O espectro revela os fragmentos gerados pelos íons precursores e suas respectivas abundâncias relativas.

Figura 35 - Espectro de massas dos betabloqueadores do ponto $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica em água, com ajuste do ângulo da fonte para α 90° e alteração do método do MS para o protocolo 2 (Abundância relativa x Razão massa/carga (m/z))



Fonte: Autora (2024).

4.9 ESTUDOS DE PERFORMANCE DA TÉCNICA MPS-MS EXECUTADA CONFORME O PROTOCOLO 3

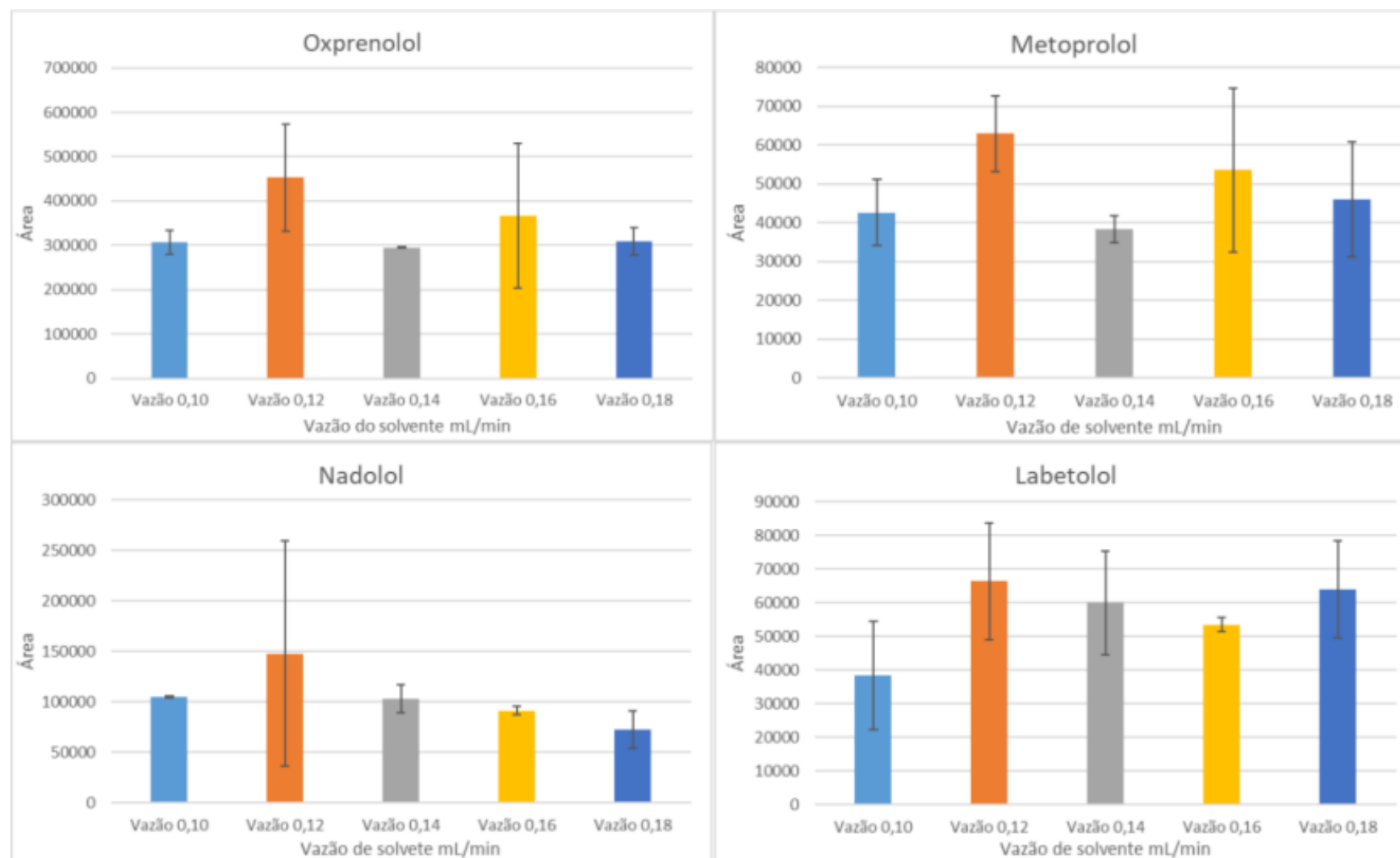
4.9.1 Estudo de vazões e voltagem para a MPS-MS referentes ao protocolo 3

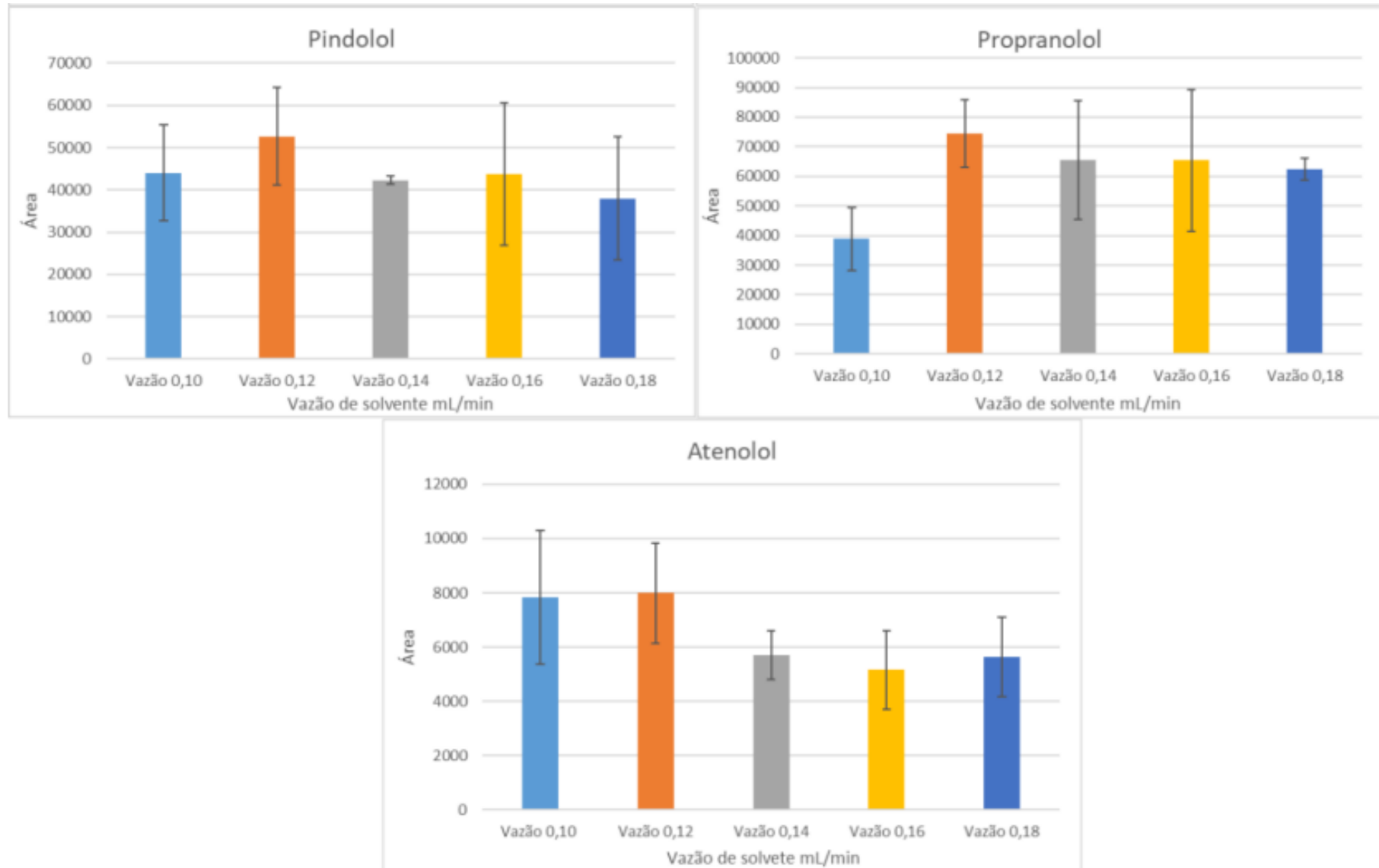
Foram testadas as vazões de 3,5; 4,0; 4,5 e 5 kV. E a vazão de solvente de 0,10; 0,12; 0,14; 0,16 e 0,18 mL min^{-1} . Usando com solvente metanol/ácido fórmico (99:1 (v/v)). E as concentrações dos betabloqueadores de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para OXP, $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ATE, LAB, PIN e NAD, $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ LAB e PRO, e por fim $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ MET.

