

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUCAS ROSSI SARTORI

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM POLÍMERO MOLECULARMENTE
IMPRESSO (MIP) COM ATIVIDADE CATALÍTICA PARA OXIDAÇÃO DE EPINEFRINA**

**Alfenas/MG
2010**

LUCAS ROSSI SARTORI

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO (MIP) COM ATIVIDADE CATALÍTICA PARA OXIDAÇÃO DE EPINEFRINA

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

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

**Alfenas/MG
2010**

Sartori, Lucas Rossi.

Síntese, caracterização e aplicação de um polímero molecularmente impresso (MIP) com atividade catalítica para oxidação de epinefrina / Lucas Rossi Sartori. - Alfenas, 2010. 101 f. -

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas.

Bibliografia.

1. Epinefrina. 2. Análise Química - métodos. 3. Impressão Molecular. 4. Polímeros - química. 5. Análise de Injeção de Fluxo. I. Título.

CDD: 543

LUCAS ROSSI SARTORI

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO (MIP) COM ATIVIDADE CATALÍTICA PARA OXIDAÇÃO DE EPINEFRINA

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

Aprovada em:

Prof.: Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Instituição: Unifal-MG **Ass.:** _____

Prof.: Dr. Arnaldo César Pereira

Instituição: UFSJ **Ass.:** _____

Prof.: Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Instituição: Unifal-MG **Ass.:** _____

Ao meu grande mestre e exemplo de vida digna,
meu “nonno” Antônio Sartori.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de mestrado e financiamento do projeto.

Ao Governo da República Federativa do Brasil, representado pela Universidade Federal de Alfenas, pela disponibilização da infra-estrutura, corpo docente, funcionários e recursos financeiros que tornaram viáveis a execução do projeto.

Ao professor César por apostar e confiar no meu trabalho, e pelo apoio oferecido em todos os aspectos que envolvem a conquista deste objetivo ambicioso.

Aos vários colegas de laboratório que me presentearam com seu convívio durante este período de tempo, ora lento, ora depressa demais, deixo meu agradecimento a eles e elas: Camila, Letícia, Vívian, Bruno Baeta, Bruno Giordano, Gustavo Silveira, Gustavo Pessoa, Juliana, Ayla, Polyana, Giovana, Fernanda Fantin, Lucimara, Solange, Ana Lúcia, Felipe, Mariana, Ariadne e Thiago.

Aos técnicos de laboratório Denis, Maria, Marília, Bernadete, Gabriel e dona Neide pelo suporte nas mais variadas situações.

Ao professor José Maurício Schneedorf pelas discussões sempre interessantes e pertinentes, porém sempre, no mínimo, curiosas.

Ao professor Marcelo Henrique pelos ensinamentos em análises de caracterização e demonstração de humildade constante.

À professora Marília Caixeta pelo apoio nas questões burocráticas e pela forma coerente que trata tais situações. Obrigado também pelo apoio psicológico nos momentos difíceis desta caminhada.

À professora Mirta Mir Caraballo pelo apoio na realização do primeiro acontecimento oficial organizado pela Associação dos Pós-Graduandos da Unifal-MG (APG).

Aos colegas da APG pelo esforço conjunto para a criação desta associação que ainda terá grande importância para a comunidade acadêmica. Em especial ao Rudy, Ivan e Valdomiro que foram os primeiros idealizadores desta idéia.

Ao professor Luiz Beijo pela orientação concedida durante a criação da APG.

Ao professor Ihosvany Camps pelo empenho nos trabalhos de modelagem molecular.

À professora Maísa Brigagão pela disponibilidade em ceder seu laboratório e materiais na realização das análises cromatográficas.

Ao professor Pedro, pelos questionamentos intrigantes que em muito nos fazem crescer cientificamente.

Ao pessoal da limpeza e guardas, por manter a ordem, arrumação e limpeza, o que impulsiona o progresso.

Aos companheiros da Confraria dos Pernetas, pelo sagrado futebol das quartas.

Aos bibliotecários Ronan e Fátima pelas considerações acerca da formatação deste trabalho.

Ao Márcio Silva, secretário do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas pelo grande suporte fornecido.

Ao meu primo Daniel, meu assessor para assuntos informáticos.

Ao colega Douglas, pelo fornecimento das amostras utilizadas.

À colega Camila, pelo auxílio na coleta de amostras biológicas.

Ao professor Lauro Tatsuo Kubota, pelo fornecimento de materiais e reagentes utilizados.

À Dra. Wilney Santos, pelo apoio junto à Universidade de Campinas na aquisição dos dados de microscopia eletrônica de varredura e termogravimetria.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu grande pai Sartori, que sempre me forneceu e fornecerá apoio incondicional, porém extremamente racional e realista, em tudo o que decido fazer. Será o meu eterno oráculo para as questões indissolúveis, com suas ponderações equilibradas e que consideram sempre todas as perspectivas possíveis de se analisar uma situação. Muito obrigado também pelo suporte logístico sempre oferecido na maior boa vontade.

À minha irmã Angélica, simplesmente por ser uma pessoa fantástica, brigadora, e que acima de tudo ainda me agraciou com o apadrinhamento do nosso querido Pedro.

Ao meu cunhado Dennys, pela motivação extra passada através do seu amor e dedicação à ciência.

À minha avó, por gerenciar a organização da minha vida extra-universidade de forma brilhante e ainda com o “plus” do melhor feijão do Brasil!

À Lucélia, pessoa carinhosa, calma, inteligente e companheira, que tem grande contribuição neste trabalho.

Aos meus queridos tios e tias Jacira, Geni, Júlia, Júlio, Joel e Jair, e especialmente aos meus padrinhos Julieta e Francisco, que a todo momento incentivam e admiram a minha busca por crescimento pessoal e profissional.

À minha querida mãe Gessi, que embora tenha partido prematuramente do nosso convívio, tenho certeza que muito se orgulharia em ver suas virtudes e ensinamentos guardados comigo.

RESUMO

A técnica de preparação de polímeros molecularmente impressos (MIP), desde seu surgimento em 1972, tem promovido avanços relevantes em diferentes segmentos da Química Analítica, principalmente em procedimentos de extração em fase sólida. Porém, o uso de polímeros impressos com atividade catalítica ainda é recente. Assim, no presente trabalho foi sintetizado um MIP (MIP-MAA) seletivo com atividade catalítica na reação de oxidação de epinefrina (EP) por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) utilizando hemina e ácido metacrílico (MAA) como monômeros funcionais na síntese do polímero, conferindo ao MIP sítios seletivos e prostéticos à molécula molde de EP e também aumentando a atividade do material em meio aquoso. Foram preparados simultaneamente: polímero não impresso (NIP1), polímero não impresso sem hemina (NIP2) e polímero impresso com hemina e 4-vinilpiridina (MIP-4VPy). Os materiais foram sintetizados utilizando-se a técnica de “bulk”, através de polimerização radicalar livre termoativada, conforme descrito por Santos et al (2007) com pequenas modificações. Após a síntese, os materiais foram triturados, secos e peneirados em diâmetro máximo de 106 μm e na seqüência procedeu-se a extração da molécula molde com solução de metanol:ácido acético (4:1) (v/v). O material foi submetido a análises de caracterização física, como microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TG) e infravermelho (IR). A técnica de detecção foi a amperometria com potencial fixo em 0,0 V vs Ag/AgCl, a qual foi acoplada à saída de um sistema de injeção em fluxo (FIA) de linha única. O sistema FIA consistiu da introdução da amostra de EP (tampão tris-HCl 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0, 120 μL) num fluxo carregador de H_2O_2 (300 $\mu mol L^{-1}$, 0,9 mL min⁻¹). Após percolação da amostra no reator biomimético, ocorre catálise da reação de oxidação da EP pelo H_2O_2 , onde o produto formado é monitorado por amperometria através da variação de corrente *versus* tempo. O MIP-MAA demonstrou atividade catalítica superior ao NIP1, NIP2 e MIP-4VPy, evidenciado a efetividade da impressão molecular. O nível de interferência observado para moléculas semelhantes à EP foi inferior a 45% considerando-se a amplitude de sinal. Por meio da caracterização física foi possível detectar a presença de diferenças morfológicas entre o MIP-MAA, NIP1 e NIP2, principalmente na análise de TG.

Palavras-chave: Epinefrina. Análise Química – métodos. Impressão Molecular. Polímeros – química. Análise de Injeção de Fluxo.

ABSTRACT

The technique for preparation of molecularly imprinted polymers (MIP), since its first description in 1972, has promoted relevant advances to different segments of Analytical Chemistry, particularly in procedures for solid phase extraction. However, the use of imprinted polymers with catalytic activity is still young. In the present work was synthesized a MIP (MIP-MAA) with selective catalytic activity for the oxidation of epinephrine (EP) by hydrogen peroxide (H_2O_2) using hemin and methacrylic acid (MAA) as functional monomers in the synthesis of the polymer, giving to the MIP selective and prosthetic binding sites for the template molecule of EP and also increasing the activity of the material in water. Simultaneously were prepared the following materials: non-imprinted polymer (NIP1), non-imprinted polymer without hemin (NIP2) and imprinted polymer with hemin and 4-vinylpyridine (MIP-4VPy). The materials were synthesized using the technique of bulk by free radical polymerization thermo-activated, as described by Santos et al (2007) with minor modifications. After synthesis, the materials were milled, dried and sieved to a maximum diameter of 106 μm . Afterward, the template molecule was extracted from MIP with a solution of methanol: acetic acid (4:1) (v / v) and the final product was submitted to analysis of physical characterization, such as scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetry (TG) and infrared (IR). The detection technique was amperometry with the potential fixed in 0.0 V vs. Ag / AgCl, which was coupled to the output of a system of flow injection analysis (FIA) in a single line mode. The FIA system consisted of the introduction of the sample EP (tris-HCl 0.1 mmol L⁻¹, pH 8.0, 120 μL) in a carrier stream of H_2O_2 (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0.9 mL min⁻¹). After percolation of the sample on the biomimetic reactor, the catalysis of the EP oxidation by H_2O_2 occur, being the product formed monitored by amperometry through the variation of current versus time. The MIP-MAA showed higher catalytic activity of NIP1, NIP2 and MIP-4VPy, demonstrating the effectiveness of molecular imprinting. The level of interference observed for molecules similar to the EP was less than 45% considering the signal amplitude. Through physical characterization was possible to detect the presence of morphological differences between the MIP-MAA, NIP1 and NIP2, especially in the TG analysis.