Os estudos de vazão e voltagem foram etapas importantes para a definição do protocolo 3 e para atingir os valores das figuras de mérito exigido pelos principais guias de validação, permitindo assim a validação do método antidoping para os betabloqueadores estudados.

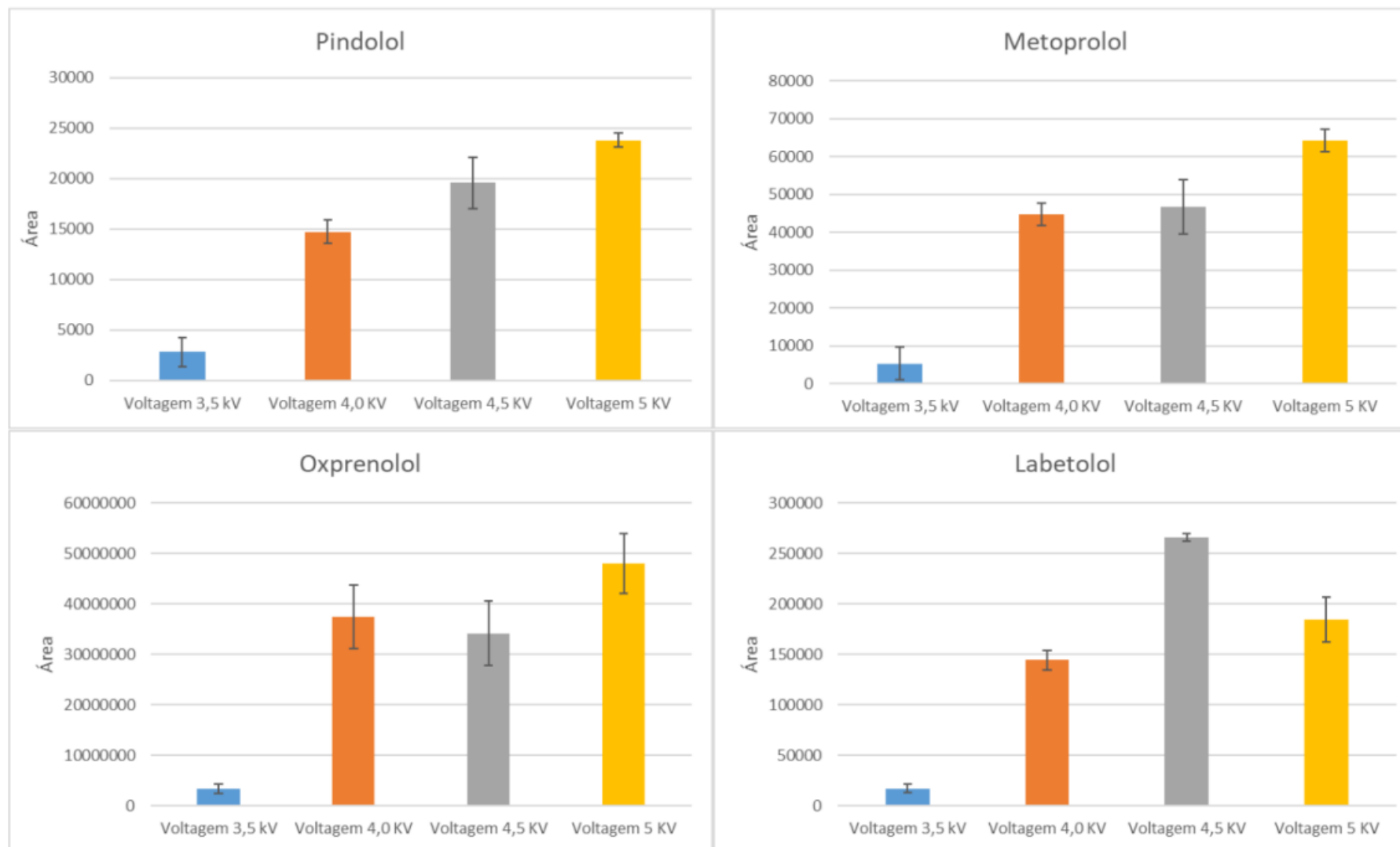
A vazão escolhida (Figura 36) para compor o protocolo 3 foi a de 0,14 mL.min⁻¹, pois com este fluxo de solvente os analitos obtiveram uma boa resposta analítica e um menor erro (desvio padrão), melhorando a reprodutibilidade e a precisão da fonte MPS-MS. As voltagens definidas (Figura 37) para o protocolo 3 foram as de 4,50 kV para os primeiros 0,19 min da corrida e depois foi aumentada para 5 kV no tempo de 0,20 - 1,08 min finais da corrida, favorecendo a ionização dos betabloqueadores, assim como sua resposta analítica e precisão.