Key words: Epinephrine. Chemical analysis – methods. Molecular Imprinting. Polymers – chemistry. Flow Injection Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Reação 1. Método enzimático direto.....	22
Reação 2. Determinação indireta de retinol através da formação de NADH.....	22
Reação 3. Geração de fragmentos radicalares livres provenientes do iniciador radicalar (a) AIBN (2,2'-azo-bis-iso-butironitrila) (b) radical livre (SALAMONE, 1996).....	32
Figura 1. Representação esquemática da estrutura celular evidenciando os receptores de membrana e a interação deste com um fármaco específico.....	28
Figura 2. Fórmula estrutural do grupo heme (hemina).....	40
Figura 3. Representação esquemática do sistema FIA acoplado ao potenciostato. (a) amostragem, (b) inserção da amostra, (c) minicoluna contendo MIP ou NIP, (d) cela eletroquímica de três vias modo "wall-jet" e (e) potenciostato operado por microcomputador.	49
Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial dos eluatos provenientes da lavagem do MIP-MAA para remoção da epinefrina.....	51
Figura 5. Proposição do mecanismo redox envolvido no sistema.....	52
Figura 6. Verificação da atividade catalítica do NIP1 e MIP-MAA. Solução carreadora sem peróxido de hidrogênio.....	52
Figura 7. Comparação de atividade catalítica do MIP-MAA utilizando como carreador água sem (primeiro quadro) e com (segundo quadro) peróxido de hidrogênio (0,9 mL min ⁻¹ , 0,0 V, EP 500 µmol L ⁻¹ em água Milli-Q).....	53
Figura 8. Diagrama comparativo entre os sinais obtidos com epinefrina (EP) 500 µmol L ⁻¹ após eluição com peróxido de hidrogênio 50 µmol L ⁻¹ através de colunas contendo MIP-MAA, NIP com hemina (NIP1), sem coluna e NIP sem hemina (NIP2), respectivamente.....	54
Figura 9. Comparação de atividade catalítica entre os materiais produzidos. Amplitude de sinal obtida com cada coluna (n=3).....	54
Figura 10. Representação da possível interação entre as moléculas utilizadas na síntese do polímeros (A) e a cavidade formada no MIP (B).....	57
Figura 11. Estrutura molecular da epinefrina (EP).....	57
Figura 12. Comparação entre a eficiência catalítica do MIP-MAA versus NIP1 em diferentes datas (A e B) e com colunas contendo porções de material renovadas.....	58
Figura 13. Comparação entre MIP-MAA e NIP1 (dia 12/12/2008). Condições analíticas: H ₂ O ₂ 50 µM 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V...	59
Figura 14. Comparação entre MIP-MAA e NIP1 (dia 04/03/2009). Condições analíticas: H ₂ O ₂ 50 µM 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V...	59
Figura 15. Diagrama comparativo entre o MIP-MAA e o MIP-4VPy. (H ₂ O ₂ 50 µM 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	60

Figura 16. Espectro de infravermelho do MIP-MAA e NIP1.....	61
Figura 17. Termogramas do MIP-MAA, NIP1 e NIP2.....	63
Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura do MIP-MAA, NIP1 e NIP2.....	66
Figura 19. Processos de interferência no sinal analítico da epinefrina provocado pelo uso de potenciais extremos, sendo (a) o sinal obtido em amostra sem presença de interferentes e (b) na presença de interferentes, onde há somatória de sinais.....	68
Figura 20. Otimização do potencial (V) que será aplicado no eletrodo de trabalho nos testes amperométricos. (H ₂ O ₂ 50 µmol L ⁻¹ , 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra).....	69
Figura 21. Otimização da concentração de peróxido de hidrogênio no na solução carreadora. (vazão 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	70
Figura 22. Diagrama do processo de otimização da vazão do sistema FIA. (H ₂ O ₂ 50 µmol L ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	72
Figura 23. Influência do volume de amostra na resposta analítica. Condições analíticas: H ₂ O ₂ 50 µmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V.....	73
Figura 24. Influência do pH da amostra na resposta analítica. Condições analíticas: H ₂ O ₂ 500 µmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V.....	74
Figura 25. Comparação entre a utilização de solução carreadora tamponada e sem tamponamento (H ₂ O ₂ 50 µmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , EP 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	75
Figura 26. Influência do tipo de tampão sobre a resposta analítica (H ₂ O ₂ 500 µmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	76
Figura 27. Diagrama do estudo de concentração do tampão (H ₂ O ₂ 500 µmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	77
Figura 28. Comparação da atividade catalítica entre MIP e NIP após a otimização do método.....	78
Figura 29. Teste de interferentes realizado com diversas moléculas nas condições otimizadas do sistema.....	79
Figura 30. Estrutura molecular da dopamina.....	82
Figura 31. Estrutura molecular da epinefrina.....	82
Figura 32. Teste de seletividade do NIP para dopamina (H ₂ O ₂ 500 µmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , analito 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	83
Figura 33. Teste de seletividade do MIP para dopamina (H ₂ O ₂ 500 µmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , analito 500 µmol L ⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V).....	83

Figura 34. Teste de seletividade para dopamina (H ₂ O ₂ 500 μmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , analito 500 μmol L ⁻¹ em água, 120 μL amostra, potencial 0,0 V).....	85
Figura 35. Diagrama obtido com EP no intervalo de concentração entre 10 e 500 μmol L ⁻¹ (H ₂ O ₂ 500 μmol L ⁻¹ 0,9 mL min ⁻¹ , EP em água, 120 μL amostra, potencial 0,0 V)....	86
Figura 36. Regressão linear dos valores obtidos na curva analítica para EP (a=0,02223, b=4,55855 x 10 ⁻⁴ , r=0,99226).....	87
Figura 37. Diagrama obtido na aplicação do método na determinação da concentração de EP em solução injetável.....	88
Figura 38. Efeito da concentração de substrato sobre a densidade de corrente.....	90
Figura 39. Gráfico de Lineweaver burk para determinação de K _m e V _{max}	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes básicos utilizados na síntese dos MIP.....	29
Tabela 2. Descrição do processo básico de síntese de um MIP.....	30
Tabela 3. Monômeros comumente utilizados na síntese dos MIP.....	34
Tabela 4. Comparação entre as principais características de um MIP e enzimas naturais.....	37
Tabela 5. Parâmetros otimizados e os respectivos valores encontrados.....	77
Tabela 6. Substâncias utilizadas no teste de interferentes.....	80
Tabela 7. Determinação da concentração de EP em amostra farmacêutica.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

4-VPy	–	vinilpiridina
AIBN	–	2,2'-azo-bis-iso-butironitrila
CE	–	eletroforese capilar
CEC	–	eletrocromatografia capilar
CHCl₃	–	clorofórmio
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DP	–	dopamina
DPV	–	voltametria de pulso diferencial
EGDMA	–	etileno glicol dimetacrilato
EP	–	epinefrina
FIA	–	análise por injeção em fluxo
GCE	–	eletrodo de carbono vítreo
H₂O₂	–	peróxido de hidrogênio
HCl	–	ácido clorídrico
HPLC	–	cromatografia líquida de alta eficiência
HRP	–	horseradish peroxidase
HVA	–	ácido homovanílico
IIP	–	polímeros iônica e impressos
IR	–	infravermelho
MAA	–	ácido metacrílico
MEV	–	microscopia eletrônica de varredura
MIP	–	polímero molecularmente impresso
NaOH	–	hidróxido de sódio
NIP	–	polímero não-impresso
PTFE	–	politetrafluoroetileno
SPE	–	extração em fase sólida
TG	–	termogravimetria

SUMÁRIO

2.4.3 Monômero funcional.....	33
5.2.1 Comparação MIP-MAA e MIP-4VPy.....	59
5.3.1 Infravermelho.....	61
.....	61
5.3.2 Termogravimetria (TG).....	61
5.3.3 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	65
5.4.9 Resumo e aplicação dos parâmetros otimizados.....	77
5.5.1 Dopamina.....	81
REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

A análise quantitativa de compostos orgânicos, em especial aqueles encontrados em fluidos biológicos tem motivado um grande número de pesquisadores a desdobrar-se em inventos criativos que atendam as necessidades, cada vez mais restritivas, impostas pelo avanço da ciência moderna. Destaca-se aqui o elevado nível de aprofundamento dos estudos envolvendo sinalização celular, rotas de síntese biológicas, mecanismos fisiológicos, neurotransmissores, patologias, além de tantos outros processos envolvidos na manutenção da homeostasia de organismos vivos, que necessariamente baseiam-se na sua parcela mínima na síntese e degradação de compostos orgânicos (PEREIRA et al., 2006). Logo, fica evidente que o monitoramento da composição molecular em determinado material é a forma mais eficiente de se monitorar e desvendar indiretamente o processo como um todo, ou seja, juntando-se as peças do quebra-cabeça é possível visualizar o todo.