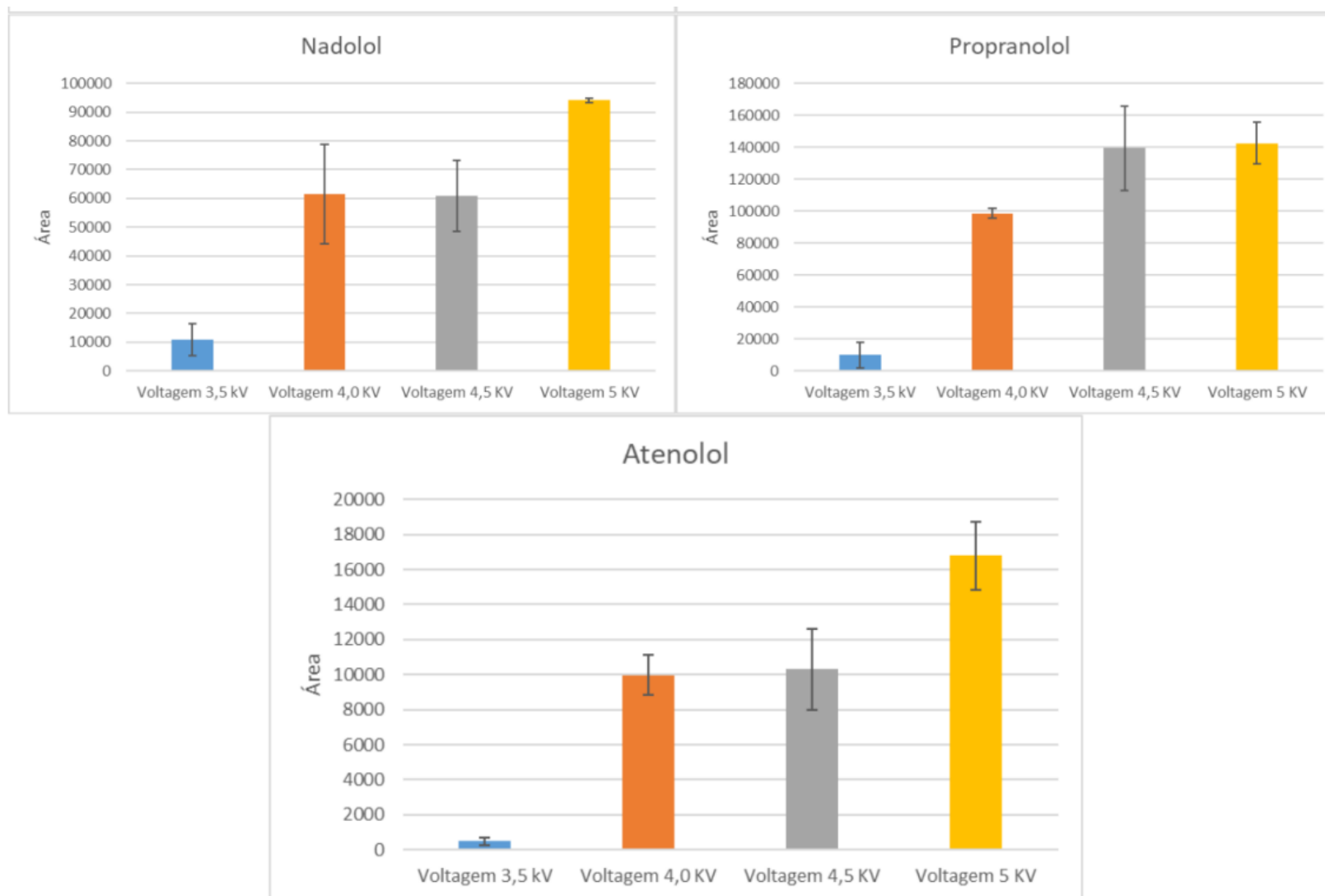
Figura 36 - Gráficos Área X vazão de solvente para a MPS-MS com ângulo α de 90° e método do MS referentes ao protocolo 3.





Fonte: Autora (2024).

Figura 37 - Gráficos Área X voltagem para a MPS-MS com angulo α de 90 ° e método do MS referentes ao protocolo 3.



Fonte: Autora (2024)

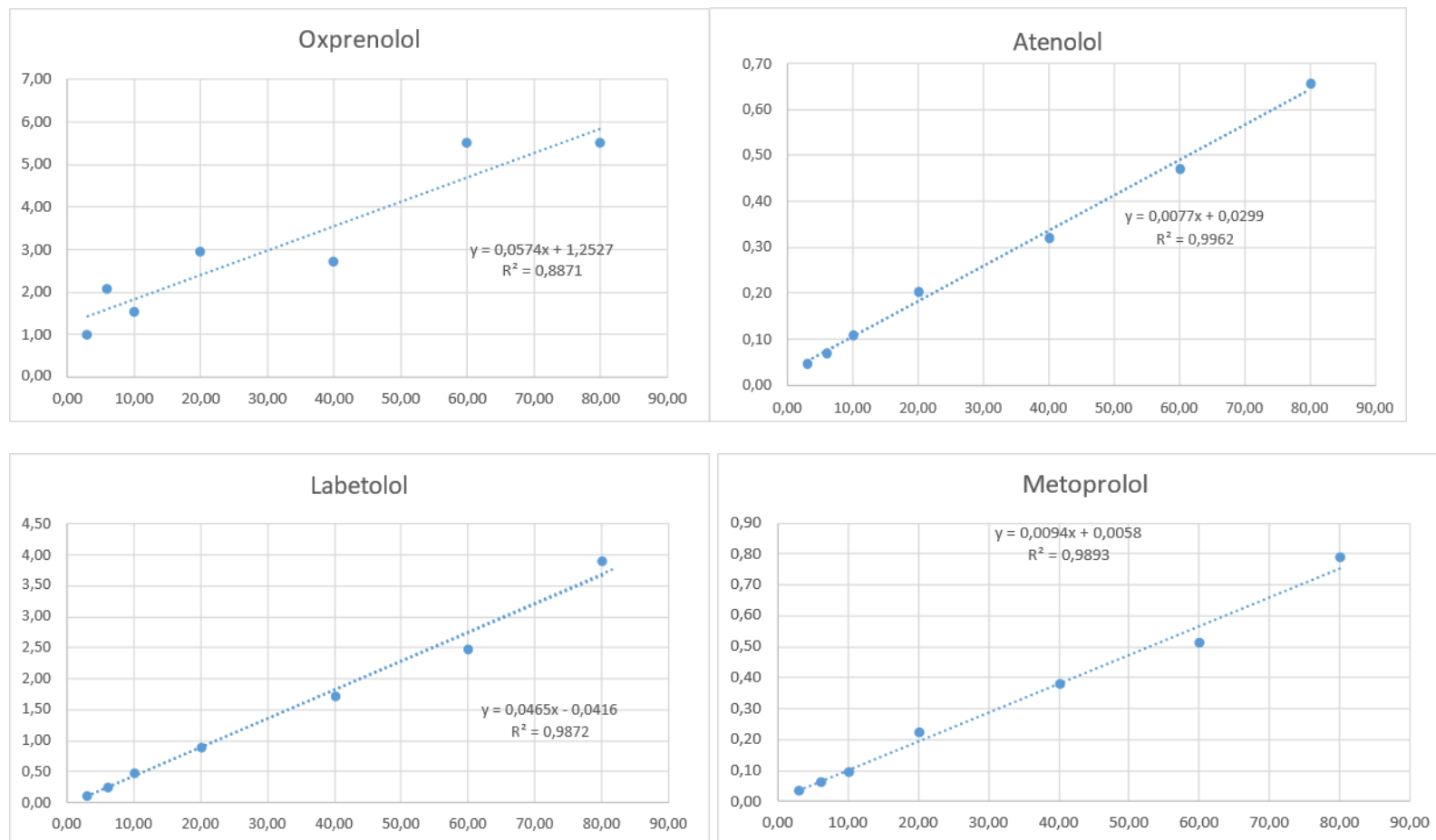
4.9.2 Construção de curva analítica em plasma humano por MPS-MS de acordo com o protocolo 3

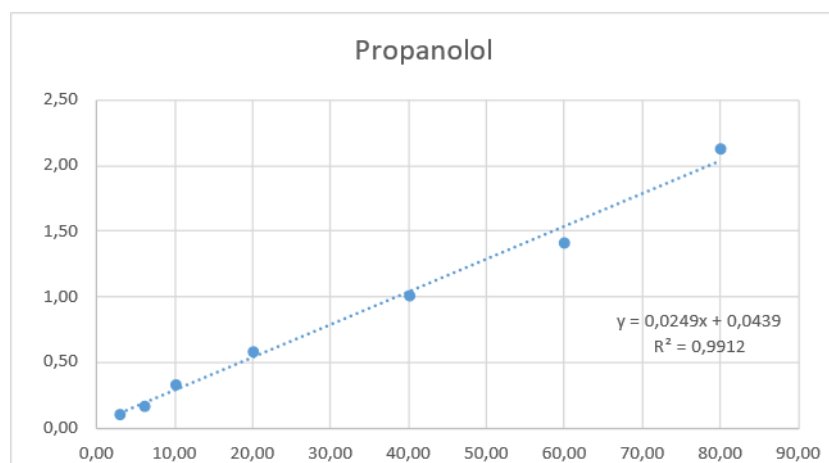
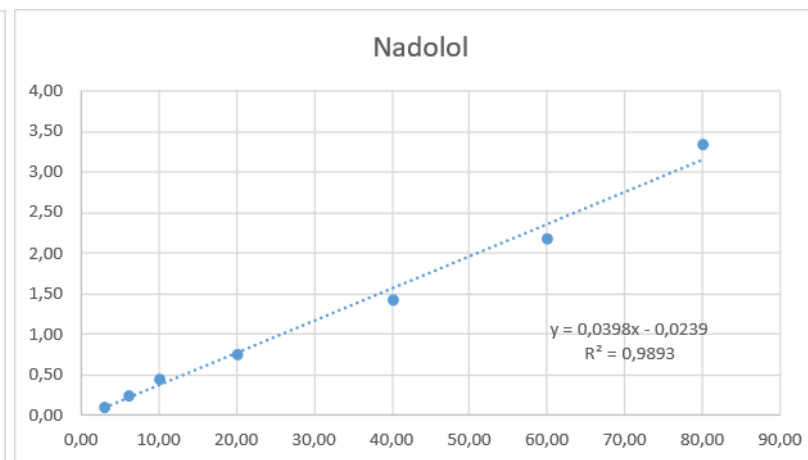
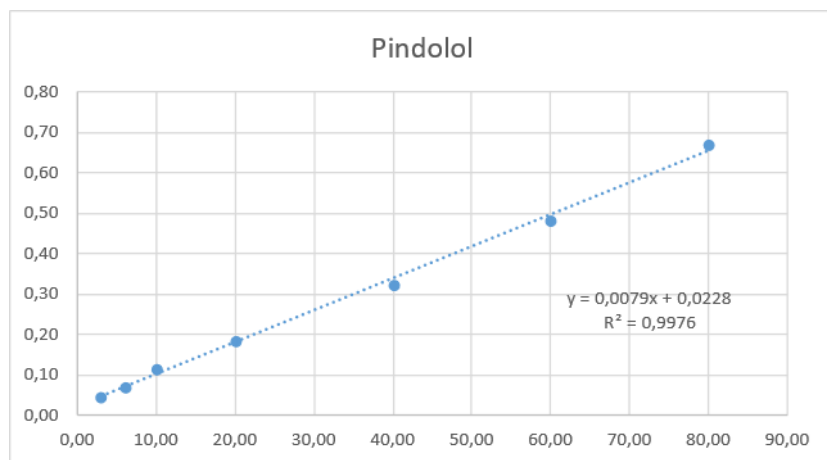
As curvas de calibração foram construídas com amostras de plasma fortificado. Os betabloqueadores foram extraídos por M-MIPs e determinados pela técnica MPS-MS. Com o ajuste do ângulo da fonte para α de 90° e a alteração do método MS para o protocolo 3 foi factível a validação de seis betabloqueadores dos setes estudados (figura 34), não foi validado apenas o Oxprenolol (Figura 38), devido à presença de sangramento. A linearidade das curvas foi avaliada pelo R^2 , sendo os valores obtidos superiores a 0,987 (Tabela 7).

Adicionalmente, também foram efetuados ensaios de precisão e exatidão, e os resultados obtidos estavam de acordo com as diretrizes da *Food and Drug Administration* (BOOTH; SIMON, 2016), com RSD% a variar entre 5,11 e 21,20% e ER% a variar entre -17,05 e 15,46% (Tabela 7). O LOQ é a concentração mais baixa que pode ser analisada com precisão e exatidão e foi definido como o primeiro ponto da curva de calibração, sendo $3 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos. Os LODs foram a menor concentração detectável pelo método e variaram de 0,64 a $2,41 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 7).

O método desenvolvido e validado foi testado em MPS-MS em amostras reais, e as concentrações encontradas são apresentadas na (Tabela 7). E finalmente, os sinais transientes obtidos para análises de ATE, ATE D7, LAB, MET, PIND, NAD e PROP (Figura 39), num conjunto de amostras de plasma fortificadas a $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (a). b) Espectro de massa com todos os íons de monitorização.

Figura 38 - Curva analítica de padrões dos betabloqueadores com P. I. em plasma. Gráficos eixo x= concentração e eixo y= área relativa.





Fonte: Autora (2024).

Tabela 7 - Figuras de méritos obtidas com amostras de plasma fortificado analisadas por MPS-MS.