Entretanto, na prática, a detecção e quantificação de moléculas de forma seletiva em misturas extremamente compostas não é tarefa fácil, tendo ainda como fator complicador a concentração em que o analito se encontra e o nível de interferência de espécies concomitantes a este, que por vezes possuem estrutura molecular bastante semelhante tanto quimicamente quanto estericamente.

Diante deste panorama, as estratégias de pesquisas na área de ciências analíticas têm direcionado seus esforços basicamente em duas frentes, sendo uma delas focada na elaboração de instrumentos de detecção que possuam alta sensibilidade e seletividade, podendo assim realizar a quantificação com precisão e certeza da identidade molecular em soluções de baixíssimas concentrações e com grande quantidade de interferentes. A técnica de espectrometria de massas, por exemplo, representa um grande avanço neste sentido, mas por outro lado apresenta algumas restrições e/ou desvantagens, como alto custo, e também a necessidade de separação prévia dos componentes da amostra por cromatografia. O outro foco de pesquisas está justamente voltado para técnicas que envolvem o tratamento prévio da amostra. A mais comumente utilizada é a separação, aplicada em pré-concentração, clean-up e cromatografia. Porém, alternativas interessantes têm surgido, como a utilização de materiais ou reagentes que promovam uma reação química seletiva em determinados compostos da amostra de tal forma que os

produtos formados possam ser detectados por técnicas específicas. Existem na literatura métodos colorimétricos (VIEIRA; FATIBELLO-FILHO, 1998) e fluorimétricos (SILVA et al., 2009) que utilizam deste subterfúgio, entretanto, por vezes a reação química desejada ocorre com grupos de moléculas que possuem características e composição semelhantes e que formam produtos pouco distintos, o que torna o método pouco seletivo.

Atento à esta lacuna, este trabalho focou-se no desenvolvimento de um reagente sólido baseado na técnica de polímeros molecularmente impressos, que agregue as funções de reconhecimento molecular e atividade catalítica similar àquela produzida pela enzima natural peroxidase na reação de oxidação da epinefrina por peróxido de hidrogênio, cujo produto formado (epinefrinoquinona) pode ser facilmente detectado através de técnica amperométrica. O material sintetizado e o método desenvolvido e aplicado apresentam como principais vantagens a seletividade para epinefrina e o baixo custo da análise – visto que o solvente utilizado na análise é água e o custo de um potenciostato é bastante inferior ao de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), por exemplo, e também devido à simplicidade e baixo valor empregado na síntese do polímero. Pode-se considerar também como vantagem a possibilidade de emprego deste material em técnicas e instrumentações distintas e a possível utilização na construção de biossensores após adaptações do processo de síntese, como feito por Lakshmi et al. (2009).

A simulação da atividade catalítica de uma enzima natural é tema de estudo há algumas décadas (SCHACHAT; BECKER; MCLAREN, 1951, 1952) tendo sua razão de ser fundamentada nas características inerentes às enzimas, que conseguem de forma singular obter altas taxas de catalisação e níveis de seletividade e reconhecimento molecular bastante elevados, embora em certos casos seja deficiente, como será discutido em tópicos seguintes. Desta forma, a busca por materiais que mimetizem as enzimas tem no seu melhor cenário a obtenção de produtos que reproduzam suas boas características, como parâmetros cinéticos de qualidade (alto V_{max} , baixo K_m e perfil Michaelis-Menten), e que supere de forma significativa suas limitações impostas pela natureza, como baixa resistência a elevadas temperaturas, variações de pH, fotossensibilidade, baixa seletividade para moléculas específicas entre outros. Resumindo, o material ideal deve possuir excelente atividade catalítica, alta resistência físico-química e

capacidade de reconhecimento molecular que possa diferenciar compostos de mesma classe e com estruturas similares. Contudo, apesar de utópico, este objetivo deve ser perseguido no intuito de se obter resultados satisfatórios no maior número de parâmetros possíveis.

Como foi mencionado anteriormente, a função de reconhecimento molecular foi obtida por meio da técnica de impressão molecular, realizando-se a síntese de um polímero molecularmente impresso ou MIP (Molecularly Imprinted Polymer), que consiste na polimerização de monômeros funcionais que interagem previamente com o analito em estudo, formando assim uma estrutura sólida e rígida. Após esta etapa é possível remover somente o analito da rede polimérica, permanecendo apenas uma cavidade com tamanho, formato tridimensional e pontos de interação que coincidirão especificamente com a molécula molde quando colocadas em contato. Esta técnica, no entanto, é bastante consagrada na síntese de materiais que são aplicados em processos de separação e/ou pré-concentração. Porém, neste trabalho objetivou-se acrescentar a este tipo de material a funcionalidade de catálise de processo oxidativo acrescentando à sua estrutura a molécula de hemina que é o grupo prostético da enzima peroxidase.

As técnicas de análise por injeção em fluxo (FIA) têm encontrado um número crescente de aplicações no controle de qualidade e controle de processos industriais devido às inúmeras vantagens que apresentam em relação aos métodos clássicos de manipulação de soluções. Algumas destas vantagens são: curto tempo de análise, que permite uma alta frequência de amostragem e grande economia de reagentes, que leva a significativa redução dos custos de análise e do acúmulo de resíduos tóxicos. O sistema destaca-se pela possibilidade de se realizar reações químicas específicas com a posterior monitoração do produto em modo “on-line”, ou seja, acoplado diretamente no detector.

A epinefrina (EP) é uma molécula eletroativa que pode ser oxidada ou reduzida reversivelmente, dependendo das condições à qual é submetida. A sua oxidação por H_2O_2 é um processo bastante estudado e que é facilmente catalisado por enzimas da classe das peroxidases, como a horseradish peroxidase (HRP). A possibilidade de controle deste processo redox motivou o desenvolvimento deste trabalho, o qual teve como objetivo sintetizar uma enzima sintética por meio da técnica de impressão molecular.

Os testes foram então realizados utilizando-se sistema FIA, no qual foi adaptada uma minicoluna contendo o MIP catalítico para a oxidação de EP, e acoplado a um potenciostato capaz de medir a variação de corrente provocada pela redução dos compostos gerados na reação de oxidação ocorrida no reator contendo MIP. Assim, conforme a amplitude da variação de corrente observada foi possível determinar o potencial catalítico dos materiais sintetizados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O termo “química analítica” pode ser encontrado na literatura desde a segunda metade do século XIX, quando surgiram as primeiras discussões a respeito das subdivisões da química e também a importância da interação entre estas, como discorre Prescott (1893). Nota-se neste artigo que esta ainda é uma parte da química que se encontra nos primeiros níveis de desenvolvimento e que ainda busca a sua inserção e equiparação com outras áreas de estudo mais avançadas até aquele momento, como sendo de fundamental importância para o desenvolvimento da química, buscando assim o seu devido reconhecimento. Porém, apenas anos mais tarde, são encontrados trabalhos relacionados ao desenvolvimento de técnicas e métodos analíticos, como por exemplo, o trabalho de Ashley (1939), classificados como sendo da área de química analítica. No entanto, apesar de alguns destes métodos serem utilizados quase que de forma inalterada até os dias atuais, a produção científica nesta área foi bastante modesta até meados de 1940, quando provavelmente por ocasião da segunda guerra mundial e a consequente elevação das atividades industriais por ela gerada, impulsionou o crescimento substancial no número de artigos relacionados à química analítica, conforme levantamento realizado junto aos sistemas de banco dados científicos ISI Web of KnowledgeSM (Thomson Reuters) e Scopus[®] (Elsevier) utilizando o termo “analytical chemistry”.

Dentro deste contexto o presente trabalho correlaciona-se com o desenvolvimento de alguns tópicos específicos, sendo eles: métodos enzimáticos, técnicas instrumentais eletroquímicas, utilização dos MIP em química analítica e sistema FIA.

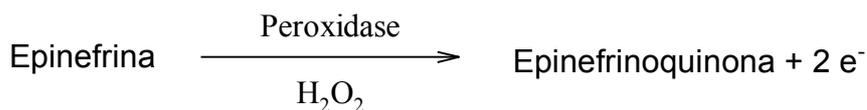
2.2 Métodos enzimáticos

A utilização de enzimas em metodologias analíticas é uma estratégia bastante aplicada há mais de 50 anos e a grande maioria destes métodos adotam como estratégia o monitoramento do produto formado após a reação enzimática (DEVLIN, 1959; SALOMON; JOHNSON, 1959). A função da enzima é a de catalisar

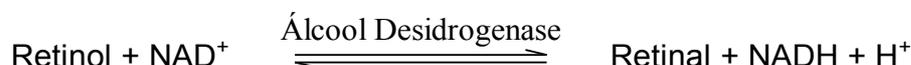
uma determinada reação, aumentando assim a velocidade e a taxa reacional, promovendo o aumento na concentração de produto. Porém, para o desenvolvimento de uma metodologia analítica que utilize reações enzimáticas é preponderante que o produto formado possua características marcantes que o diferencie de seus compostos homólogos e que estas características sejam passíveis de monitoração através de técnicas analíticas diversas.

Apesar da possibilidade de utilização de diferentes técnicas analíticas, na monitoração dos produtos de reação, é importante ressaltar que a maioria das reações enzimáticas aplicadas em química analítica é do tipo redox ou de ordem estrutural (reações de adição, decomposição, substituição ou eliminação). Dentre as características que podem ser alteradas em uma molécula através destas reações temos: formação de compostos com absorvidade molar previamente conhecida (alteração de cor), alteração da espécie em oxidada/reduzida, variação do potencial de oxidação/redução. Portanto, conforme o produto formado na reação enzimática, as características da amostra e a necessidade que se procura atender, será selecionada a técnica analítica para a determinação do composto desejado. Dentre as técnicas mais utilizadas neste tipo de análise temos a espectrofotometria (RISHI et al., 2009) e técnicas eletroquímicas diversas (SAGI; RISHPON; SHABAT, 2006).