Betabloqueador	Equação	R ²	RSD%	RE%	LOD (µg L ⁻¹)
Pindolol	y= .0079x + 0.0228	0.9976	16.28 ^a 11,91 ^b 13,60 ^c	-11.56 ^a 1,22 ^b 2,40 ^c	1.83
Nadolol	y= .0398x – 0.0239	0.9893	7.13 ^a 9,70 ^b 12,4 ^c	12.51 ^a -1,03 ^b 5,87 ^c	1.81
Metoprolol	y = 0.0094x + 0.0058	0.9893	15.44 ^a 11,05 ^b 5,11 ^c	-3.30 ^a 15,46 ^b 4,60 ^c	1.22
Labetalol	y= .0465x – 0.0416	0.9872	15.41 ^a 15,43 ^b 8,53 ^c	18.93 ^a 1,27 ^b 6,47 ^c	1.83
Propranolol	y= 0.0249x + 0.0439	0.9912	14.21 ^a 9,08 ^b 10,89 ^c	-3.83 ^a 9,03 ^b 4,67 ^c	0.64
Atenolol	y= .0077x + 0.0299	0.9962	21.20 ^a 6,89 ^b 10,61 ^c	-17.05 ^a 13,89 ^b 2,37 ^c	2.41

Nota: ^a 3 µg L⁻¹; ^b 20 µg L⁻¹; ^c80 µg L⁻¹. RSD%: Desvio padrão relativo; RE%: Erro relativo; LOD: Limite de detecção

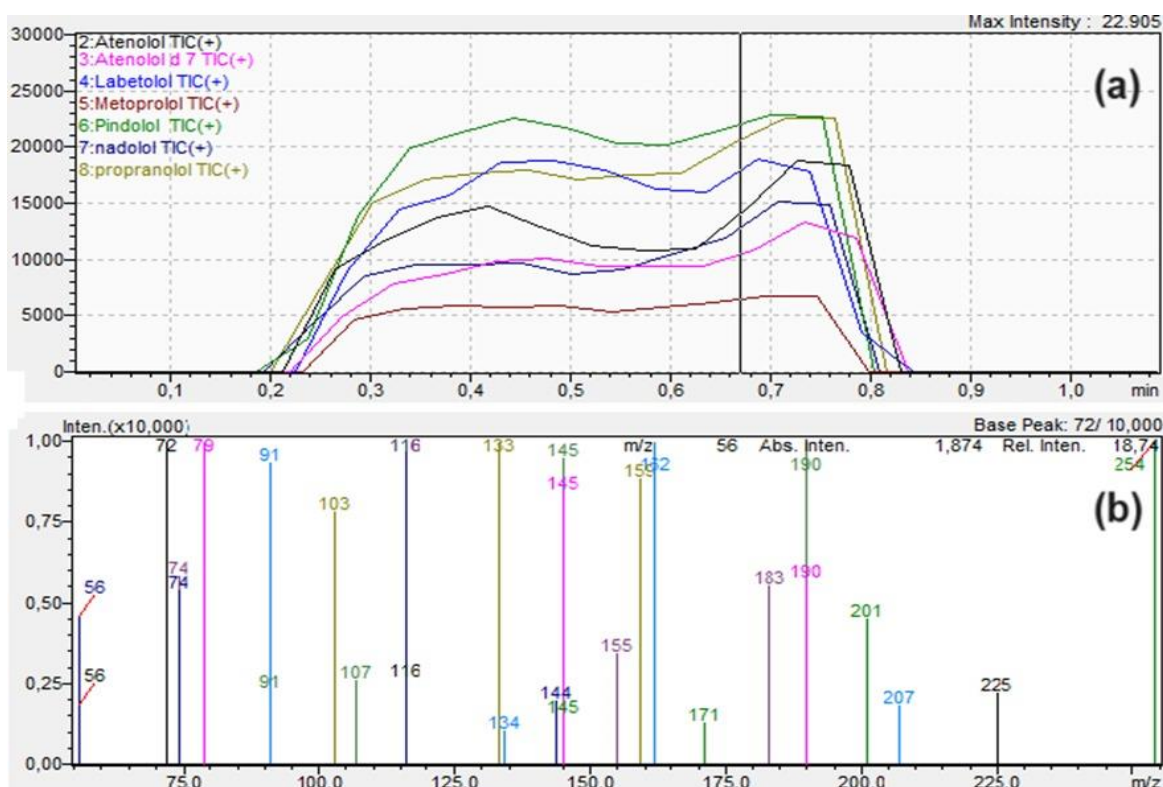
Os resultados encontrados para MET e ATE (Tabela 8), estão acima da faixa terapêutica encontradas na literatura, que segundo Gu et al. (2014) é de na concentração de 0,1-1,0 µg mL⁻¹ no plasma humano.

Tabela 8 - Aplicação do método validado em amostras reais por MPS-MS

Betabloqueadores	Concentração (µg L ⁻¹)
Metoprolol	12,2 ± 0,8
Atenolol	73,9 ± 9,5

Fonte: Autora (2024)

Figura 39 - Sinais transientes obtidos para análises de atenolol, atenolol D7, labetalol, metoprolol, pindolol, nadolol e propranolol num conjunto de amostras de plasma fortificadas a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a). b) Espectro de massa com todos os íons de monitorização.



Fonte: Autora (2024)

A MPS-MS possibilita a eluição e a ionização simultâneas do analito por espectrometria de massa. Neste estudo, foram propostas algumas melhorias no design do MPS-MS, como em seu ângulo. A mudança do ângulo para de 60° para 90° , favorece a formação da gota que envolve o sorvente e com isso promove uma melhor dessorção do analito, permitindo uma melhora na formação do cone de Taylor, principalmente devido ao rápido fluxo do solvente por gravidade, resultando em sinal analítico adequado.

Além disso, foi possível manusear a sonda de forma mais fácil na entrada do MS, com encaixe perfeito no orifício de acoplamento da fonte ESI convencional. Também não foram observadas perdas de partículas durante a aplicação de alta tensão. E parâmetros do MS, como alteração no tempo do solvente, assim como, modificação no volume de vazão. Foi investigada também o parâmetro de voltagem, essa análise participou com seu desempenho mais reprodutível e proporcional à

maior facilidade de manuseio do dispositivo na entrada do MS.

A MPS-MS é inspirado na fonte ESI, mas a preparação de amostras é totalmente incorporada ao processo, que é extremamente ágil e com mínimo efeito de diluição (aproximadamente 75 μ L de solvente são necessários para a eluição/ionização dos analitos por ciclo). Além disso, o spray formado não requer uma fonte auxiliar de nitrogênio, como é necessário nas técnicas DESI e EASI. Ao contrário da técnica PS-MS, que requer um longo período para a secagem do papel, a MPS-MS pode ser utilizada imediatamente após a amostragem. No entanto, a principal vantagem da MPS-MS é, sem dúvida, a preparação integrada de amostras. Isso ocorre devido à possibilidade real de minimizar a supressão de íons, à rápida substituição do sorvente magnético em análises sequenciais e à disponibilidade de diversos sorventes magnéticos já estabelecidos na literatura para a técnica de d-SPE, os quais podem ser avaliados para análises de diferentes moléculas e amostras.

O novo projeto do MPS-MS foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de seis betabloqueadores em amostras de plasma humano, utilizando M-MIP como sorvente. Os polímeros demonstraram uma extração adequada e seletiva dos analitos, permitindo uma eluição fácil dos betabloqueadores a partir da ponta da sonda magnética.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de analisar fármacos diretamente por espectrometria de massas, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um dispositivo de ionização ambiente nomeado MPS-MS patenteada sob o nº BR 10 2023 019425 7. Que foi testado para os betabloqueadores resultando em um ótimo sinal analítico, mas com pouca reprodutibilidade. Necessitando assim, de um aprimoramento no seu design e parâmetros de análise.

O novo design do MPS-MS foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de seis betabloqueadores em amostras de plasma humano, empregando M-MIP como sorvente. Os polímeros apresentaram uma extração adequada e seletiva para os analitos e permitiram uma fácil eluição dos betabloqueadores por meio da ponta da sonda magnética.

A MPS-MS viabiliza simultaneamente a eluição e a ionização do analito por espectrometria de massa. Neste estudo, foram propostas algumas melhorias no desenho do MPS-MS (principalmente no seu ângulo), tornando o seu desempenho mais reprodutível, adequando uma maior facilidade de manuseio do dispositivo na entrada do MS.

Também foram realizadas algumas modificações nos parâmetros do MS, melhorando as figuras de mérito como a precisão, que se encontravam fora dos limites recomendados pelos guias de validação, quando testado em água usando o protocolo 2. Modificando para o protocolo 3 e preparando as amostras fortificadas em plasma que é uma matriz muito mais complexa, as figuras de mérito ficaram dentro do limite esperado, comprovando, assim, o sucesso das nossas alterações.

O método desenvolvido pode ser aplicado a análises de rotina, uma vez que é simples de operar e rápido (54 análises por hora). Além disso, o método foi validado, apresentando LOD e LOQ adequados (mesmo para a análise de betabloqueadores num contexto de dopagem), e estava em consonância com os princípios da química verde, empregando pequenas quantidades de amostra, solvente e sorvente por análise.

A MPS-MS abre uma nova perspectiva na associação entre preparação de amostras e espectrometria de massa com ionização ambiente, com potencial para ser aplicada com outros sorventes para diferentes amostras e analitos.

REFERÊNCIAS

- ALBERICI, L. C.; OLIVEIRA, H. C. F.; CATHARINO, R. R.; VERCESI, A. E.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. M. Distinct hepatic lipid profile of hypertriglyceridemic mice determined by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg v. 401, n. 5, p. 1655–1663, 2011. Doi: doi.org/10.1007/s00216-011-5208-8
- ALLOCHIO FILHO, J. F. A.; PIRES, B. C.; SANTOS, N. A.; DIONISIO, S. J. I.; DOS CONCEIÇÃO, N. S.; FEU, A. E.; DE SOUZA BORGES, W.; LACERDA, V.; ROMÃO, W. Application Of Paper Spray Ionization Mass Spectrometry And Related Techniques In The Direct Analysis Of Biological Matrices For Detection Of Drugs - A Review. **Química Nova**, São Paulo, v. 46, n. 10, p. 972–982, 2023. Doi: doi.org/10.21577/0100-4042.20230074
- ANACLETO, S. da S.; DE OLIVEIRA, H. L.; DA SILVA, A. T. M.; DO NASCIMENTO, T. A.; BORGES, K. B. Preparation of an organic–inorganic hybrid molecularly imprinted polymer for effective removal of albendazole sulfoxide enantiomers from aqueous medium. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S.], v. 5, n. 6, p. 6179–6187, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.049
- ANTAL, B.; KUKI, Á.; NAGY, L.; NAGY, T.; ZSUGA, M.; KÉKI, S. Rapid detection of hazardous chemicals in textiles by direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 408, n. 19, p. 5189–5198, 2016. Doi: doi.org/10.1007/s00216-016-9603-z
- BARDE, L. N.; GHULE, M. M.; ROY, A. A.; MATHUR, V. B.; SHIVHARE, U. D. Development of molecularly imprinted polymer as sustain release drug carrier for propranolol HCL. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, London, v. 39, n. 8, p. 1247–1253, 2013. Doi: <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.710236>
- BARROSO, W.K.S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 116, n.3, p. 516-658, 2021.
- BOOTH, B. P.; SIMON, W. C. Analytical method validation. **New Drug Development: Regulatory Paradigms for Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics**, United Kingdom, n. May, p. 138–159, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1201/9780203026427-15>
- BRUNA, B. R.; DIAS, L. R. S.; SPINELLI, E.; MURI, E. M. F. Polímeros de Impressão Molecular Obtidos Através de Polimerização por Precipitação e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida. **Polímeros**, São Carlos, v. 23, n. 4, p. 509–513, 2013. Doi: <https://doi.org/10.4322/polimeros.2013.055>
- BULÁNEK, R.; HRDINA, R.; HASSAN, A. F. Preparation of polyvinylpyrrolidone modified nanomagnetite for degradation of nicotine by heterogeneous Fenton process. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S.], v. 7, n. 2, p. 102988, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102988>
- CHEN, F. F.; XIE, X. Y.; SHI, Y. P. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for selective recognition of resveratrol in wine. **Journal of Chromatography**

A, [S.I], v. 1300, p. 112–118, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.018>

CHEN, H.; VENTER, A.; COOKS, R. G. Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation. **Chemical Communications**, London, n. 19, p. 2042–2044, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1039/b602614a>

CHEN, H.; WORTMANN, A.; ZHANG, W.; ZENOBI, R. Rapid In Vivo Fingerprinting of Nonvolatile Compounds in Breath by Extractive Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie**, Germany, v. 119, n. 4, p. 586–589, 2007 a. Doi: <https://doi.org/10.1002/ange.200602942>

CHEN, H.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; LUO, M.; WANG, Z.; QIAO, X. Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination. **Journal of Mass Spectrometry**, [S.I], v. 42, n. 8, p. 1045–1056, 2007 b. Doi: <https://doi.org/10.1002/jms.1235>

CHEN, L.; GHIASVAND, A.; RODRIGUEZ, E. S.; INNIS, P. C.; PAULL, B. Applications of nanomaterials in ambient ionization mass spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S.I] v. 136, p. 116202, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116202>

CHEN, L.; LI, B. Application of magnetic molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. **Analytical Methods**, [S.I], v. 4, n. 9, p. 2613–2621, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1039/c2ay25354b>

CORMACK, P. A. .; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, [S.I], v. 804, n. 1, p. 173–182, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>

DA SILVA, A. T. M.; PIRES, B. C.; DINALI, L. A. F.; MAIA, A. C. F. C.; DOS SANTOS, C. J.; SANCHES, C.; BORGES, W. de S.; BORGES, K. B. Terephthalic acid-based magnetic molecularly imprinted polymer for enantioselective capillary electrophoresis determination of atenolol in human plasma. **Separation and Purification Technology**, v. 261, n. May 2020, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118257>