A determinação pode ser feita de forma direta, por meio da detecção do produto derivado do substrato (reação 1) (ADAK et al., 1998), ou indireta, nos casos em que o produto determinado é derivado de um reagente que está presente no meio e que por sua vez reage com o substrato (analito alvo) formando um produto detectável. Rishi et al. (2009) realizaram a determinação de retinol (vitamina A) em formulações farmacêuticas de forma indireta (reação 2) promovendo a formação de NADH proporcionalmente ao consumo de retinol, o qual é posteriormente determinado por espectrofotometria em 340 nm.



Reação 1. Método enzimático direto.



Reação 2. Determinação indireta de retinol através da formação de NADH.

Os métodos enzimáticos são possíveis devido à seletividade das enzimas, ou seja, a capacidade de reconhecimento molecular que estas possuem o que possibilita a diferenciação de moléculas específicas dentro de um determinado grupo homólogo. Para que esta diferenciação ocorra é necessário que as moléculas do grupo sejam totalmente inativas frente à enzima utilizada ou mesmo que reajam em taxas bem menores (alto K_m), diferentemente da molécula alvo.

Um exemplo clássico das propriedades de um método enzimático pode ser encontrado no estudo realizado por Kaplan (1957), no qual ele promove a interação (separadamente) entre a enzima glicose oxidase e 36 diferentes moléculas de açúcares, inclusive glicoses substituídas. Como resultado ele obteve que destas apenas 13 reagiram, sendo que em todos os casos em taxas menores que 2 % quando comparados com a reação envolvendo a glicose como substrato. Entretanto, este grau de especificidade não é regra e por vezes uma única enzima é capaz de catalisar a reação de diversas moléculas distintas em taxas similares, ou seja, possuem especificidade reduzida (NAVES, 2008)

A principal vantagem na utilização de métodos enzimáticos está relacionada com a redução ou até mesmo eliminação da interferência de espécies concomitantes no resultado analítico. Em muitos casos a análise pode ser efetuada sem a necessidade de uma purificação prévia, caso a composição da amostra assim permita e a enzima possua especificidade suficiente para reconhecer a molécula alvo da análise.

A propriedade de reconhecimento molecular apresentada pelas enzimas deve-se à sua composição e disposição estrutural na qual se encontra. A composição básica das enzimas é formada por cadeias longas de aminoácidos que são interligados por ligações peptídicas e apresentam macroestrutura tridimensional (LEITE; FATIBELLO-FILHO; ROCHA, 2004) com a presença de uma cavidade que possibilita o encaixe da molécula à ser catalisada, e também onde situa-se o grupamento que realmente possui a atividade catalítica, denominado de grupo prostético (geralmente moléculas organometálicas). Nestes dois pontos encontramos a justificativa tanto para a principal vantagem quanto para a principal desvantagem. Pelo lado positivo temos a estruturação tridimensional, que é a responsável pelo reconhecimento molecular de moléculas alvo, pois atua em esquema chave-fechadura, permitindo que somente moléculas que se encaixem naquela cavidade tenham contato com o sítio prostético da enzima, podendo assim

sofrer a catálise. Já no aspecto negativo, a composição protéica atua como um fator limitante na aplicabilidade das enzimas, pois as torna frágeis em condições adversas como temperatura elevada, pH extremo, força iônica do meio, exposição à luz entre outros.

2.3 Técnicas eletroquímicas empregadas

O número de possibilidades de aplicação de métodos eletroquímicos é bastante ampliado e variado na química analítica, pois existem diversos tipos de técnicas e métodos eletroquímicos com características bastante distintas. O número de variáveis controláveis nestes métodos também contribui para a adaptação das técnicas aos mais diferentes tipos de aplicações analíticas, como por exemplo monitoramento de poluentes ambientais, controle de qualidade em indústrias, análises biomédicas diversas entre outros (WANG, 2000). Somado a ampla gama de aplicabilidade das técnicas eletroquímicas há de se considerar outros fatores muito importantes e que seduzem muitos pesquisadores a utilizá-las, pois se traduzem em vantagens quando comparadas a outras técnicas.

Analisando-se pelo aspecto financeiro as técnicas eletroanalíticas apresentam-se como uma opção vantajosa, pois é de custo bastante inferior a outras técnicas, como por exemplo, a cromatografia ou eletroforese capilar. Os fatores que influenciam neste aspecto estão relacionados principalmente ao valor acessível para a aquisição dos equipamentos, pouca necessidade de manutenção e reposição de consumíveis, e o baixo consumo de reagentes.

Focando-se o aspecto de inovação tecnológica observa-se na literatura uma grande utilização deste tipo de técnica analítica no desenvolvimento de sensores capazes de detectar seletivamente os mais diversos compostos químicos e em vários tipos de matrizes (WANG; LU; YANG, 2004; DAMOS et al., 2003; LAKSHMI et al., 2009) . A ciência de materiais é outra área de estudo que evolui juntamente com o desenvolvimento de novos sensores.

A simplicidade de operação da instrumentação é um fator que também merece destaque, pois não reflete exatamente a elevada quantidade de informações e conceitos teóricos necessários ao analista para que este tenha autonomia

científica para definir os métodos e parâmetros a serem utilizados, bem como a capacidade de resolver problemas encontrados no decorrer das análises.

A grande maioria das técnicas eletroanalíticas interfaciais pode ser classificada em duas categorias: (1) potenciométricas, na qual não há corrente e ocorre a determinação do potencial (V) estabelecido entre a solução amostra e o eletrodo, e (2) voltamétricas, nas quais controla-se o potencial aplicado sobre o eletrodo e monitora-se a variação de corrente. A técnica utilizada neste trabalho foi a amperometria, sendo realizadas através de um equipamento denominado potenciostato.

As técnicas voltamétricas são classificadas como dinâmicas, pois há variação de corrente elétrica conforme ocorre o processo de transferência de carga entre o eletrodo e a interface com a solução, sendo a intensidade desta transferência governada pelo potencial aplicado no eletrodo de trabalho, ou seja, conforme a energia aplicada na interface o analito será forçado a ganhar (redução) ou perder (oxidação) elétrons (WANG, 2000). Logo, o volume da troca de elétrons existente será transduzido em variação de corrente, sendo: negativa (catódica) em caso de redução ou positiva (anódica), nos casos de oxidação do analito (INCZEDY; LENGYEL; URE, 1998).

Dentro da técnica de amperometria existem algumas variações no formato como ela pode ser aplicada. No formato de “bulk” o eletrodo é imerso na solução a ser analisada permanecendo estático durante toda a leitura. Pode também ser realizada a convecção forçada em sistemas de fluxo, que é um método hidrodinâmico no qual a solução amostra é direcionada ao contato com o eletrodo sendo rapidamente carregada pelo fluxo constante no qual está inserida (BARD; FAULKNER, 2001). Esta metodologia foi utilizada em todos os testes analíticos realizados com o material em estudo, e será mais bem detalhada adiante.

2.4 Polímero molecularmente impresso (Molecularly Imprinted Polymer -MIP)

Este tipo de material foi descrito inicialmente por Wulff e Sarhan em 1972 e desde então vem despertando cada vez mais o interesse dos pesquisadores em desenvolver e aplicar esta técnica em campos distintos da ciência. Porém, somente

a partir da década de 1990 observa-se o crescimento exponencial no número de artigos relacionados ao tema, o que segundo Allender (2005) deve-se à utilização das substâncias ácido metacrílico (MAA) e etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), respectivamente como monômero funcional e reagente de ligação cruzada, na síntese de novos MIP não-covalentes. Desde então, grande avanço pode ser observado na aplicação dos MIP em química analítica com finalidades e funcionalidades diversas (WHITCOMBE; VULFSON, 2001). Outra área que utiliza a tecnologia dos MIP é a de liberação controlada de fármacos, que se aproveita das propriedades responsivas a estímulos externos que certos MIP em forma de gel possuem, controlando assim a liberação ou retenção do fármaco (CUNLIFFE; KIRBY; ALEXANDER, 2005).

No campo das análises químicas a utilização principal de MIP é direcionada às técnicas extrativas e de separação, sendo aplicadas em amostras ambientais, biomédicas, bioquímicas e farmacêuticas. Qiao et al. (2006) realizou um levantamento sobre MIP até então utilizados em extração em fase sólida (SPE) citando os respectivos analitos e matriz da amostra. Pichon e Chapuis-Hugon (2008) elaboraram uma revisão sobre a utilização de polímeros impressos na determinação de poluentes ambientais e também discutiram sobre pontos cruciais que devem ser considerados na síntese do material. Aplicações cromatográficas dos MIP em várias separações enantioméricas, eletrocromatografia capilar (CEC) e eletroforese capilar (CE) são relatadas por Baggiani; Anfossi; Giovannoli (2006). Uma importante revisão sobre MIP e suas aplicações foi elaborada por alguns dos maiores pesquisadores sobre o tema em 2006 (ALEXANDER et al., 2006)

2.4.1 Fundamentação histórica: elaboração da hipótese

A produção dos MIP fundamentou-se nas propriedades dos anticorpos, que são macromoléculas de caráter protéico com capacidade de reconhecer alvos (moléculas) específicos, que neste caso são denominados antígenos. A atividade de reconhecimento exercida pelos anticorpos despertou o interesse de muitos cientistas

já na primeira metade do século XX, quando Linus Pauling em 1940 publica um artigo no qual ele propõe uma teoria sobre a estrutura e formação dos anticorpos.