DA SILVA, L. C.; PEREIRA, I.; DE CARVALHO, T. C.; ALLOCHIO FILHO, J. F.; ROMÃO, W.; VAZ, B. G. Paper spray ionization and portable mass spectrometers: A review. **Analytical Methods**, [S.I], v. 11, n. 8, p. 999–1013, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1039/c8ay02270d>

DA SILVA, W. A.; FEITEIRA, F. N.; FRANCISCO, J. E.; TOLOZA, C. A. T.; AUCÉLIO, R. Q.; PACHECO, W. F. Pre-concentration of rosuvastatin using solid-phase extraction in a molecularly imprinted polymer and analytical application in water supply. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.I], v. 27, n. 11, p. 11724–11735, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07742-3>

DE FARIA, H. D.; ABRÃO, L. C. de C.; SANTOS, M. G.; BARBOSA, A. F.;

FIGUEIREDO, E. C. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 959, p. 43–65, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.047>

DE OLIVEIRA, H. L.; TEIXEIRA, L. S.; DINALI, L. A. F.; PIRES, B. C.; SIMÕES, N. S.; BORGES, K. B. Microextraction by packed sorbent using a new restricted molecularly imprinted polymer for the determination of estrogens from human urine samples. **Microchemical Journal**, [S.l.], v. 150, n. April, p. 104162, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104162>

DING, X.; HEIDEN, P. A. Recent developments in molecularly imprinted nanoparticles by surface imprinting techniques. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 299, n. 3, p. 268–282, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1002/mame.201300160>

FIGUEIREDO, E.C.; MENDES, T. V. **Dessorção E Ionização Por Spray A Partir De Partículas Magnéticas Em Espectrometria De Massas**. BR 10 2023 019425 7. Concessão: [s. d.]

FAKHRHOSEINI, S. M.; LI, Q.; UNNIKRISSHANN, V.; NAEBE, M. Nano-magnetite decorated carbon fibre for enhanced interfacial shear strength. **Carbon**, [S.l.], v. 148, p. 361–369, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.03.078>.

FAPA-MS, S.; ESI-MS, I. M. S.; GU, M. Application of Molecularly Imprinted Polymers (MIP) and Magnetic Molecularly Imprinted Polymers (mag-MIP) to Selective Analysis of Quercetin in. p. 1–15, 2019

FEIDER, C. L.; KRIEGER, A.; DEHOOG, R. J.; EBERLIN, L. S. Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 91, n. 7, p. 4266–4290, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00807>

FIGUEIREDO, E.C.; BORGES, KEYLLER BASTOS; QUEIROZ, M. E. C. (organizador). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2015.

FIGUEIREDO, E. C.; DE OLIVEIRA, D. M.; DE SIQUEIRA, M. E. P. B.; ARRUDA, M. A. Z. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 635, n. 1, p. 102–107, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.045>

GU, H. W. *et al.* Multi-targeted interference-free determination of ten β -blockers in human urine and plasma samples by alternating trilinear decomposition algorithm-assisted liquid chromatography-mass spectrometry in full scan mode: Comparison with multiple reaction monit. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 848, p. 10–24, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.052>

HO, Y. S.; MCKAY, G. The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat. **Water Research**, Cambridge, v. 34, n. 3, p. 735–742, 2000. Doi:

[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00232-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00232-8)

HU, X.; PAN, J.; HU, Y.; LI, G. Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of β -blockers in urine and plasma samples. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1216, n. 2, p. 190–197, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.064>

HUANG, B.; ZHOU, X.; CHEN, J.; WU, G.; LU, X. Determination of malachite green in fish based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by electrochemiluminescence. **Talanta**, [S.l.], v. 142, p. 228–234, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.053>

HUANG, S.; XU, J.; ZHENG, J.; ZHU, F.; XIE, L.; OUYANG, G. Synthesis and application of magnetic molecularly imprinted polymers in sample preparation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 410, n. 17, p. 3991–4014, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1013-y>

KAKADIYA, P. R.; REDDY, B. P.; SINGH, V.; GANGULY, S.; CHANDRASHEKHAR, T. G.; SINGH, D. K. Low level determinations of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate impurities in Lopinavir and Ritonavir Active pharmaceutical ingredients by LC/MS/MS using electrospray ionization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v. 55, n. 2, p. 379–384, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.039>

KONG, X.; GAO, R.; HE, X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymers (Fe₃O₄@MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1245, p. 8–16, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.061>

KUO, T. H.; DUTKIEWICZ, E. P.; PEI, J.; HSU, C. C. Ambient Ionization Mass Spectrometry Today and Tomorrow: Embracing Challenges and Opportunities. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 92, n. 3, p. 2353–2363, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05454>

LEE, C.; KIM, J. H.; MOON, S. J.; SHIM, J.; KIM, H. I.; CHOI, M. H. Selective LC-MRM/SIM-MS based profiling of adrenal steroids reveals metabolic signatures of 17 α -hydroxylase deficiency. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [S.l.], v. 198, n. December 2019, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105615>

LIU, W.; HOLDSWORTH, C.; YE, L. Synthesis of molecularly imprinted polymers using a functionalized initiator for chiral-selective recognition of propranolol. **Chirality**, Germany, v. 32, n. 3, p. 370–377, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1002/chir.23167>

LYU, Y. G.; BAI, H.; LI, W. T.; YANG, J. K.; HE, Y. J.; MA, Q. Progress of Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry and Its Applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, China, v. 47, n. 1, p. 1–12, 2019. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(18\)61132-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(18)61132-6)

MARTÍNEZ-JARQUÍN, S.; MORENO-PEDRAZA, A.; GUILLÉN-ALONSO, H.; WINKLER, R. Template for 3D Printing a Low-Temperature Plasma Probe. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 88, n. 14, p. 6976–6980, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01019>

MENDES, T. V. **Síntese E Caracterização De Polímeros De Impressão Molecular Magnéticos De Acesso Restrito E Avaliação Da Capacidade De Exclusão De Proteínas E De Sorção Seletiva De Nicotina**. 2018. - Univerdade Federal de Alfenas, [s. l.], 2018.

MENDES, T. V.; FIGUEIREDO, E. C. Magnetic particle spray mass spectrometry. p. 1–22, [s. d.].

MENDES, T. V.; FRANQUI, L. S.; SANTOS, M. G.; WISNIEWSKI, C.; FIGUEIREDO, E. C. Synthesis and characterization of a new magnetic restricted access molecularly imprinted polymer for biological sample preparation. **Materials Today Communications**, UK, v. 24, n. January, p. 101002, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101002>

MILLER, G. D.; VAN WAGONER, R. M.; BRUNO, B. J.; HUSK, J. D.; FEDORUK, M. N.; EICHNER, D. Investigating oral fluid and exhaled breath as alternative matrices for anti-doping testing: Analysis of 521 matched samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v. 176, p. 112810, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112810>

NA, N.; ZHANG, C.; ZHAO, M.; ZHANG, S.; YANG, C.; FANG, X.; ZHANG, X. Direct detection of explosives on solid surfaces by mass spectrometry with an ambient ion source based on dielectric barrier discharge. **Journal of Mass Spectrometry**, [S.l.], v. 42, n. 8, p. 1079–1085, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1002/jms.1243>

PARR, M. K.; WUEST, B.; NAEGELE, E.; JOSEPH, J. F.; WENZEL, M.; SCHMIDT, A. H.; STANIC, M.; DE LA TORRE, X.; BOTRÈ, F. SFC-MS/MS as an orthogonal technique for improved screening of polar analytes in anti-doping control. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 408, n. 24, p. 6789–6797, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9805-4>

PETCHAROEN, K.; SIRIVAT, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, London, v. 177, n. 5, p. 421–427, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2012.01.003>

PISTONE, A.; IANNAZZO, D.; FAZIO, M.; CELEGATO, F.; BARRERA, G.; TIBERTO, P.; GIORDANO, A.; AZZERBONI, B.; GALVAGNO, S. Synthesis and magnetic properties of multiwalled carbon nanotubes decorated with magnetite nanoparticles. **Physica B: Condensed Matter**, [S.i.], v. 435, p. 88–91, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.physb.2013.11.015>

PUJOS, E.; CREN-OLIVÉ, C.; PAISSE, O.; FLAMENT-WATON, M. M.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Comparison of the analysis of β -blockers by different techniques.

Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, [S.I.], v. 877, n. 31, p. 4007–4014, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.014>

ROYER, B.; CARDOSO, N. F.; LIMA, E. C.; VAGHETTI, J. C. P.; SIMON, N. M.; CALVETE, T.; VESES, R. C. Applications of Brazilian pine-fruit shell in natural and carbonized forms as adsorbents to removal of methylene blue from aqueous solutions-Kinetic and equilibrium study. **Journal of Hazardous Materials**, USA, v. 164, n. 2–3, p. 1213–1222, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.028>

SANTHOSH, P. B.; ULRIH, N. P. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. **Cancer Letters**, [S.I.], v. 336, n. 1, p. 8–17, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.032>

SANTOS, M. G.; TAVARES, I. M. C.; BARBOSA, A. F.; BETTINI, J.; FIGUEIREDO, E. C. Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification. **Talanta**, [S.I.], v. 163, n. October 2016, p. 8–16, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.047>

SANTOS, M. G.; TAVARES, I. M. C.; BORALLI, V. B.; FIGUEIREDO, E. C. Direct doping analysis of beta-blocker drugs from urinary samples by on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography/mass spectrometry. **Analyst**, v. 140, n. 8, p. 2696–2703, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1039/c4an02066a>

SARVESTANI, M. R. J.; MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A. Developed electrochemical sensors for the determination of beta-blockers: A comprehensive review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S.I.], v. 899, n. August, p. 115666, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115666>

SHI, L.; HABIB, A.; BI, L.; HONG, H.; BEGUM, R.; WEN, L. Ambient Ionization Mass Spectrometry: Application and Prospective. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, London, v. 0, n. 0, p. 1–50, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2124840>

SUN, Q.; LUO, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; YANG, X. Comparative analysis of aged documents by desorption electrospray ionization–Mass spectrometry (<sc>DESI-MS</sc>) imaging. **Journal of Forensic Sciences**, Germany, v. 67, n. 5, p. 2062–2072, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15071>

SZATKOWSKA, P.; KOBA, M.; KOSLINSKI, P.; SZABLEWSKI, M. Molecularly Imprinted Polymers' Applications: A Short Review. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, [S.I.], v. 10, n. 4, p. 400–408, 2013. Doi: <https://doi.org/10.2174/1570193x11310030016>

TOMKOVÁ, J.; ONDRA, P.; KOCIANOVÁ, E.; VÁCLAVÍK, J. Fast and sensitive analysis of beta blockers by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, Germany, v. 31, n. 7, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.3911>

TONUCCI, M. C.; DOS SANTOS XAVIER, L. P.; DA SILVA, A. C.; AQUINO, S. F.; BAETA, B. E. L. Removal of Estradiol from Water with a Hybrid MIP-TiO₂ Catalytic Adsorbent. **Water, Air, & Soil Pollution**, USA, v. 231, n. 5, p. 215, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04586-y>

VAN DOMBURG, B.; VAN DER NAGEL, B. C. H.; ANDREWS, L. M.; KOCH, B. C. P. High-throughput quantification of ten antiarrhythmic drugs in human plasma using UPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [S.], v. 1129, p. 121793, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121793>

VAN EENOO, P.; VAN GANSBEKE, W.; DE BRABANTER, N.; DEVENTER, K.; DELBEKE, F. T. A fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S.], v. 1218, n. 21, p. 3306–3316, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.082>

WADA. **World Anti-Doping Code International Standard Prohibited List**. 2021. Doi: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf. Acesso em: 02 maio de 2021.

WILLIAMS, J. P.; NIBBERING, N. M. M.; GREEN, B. N.; PATEL, V. J.; SCRIVENS, J. H. Collision-induced fragmentation pathways including odd-electron ion formation from desorption electrospray ionisation generated protonated and deprotonated drugs derived from tandem accurate mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, [S.], v. 41, n. 10, p. 1277–1286, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1002/jms.1091>

YEMIŞ, F.; ALKAN, P.; YENIGÜL, B.; YENIGÜL, M. Molecularly imprinted polymers and their synthesis by different methods. **Polymers and Polymer Composites**, [S.], v. 21, n. 3, p. 145–150, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1177/096739111302100304>

YILDIRIM, S.; FIKAROVÁ, K.; PILAŘOVÁ, V.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; HORSTKOTTE, B. Lab-in-syringe automated protein precipitation and salting-out homogenous liquid-liquid extraction coupled online to UHPLC-MS/MS for the determination of beta-blockers in serum. **Analytica Chimica Acta**, [S.], v. 1251, n. December 2022, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340966>

YU, J.; HU, X.; SONG, R.; XI, S. Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by precipitation polymerization for atenolol recognition. **Advanced Materials Research**, London, v. 148–149, p. 1192–1198, 2011. Doi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.148-149.1192>

ZENG, H.; WANG, Y.; NIE, C.; KONG, J.; LIU, X. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for separating rutin from Chinese medicinal plants. **Analyst**, [S.], v. 137, n. 10, p. 2503–2512, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1039/c2an35259a>

ZHANG, X.-L.; ZHANG, H.; WANG, X.-C.; HUANG, K.-K.; WANG, D.; CHEN, H.-W. Advances in Ambient Ionization for Mass Spectrometry. **Chinese Journal of**

Analytical Chemistry, China, v. 46, n. 11, p. 1703–1713, 2018. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(18\)61122-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(18)61122-3)

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; NIU, D.; LI, Y.; SHI, J. Highly efficient and selective removal of trace lead from aqueous solutions by hollow mesoporous silica loaded with molecularly imprinted polymers. **Journal of Hazardous Materials**, USA, v. 328, p. 160–169, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.003>