Neste trabalho, Pauling atribui o poder de reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos ao fato de que essas moléculas apresentam o que ele chama de complementaridade. Esta propriedade é originada no momento da formação do anticorpo, o qual é produzido justamente por meio do contato entre uma cadeia polipeptídica composta por vários aminoácidos e uma molécula alvo, então denominada antígeno. Através deste contato a molécula do antígeno estabelece pontos de interação (ligações) com os aminoácidos da cadeia protéica, a qual sofrerá na sequência o rearranjo de sua estrutura terciária ao redor do antígeno, ou seja, o anticorpo é tridimensionalmente moldado sobre o antígeno. Merece destaque também a sugestão proposta à época de que é possível formar anticorpos distintos utilizando-se de cadeias polipeptídicas idênticas e variando-se o antígeno. Este conceito, como será visto adiante, é uma realidade comprovada para os MIP.

Conceito semelhante se aplica em outra área biológica, mais especificamente no mecanismo de ação dos fármacos em organismos animais por meio da interação com receptores de membrana. Este mecanismo tem grande importância dentro da farmacologia, pois a grande maioria dos fármacos atua desta forma, e são por isso chamados de fármacos específicos. Apesar da existência de particularidades e classificações dentre os fármacos que atuam por meio de receptores, é possível dizer que o fundamento básico é o mesmo para todas. Neste modelo, após a biodisponibilização do fármaco na corrente sanguínea, a parcela não ligada às proteínas plasmáticas irá aproximar-se da célula onde se deseja produzir um efeito e rapidamente ligar-se-á à determinada proteína presente na membrana plasmática. Este é o acionamento do gatilho para o início de uma cascata de reações intracelulares que tem por objetivo final promover uma alteração no funcionamento da célula que se traduza em alterações fisiológicas do organismo (RANG; DALE, 1993).

Entretanto, para que tudo isso ocorra é de fundamental importância que haja o reconhecimento molecular do fármaco pelos receptores específicos de membrana através de mecanismo similar àquele apresentado pelos anticorpos (Figura 1).

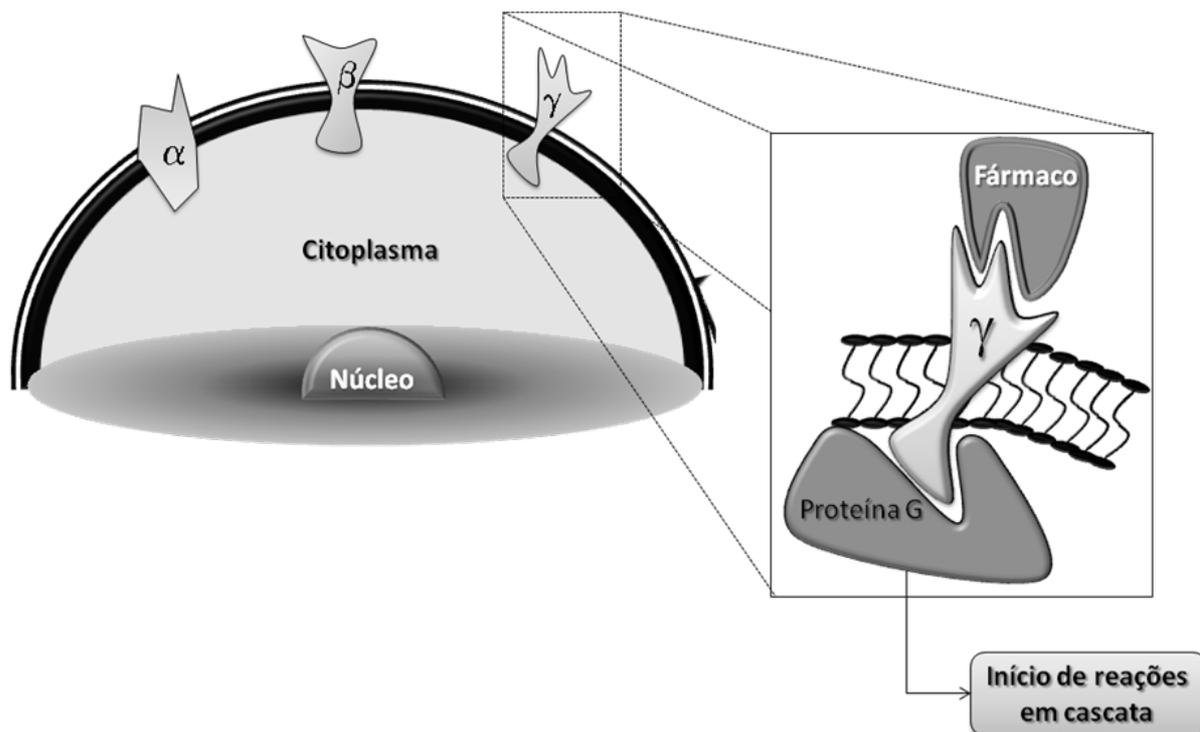


Figura 1. Representação esquemática da estrutura celular evidenciando os receptores de membrana e a interação deste com um fármaco específico.

Baseando-se neste princípio Wulf e Sarhan (1972) produziram um MIP orgânico com atividade enantiosseletiva para o ácido glicérico, e desde então novos materiais vem sendo desenvolvidos e/ou melhorados. Dentre os principais tópicos relacionados a polímeros impressos que vêm sendo estudados nas últimas décadas temos: (a) racionalização do processo de síntese por meio da utilização de novos reagentes, modelagem molecular, aplicação de novas técnicas de polimerização (suspensão, precipitação, eletropolimerização, grafting, monolitos, sol-gel entre outras) (b) adaptação para analitos e matrizes diversas bem como a utilização em técnicas analíticas distintas; (c) desenvolvimento dos polímeros iônica-mente impressos (IIP); e (d) funcionalização do MIP (biomimetismo), o qual é tema deste trabalho (BAGGIANI; ANFOSSI; GIOVANNOLI, 2006; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005b; ANSELL; KRIZ; MOSBACH, 1996).

2.4.2 Composição e rota de síntese

Tanto a composição quanto o processo básico de síntese de um MIP podem ser considerados de relativa simplicidade, pois não demanda reagentes extremamente caros, não exige pessoal altamente especializado e geralmente o produto obtido apresenta boa reprodutibilidade. Entretanto, apesar das facilidades apresentadas, o trabalho de pesquisa para o desenvolvimento de novos materiais é

árduo e minucioso, tendo-se em vista que o grau de exigência para inovações é sempre maior em relação aos resultados que foram obtidos anteriormente.

Na composição básica de um MIP têm-se quatro tipos de compostos que possuem características e funções específicas (MARTÍN-ESTEBAN, 2001), conforme listado na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes básicos utilizados na síntese dos MIP.

Composto	Função
Analito ou “template”	É a molécula que servirá de molde para o MIP. Deve-se ter conhecimento das propriedades químicas e físicas do material, como ponto de fusão e ebulição, solubilidade, pKa, estabilidade e função orgânica. É necessária atenção especial sobre a estereoquímica e os radicais com potencial para interação com o monômero funcional. Teoricamente qualquer molécula pode ser utilizada com esta finalidade.
Monômero funcional	É a unidade básica na formação da rede polimérica. Este composto é o responsável pela interação química com o “template”.
Reagente de ligação cruzada	Atua interligando as moléculas de monômero funcional entre si.
Iniciador radicalar	É responsável por atacar quimicamente as moléculas de monômero funcional de tal modo a formar um radical livre e conseqüentemente permitir a polimerização.
Solvente porogênico	Utilizado como o meio líquido da reação. Exerce função determinante sobre as características morfológicas do material e a sua compatibilidade com a matriz da amostra.

Dentro de cada tipo de composto existem várias opções distintas, que devem ser selecionadas seguindo alguns critérios, os quais irão direcionar previamente o tipo de material que será obtido. Deve-se considerar principalmente a polaridade e acidez do analito (“template”), capacidade de interação covalente ou não do monômero funcional com o analito, rigidez do polímero (sólido ou gel), tipo de síntese (termoativada, fotoativada ou eletroativada, “bulk” ou “grafting”,

suspensão ou precipitação etc), tipo de amostra que será testada (considerar as possíveis matrizes) e finalmente a técnica analítica aplicada nos testes.

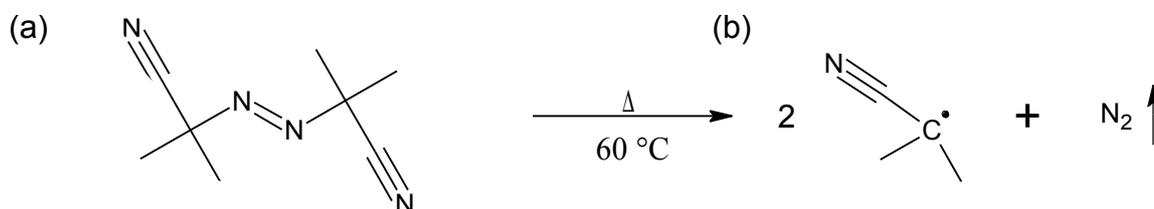
Em relação à rota de síntese dos MIP existem diversos protocolos, e que geralmente são adaptados pelos pesquisadores conforme a sua necessidade considerando as particularidades inerentes ao material. Entretanto, a rota do processo básico da impressão molecular é o mesmo para todos, e pode ser resumido em etapas:

Tabela 2. Descrição do processo básico de síntese de um MIP.

Etapa	Descrição	Objetivos
1	Solvatação do analito no solvente porogênico	Dissolver os cristais do analito e liberar as moléculas para o meio reagente. A escolha do solvente adequado é fundamental, devendo assegurar que: (a) o analito será dissolvido sem que haja degradação; (b) a afinidade entre o analito e o solvente seja baixa, não influenciando na formação do complexo analito-monômero; (c) tornar viável a utilização do MIP em amostras diluídas em outro tipo de solvente; e (d) proporcionar elevada porosidade do material.
2	Interação entre monômero funcional e o analito	Promover interações estáveis analito-monômero, que podem ser dos tipos covalente, não-covalente, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, hidrofóbica ou iônica (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a). O tipo de interação que será estabelecida deve ser estimado, pois é de grande influência sobre o produto final.
3	Inicialização radicalar	Para que a polimerização seja iniciada é necessário provocar no monômero a formação de radicais que irão posteriormente interagir com o “template”. O reagente 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) (Reação 3) é o mais utilizado neste tipo de material (TARLEY; SOTOMAYOR;

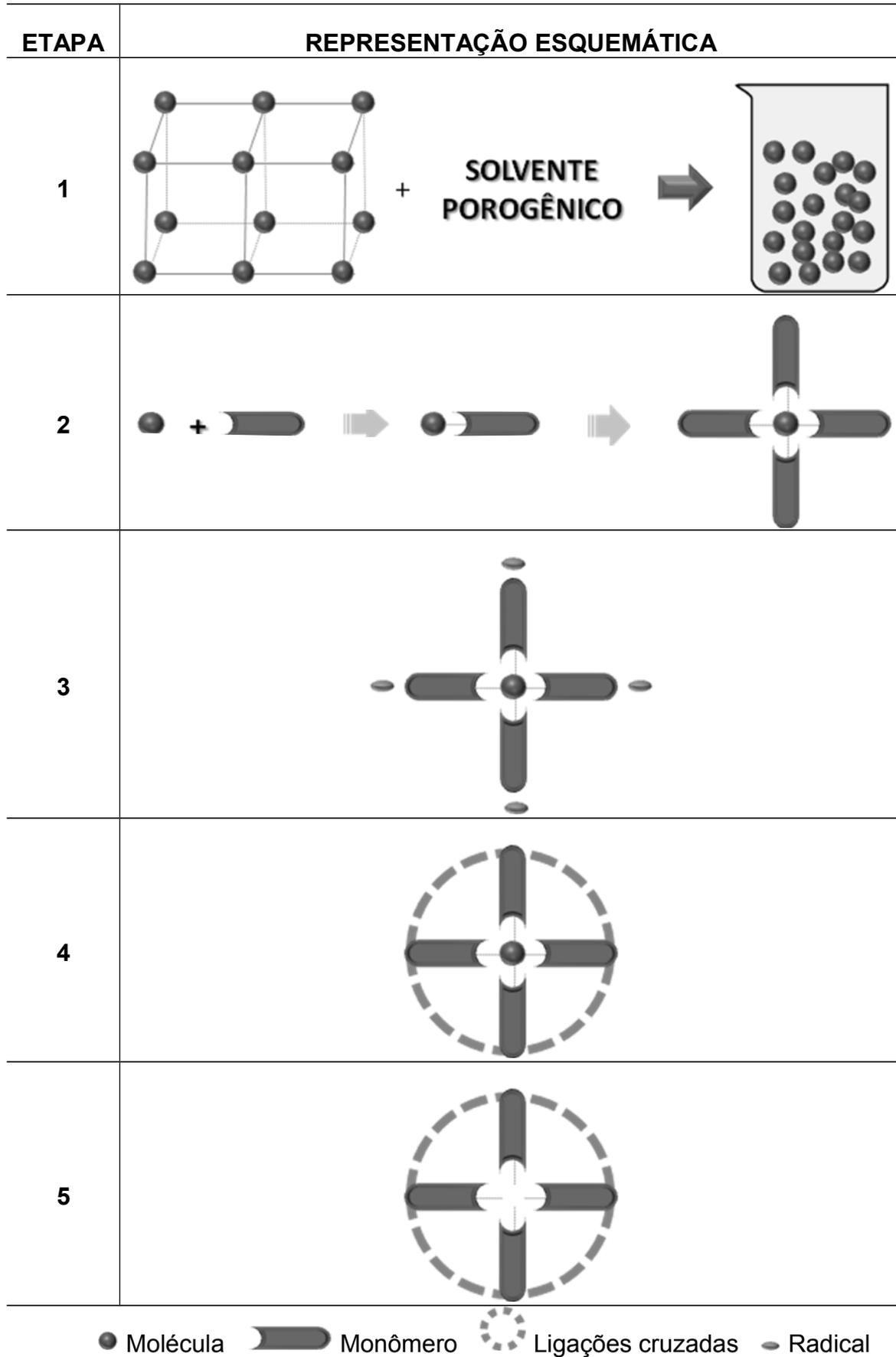
		KUBOTA, 2005a).
4	Polimerização	Nesta etapa ocorre a interligação das moléculas de monômero com o auxílio do reagente de ligação cruzada, formando assim a rede polimérica rígida moldada sobre o “template”. O etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) é o reagente de ligação mais utilizado, pois é capaz de gerar polímeros de boa resistência térmica e mecânica e também proporciona bons parâmetros cinéticos de transferência de massa (MARTÍN-ESTEBAN, 2001). Após isso, a síntese está finalizada e não é possível realizar alterações.
5	Remoção do “template”	Apesar de não fazer parte da síntese, este procedimento é necessário para a desocupação das cavidades formadas. Este procedimento é diretamente influenciado pela etapa 2, pois quanto maior a força de ligação entre analito-monômero, maior a dificuldade de remoção.

Como foi mencionado, os procedimentos descritos na Tabela 2 são referentes ao procedimento básico para a síntese da maioria dos MIP e deve ser adaptado conforme a necessidade. Uma representação esquemática do procedimento de síntese do MIP é apresentada no Quadro 1.



Reação 3. Geração de fragmentos radiculares livres provenientes do iniciador radicalar (a) AIBN (2,2'-azo-bis-iso-butironitrila) (b) radical livre (SALAMONE, 1996).

Quadro 1. Procedimento básico de síntese de um MIP.



● Molécula  Monômero  Ligações cruzadas ● Radical

2.4.3 Monômero funcional

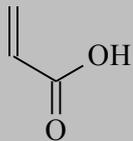
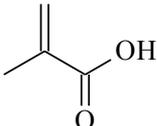
A etimologia da palavra polímero é derivada dos termos “poli” e “mero”, que significam respectivamente “muitos” e “parte”. O próprio nome representa com clareza a estrutura de um polímero, que na prática trata-se de uma macromolécula de alto peso molecular que é formada pela conexão de várias moléculas idênticas, chamadas monômeros. No entanto, variações podem ser feitas na síntese de um polímero de acordo com o monômero utilizado ou mesmo por meio da utilização de mais de um tipo no mesmo polímero, neste caso formando um copolímero (IUPAC, 1996).

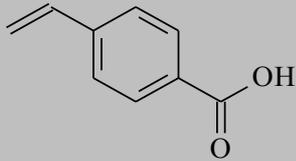
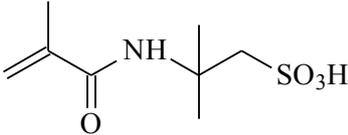
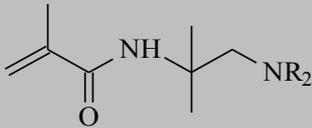
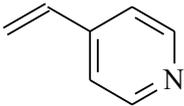
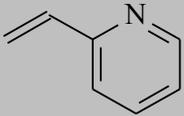
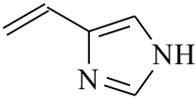
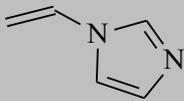
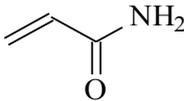
A função exercida pelo(s) monômero(s) funcional(is) é a peça chave no desenvolvimento de um MIP, sendo responsável pela estruturação da cavidade que será formada, haja visto que ele é a menor unidade representativa na composição de um polímero. As características das interações intermoleculares que ocorrem entre este componente e o “template” são os fatores determinantes na efetividade da impressão e também quanto ao tipo de aplicação que o MIP poderá ser submetido (SVENSON et al., 1998).

A seleção do(s) monômero(s) é feita de tal modo a atender alguns critérios básicos, como: (a) caráter ácido/base do template, (b) tipo de interação desejada entre “template”-monômero (covalente, não-covalente, ligações de hidrogênio) e (c) solubilidade no solvente porogênico. Outros fatores podem ser determinantes nesse processo de seleção, porém são específicos para cada síntese.

Uma revisão feita por Tarley; Sotomayor; Kubota (2005a) mostra os principais monômeros utilizados na síntese dos MIP (Tabela 3).

Tabela 3. Monômeros comumente utilizados na síntese dos MIP.

Monômero funcional	Nome do monômero	Tipo de interação com o analito
	Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido meta-acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio

	Ácido p-vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido acrilamidossulfônico	Interação iônica
	Amino metacrilaminada	Interação iônica
	4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	4-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	1-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio

Apesar da existência de várias possibilidades de interações químicas entre “template” e monômero, a principal classificação é se esta ocorre por meio de ligações covalentes ou não-covalentes. O emprego de interações covalentes para a síntese dos MIP, que não é o objetivo deste trabalho, foi muito utilizado até a década

de 1980. Neste tipo de material as características marcantes são a dificuldade de remoção do “template” após a síntese, as características cinéticas inferiores, que se traduzem na dificuldade de religação do analito na cavidade impressa, e também a restrição da sua aplicação apenas a moléculas de alguns grupos funcionais (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a; WHITCOMBE; VULFSON, 2001). Já a partir da década de 1980, após a descrição por Arshady e Mosbach (1981) do primeiro MIP sintetizado de forma não-covalente, a grande maioria dos trabalhos sobre MIP vem utilizando esta estratégia com muito sucesso (SELLERGREN; GERMANY, 1997), visto que praticamente qualquer molécula orgânica pequena pode ser utilizada como “template”. A impressão por meio de ligações não-covalentes oferece algumas vantagens em relação à remoção do “template” pós-síntese, que é facilitada, e também ao ganho nos parâmetros cinéticos, diferentemente do MIP covalentemente ligado. Este ganho deve-se ao fato de que durante a formação do complexo “template”-monômero podem ocorrer interações de vários tipos e em vários pontos distintos da molécula molde, o que aumenta as possibilidades de religação do analito na cavidade formada (WHITCOMBE; VULFSON, 2001).

Apesar das reconhecidas vantagens e da versatilidade apresentada pela impressão molecular não-covalente, esta estratégia apresenta a desvantagem de formar sítios de reconhecimento heterogêneos, ou seja, não existe uma uniformidade das cavidades formadas ao longo da polimerização. Desta forma, é possível encontrar no mesmo material cavidades de maior e menor capacidade de reconhecimento, bem como a formação de sítios não específicos. A origem deste problema está relacionada tanto ao tipo de monômero, o qual deve possuir grande afinidade pelo “template”, quanto à concentração utilizada na síntese, que deve ser sempre superior à do “template” (sugere-se a proporção de 4:1, v/v) de tal modo a deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação do complexo analito-monômero. Este excesso de monômero é o fator que propicia a formação de sítios inespecíficos, que podem reduzir o potencial de seletividade do material (MARTÍN-ESTEBAN, 2001; WHITCOMBE; MARTIN; VULFSON, 1998). No sentido de contornar estes problemas, novos tipos de monômeros, os quais possuem maior afinidade para com a molécula molde vem sendo desenvolvidos. Whitcombe e Vulfson (2001) classificam estes monômeros como sendo de “segunda geração”.

2.4.4 MIP com atividade catalítica

Desde o desenvolvimento da técnica de impressão molecular é notável o interesse na utilização desta estratégia para o desenvolvimento de materiais biomiméticos, os quais simulam o comportamento e as funções de biomoléculas, como enzimas, anticorpos, canais iônicos e receptores. Grande parte da motivação em atingir este objetivo pode ser creditada às dificuldades encontradas na utilização de moléculas naturais, que são de difícil manipulação e obtenção, possuem preço elevado e apresentam baixa estabilidade físico-química. Considerando-se estes aspectos o MIP apresenta-se como uma ótima alternativa, pois apresenta baixo custo, boa seletividade e resistência elevada em condições adversas (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005b; TAKEUCHI; MATSUI, 1996). Soma-se a estes fatores a possibilidade de ser sintetizado “sob medida” para praticamente qualquer molécula orgânica, o que amplia o espectro de aplicação até mesmo onde não existem biomoléculas correspondentes (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005b). Na Tabela 4 extraída de Tarley; Sotomayor; Kubota (2005b) estão comparadas as principais características de biomoléculas naturais em relação àquelas encontradas nos MIP.

Tabela 4. Comparação entre as principais características de um MIP e enzimas naturais.

BIOMOLÉCULAS	MIP
Apresentam estabilidade variável, dependendo da estrutura e da fonte. São química, física e termicamente frágeis.	Apresentam altas estabilidades químicas, físicas e térmicas, por longos períodos de tempo.
Algumas enzimas e receptores, apesar de serem de fácil obtenção, apresentam custo elevado.	Geralmente são baratos e fáceis de preparar sempre que a quantidade da molécula molde for suficiente.
São restritas ao uso em meio aquoso. Muitas apresentam pobre desempenho em meio não aquoso.	Apresentam melhor desempenho em meio orgânico, porém também podem ser usados em meio aquoso.
A integração de várias biomoléculas com a finalidade de construir um dispositivo multicanal (contendo vários biossensores) pode ser dificultada, devido à variação nas características operacionais de cada biossensor (pH, força iônica, temperatura, substrato).	Como sofrem pouca influência da variação dos parâmetros operacionais (pH, força iônica, temperatura), em relação aos biossensores, são adequados para construção de dispositivos multicanais.

Precisam de condições especiais para armazenagem.	Podem ser estocados a seco e em temperatura ambiente.
Apresentam constantes de afinidade (constante de Michaelis-Menten) e cinética (velocidades “turnover”) com valores elevados.	Ainda nas melhores situações, as constantes de afinidade e cinética são menores que as obtidas com biomoléculas.
Considerações éticas podem estar envolvidas, principalmente no caso do uso de fontes animais.	São sintéticos e não precisam de nenhuma fonte natural.
Nos casos onde é conhecida a interação entre o reconhecedor biológico e o analito, podem ser usadas na construção de biossensores.	Podem ser sintetizados para analitos para os quais ainda não se conhece o elemento de reconhecimento biológico.
A preparação, separação, purificação e/ou liofilização consomem tempo, porém, uma vez que a biomolécula é isolada, pode ser realizada uma produção reprodutível em grande escala.	A preparação é relativamente rápida e com boa reprodutibilidade.
Não são reutilizáveis.	São reutilizáveis.

Para o melhor entendimento sobre a função de uma biomolécula é importante saber que em geral apresentam constituição protéica e participam de processos biológicos complexos, atuando como gatilhos (catalisadores) extremamente específicos em pequenas reações químicas simples que ocorrem nas etapas que compõe o processo (TAKEUCHI; MATSUI, 1996). Sendo assim, o grande desafio é obter sucesso no desenvolvimento de um material sintético que seja capaz de reproduzir a atividade biológica de uma biomolécula, que apresente grande potencial de reconhecimento molecular e seja adaptável a diversas técnicas analíticas. Além de atender essas características um bom material biomimético deve ainda ser resistente e de baixo custo. Logo, pode-se dizer que o MIP é um tipo de material que se enquadra dentro destas características.

As aplicações possíveis para este tipo de material são diversas, como sensores biomiméticos, ensaios imunológicos, mimetização de receptores (MOSBACH; HAUPT, 1998; YE; MOSBACH, 2008; KEMPE, 1996; ANSELL; KRIZ;

MOSBACH, 1996) e a simulação de enzimas naturais (SANTOS et al., 2009b), que é o caso do trabalho em questão. Brüggemann (2001) descreve alguns tipos de aplicações catalíticas dos MIP, e o que se observa é a gama de reações distintas que é possível mimetizar, como hidrólise, reação de Diels-Alder e reação de isomerização. Entretanto, estas são apenas algumas das alternativas já conhecidas, e Wulff (2002) cita mais algumas e dentre elas a catálise da reação de oxidação.

A capacidade de oxidação é uma característica marcante das enzimas classificadas como oxidases. A peroxidase é uma dessas enzimas que se caracteriza principalmente pela presença do grupo prostético ferriprotoporfirina IX, que é capaz de catalisar a reação de oxidação de vários substratos na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MIKA; LÜTHJE, 2003; HAMID; REHMAN, 2009). A utilização desta classe de enzimas como catalisador em testes quantitativos é bastante freqüente, especialmente a enzima “horseradish peroxidase” (HRP), que é utilizada em sua forma livre (PASSOS et al., 2008) ou imobilizada (CASTILHO; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005; CHE et al., 2009; JEYKUMARI; NARAYANAN, 2009; KIM; JANG; KANG, 2009) sobre a superfície de suportes sólidos. Entretanto, vários são os problemas encontrados na utilização desta enzima natural, como a falta de estabilidade em longo prazo, a atividade catalítica relativamente baixa e a dificuldade na reutilização (CHEN; ZHAO; ZOU, 2009).

O grupo prostético de uma enzima é o responsável pela catálise da reação que ocorre após o contato do substrato com algum ponto específico desta molécula, que espacialmente fica situada no interior da cavidade de uma enzima. Sendo assim, podemos dividir a enzima em duas porções com funções específicas, ou seja, uma porção protéica tridimensional que limita o acesso ao interior da cavidade da enzima apenas às moléculas que possuem aquele formato (sistema chave-fechadura de formação do complexo enzima-substrato) (FISCHER, 1890), e o grupo prostético propriamente dito, que na maioria das vezes é formado por moléculas organometálicas grandes que possuem a capacidade de serem oxidadas ou reduzidas reversivelmente. No caso das peroxidases, como foi dito anteriormente, o grupo prostético é formado pela ferriprotoporfirina IX, também denominada hemina (Figura 2), e que contém no centro de sua molécula um átomo de Fe que transita reversivelmente entre os estados de oxidação Fe^{3+} e Fe^{4+} após a troca de elétrons com a molécula de substrato (NAVES, 2008).

Baseando-se no funcionamento de uma enzima, constata-se que é possível desenvolver um MIP que agregue suas potencialidades de forma racional desde que se atenda as duas necessidades básicas: (1) capacidade de reconhecimento molecular tridimensional, e (2) presença de grupo prostético acessível posicionado no interior da cavidade moldada (DAVIS; KATZ; AHMAD, 1996).

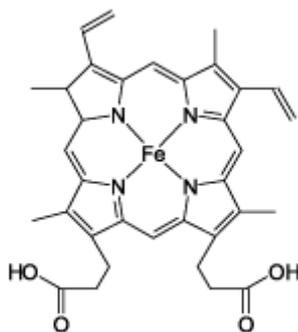


Figura 2. Fórmula estrutural do grupo heme (hemina).

Embora o raciocínio de inclusão de um grupo prostético no interior de uma cavidade molecularmente impressa pareça simples, verifica-se que sua aplicação e viabilidade são recentes, havendo ainda várias possibilidades de inovação e aperfeiçoamento daquilo que já foi desenvolvido, bem como o melhor entendimento sobre fatores diversos que envolvem esta ciência, como por exemplo a influência exercida por íons de sais no momento da religação entre analito e MIP, a estrutura molecular do polímero formado e o posicionamento de cada componente, entre outros.

A síntese de um MIP capaz de catalisar reações de oxidação foi descrita por Efendiev e Kabanov em 1982, quando desenvolveram um polímero contendo Co(II), capaz de intermediar a transformação de etilbenzeno em acetofenona. Nesta ocasião eles utilizaram como controle o polímero sem impressão molecular (NIP), o qual é sintetizado paralelamente ao MIP, sob as mesmas condições, porém sem a adição do “template” no momento da síntese. A comprovação do sucesso do procedimento foi demonstrada pela capacidade aumentada em duas a três vezes do MIP em catalisar a reação quando comparado ao NIP. Desde então, esta estratégia vem sendo adotada por alguns autores com sucesso.

Chen e colaboradores (2007) sintetizaram um nanogel molecularmente impresso capaz de mimetizar a atividade catalítica da enzima peroxidase para a

oxidação do ácido homovanílico (HVA) em meio aquoso na presença de peróxido de hidrogênio. A motivação para este trabalho surgiu de trabalhos anteriores desenvolvidos pelo mesmo grupo (CHENG; ZHANG; LI, 2004; CHENG; LI, 2006) nos quais são descritos polímeros impressos que apresentam atividade catalítica para a mesma reação, porém em escala reduzida devido à baixa compatibilidade do material com o meio de reação aquoso. Desta forma, o modo encontrado foi a síntese do mesmo MIP, porém com algumas modificações para que o produto final possuísse características de um gel hidrossolúvel. Esta abordagem é demonstrada também por Wulff e colaboradores (2006) e destaca a possibilidade de síntese de materiais impressos solúveis a tal ponto de liberar no meio reacional partículas que possuam apenas um sítio ativo, assemelhando-se às enzimas naturais.

Santos et al. (2007) descreveu a síntese e a aplicação analítica de um MIP catalítico para a oxidação de p-aminofenol. Foi utilizado neste trabalho um sistema por injeção em fluxo (FIA) acoplado a um potenciostato, através do qual realizou-se a determinação da capacidade catalítica do MIP em questão pela técnica de amperometria. Para tanto, o material foi acondicionado em uma minicoluna e submetido ao sistema de fluxo contínuo de solução carreadora contendo peróxido de hidrogênio. Neste trabalho, os autores observaram a capacidade superior de catálise do MIP em relação ao NIP, e obtiveram sucesso na aplicação em amostras de água de rio contendo substâncias húmicas com índices de recuperação entre 96 e 111 %, bem como seletividade elevada frente à moléculas similares ao p-aminofenol. O reuso do material também impressionou, pois mesmo após mais de 100 determinações do analito no mesmo sistema nenhuma alteração de resposta foi observada, ou seja, a atividade catalítica permaneceu inalterada. Em um estudo mais aprofundado sobre algumas características morfológicas e de cinética enzimática deste MIP (SANTOS et al., 2009a) é notória a diferença existente em relação ao material não-impresso. Morfologicamente, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é possível observar que o MIP apresenta superfície mais porosa que o NIP e conseqüentemente maior área superficial. Em relação aos parâmetros cinéticos, o MIP apresentou comportamento condizente com o de uma enzima (perfil Michaelis-Menten), porém com uma afinidade inferior pelo substrato (comprovada pelo valor de K_m mais elevado que o de uma peroxidase natural). Entretanto, isto não constituiu um problema, pois o material apresenta outras qualidades que justificam sua utilização.

Santos et al. (2009b), em outro trabalho, sintetizou um MIP utilizando como template a catecolamina serotonina. Deve-se ressaltar que esta foi a única modificação feita no método de síntese, ou seja, após a remoção do analito a composição dos MIP referentes aos dois trabalhos é idêntica, apenas com uma impressão diferenciada. Os resultados encontrados neste segundo trabalho corroboram a efetividade da impressão molecular, pois novamente o MIP foi seletivo para o analito impresso, no caso a serotonina. Foram obtidos bons resultados também na determinação de serotonina em amostras de soro sanguíneo humano por meio de método de adição e recuperação com valores muito próximos de 100%.

Na mesma linha de raciocínio Piletsky et al. (2005) desenvolveu um MIP capaz de simular a atividade da enzima tirosinase. Esta enzima caracteriza-se pela existência de dois átomos de cobre em seu grupo prostético, que são capazes de oxidar a molécula de catecol em o-quinona. Algum tempo depois Lakshmi e colaboradores (2009) adaptaram a síntese deste MIP sobre um eletrodo de ouro contendo um filme de polianilina previamente formado através de eletropolimerização. O objetivo deste trabalho foi produzir um sensor biomimético que ao mesmo tempo em que fosse capaz de catalisar a oxidação do catecol por H_2O_2 pudesse também captar e transduzir os elétrons gerados na reação para um potenciostato. A demanda por estas características está fundamentada no fato de que os MIP em geral são isolantes elétricos, ou seja, quando encontram-se de forma isolada, sem conexão com algum condutor, a corrente gerada na reação não pode ser monitorada.

2.5 Catecolaminas

As catecolaminas são aminas biogênicas que possuem funções importantes nos organismos animais atuando como hormônios e neurotransmissores, tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico. São caracterizadas pela presença de um anel catecol e uma cadeia lateral contendo a função amina, tendo como principais representantes a dopamina, norepinefrina e epinefrina. A

instabilidade química também é um fator característico dessa classe de moléculas, pois são facilmente degradadas por meio de reações redox com a formação de diversos metabólitos (RAGGI et al., 1999). Desta forma, grande parte dos métodos analíticos aplicados na determinação de catecolaminas explora este mecanismo, seja através da determinação colorimétrica dos produtos de degradação (KITAMURA et al., 2007), ou mesmo da medida direta da oxidação ou redução do analito por meio de técnicas eletroquímicas (RAGGI et al., 1999).

Porém, apesar do grande número de métodos existentes para a determinação das catecolaminas em diversos tipos de amostras, observa-se que na maioria dos casos são utilizadas técnicas que exigem instrumentação de custo elevado e metodologias complexas que possibilitem a separação prévia das espécies, como HPLC (RAGGI et al., 1999; MISHRA et al., 2009) e CE (ZHU; KOK, 1997).

Outras metodologias, as quais utilizam técnicas eletroanalíticas também são encontradas, e normalmente são realizadas por meio de sensores modificados com a inclusão de enzimas (LISDAT et al., 1997; YAO et al., 2007). No entanto, são métodos que possuem pouca seletividade para a distinção entre as catecolaminas em determinações simultâneas, porém apresentam bom desempenho para amostras contendo poucos interferentes. A utilização de reagentes oxidantes também é descrita, porém também apresenta níveis de interferência elevados e pouca seletividade (GARCIA MATEO; KOJIO, 1997).

2.6 Sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA) pode ser definida como sendo um processo onde uma amostra em solução aquosa é introduzida em um fluxo carregador que a transporta até o detector, sendo que durante o percurso a amostra pode receber reagentes ou passar por diferentes tipos de tratamento. Em geral o sistema pode ser dividido em quatro partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção. Para a propulsão dos fluidos pode ser empregada uma

bomba peristáltica e um injetor/comutador que é usado para a injeção da amostra. A reação química esperada ocorrerá durante o percurso analítico e a detecção poderá ser feita utilizando um equipamento compatível com o produto da reação (CALATAYUD, 1996).

Existem vários tipos de configurações de sistema FIA: linha única, confluência, zonas coalescentes, reamostragem, monossegmentado, fluxo intermitente entre outros, sendo que em todas estas estratégias de montagem do sistema o objetivo é controlar a reação química e a dispersão de seu produto ao longo do sistema, proporcionando sinais amplificados e bem resolvidos. O sinal obtido é um sinal transiente, no qual se pode integrar a área sob o pico ou medir a altura do mesmo, que é sempre correspondente ao ponto de maior concentração do produto existente no sistema.

O sistema FIA apresenta-se como uma ótima alternativa para o estudo de reagentes sólidos, pois permite o monitoramento on-line dos produtos da reação e possui a vantagem de permitir análises seqüenciais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar um polímero molecularmente impresso (MIP) capaz de catalisar seletivamente a reação de oxidação da epinefrina (EP) por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando produtos detectáveis por amperometria acoplada a um sistema FIA.

3.2 Objetivos específicos

- Executar a otimização do método analítico de forma univariada para os parâmetros que possam ser modificados;
- Realizar teste comparativo entre a atividade catalítica do material impresso (MIP) e do não impresso (NIP);
- Sintetizar polímeros com a utilização de diferentes monômeros e comparar suas respectivas atividades catalíticas;
- Verificar o nível de interferência de substâncias de estrutura e/ou composição química semelhantes à EP;
- Determinar as figuras de mérito do método analítico;
- Utilizar a metodologia na quantificação da concentração de EP em produto farmacêutico;
- Determinar os parâmetros cinéticos da atividade catalítica do MIP-MAA;
- Realizar a caracterização física dos materiais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Para a síntese dos polímeros e realização dos testes foram utilizados os seguintes reagentes grau analítico:

- Clorofórmio (CHCl_3) – Tedia, USA;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Tedia, USA;
- 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) – Sigma-Aldrich, Belgium;
- Cloridrato de Epinefrina (EP) – Sigma-Aldrich, Belgium;
- Dopamina (DP) – Fluka Chemie AG, Germany;
- P-aminofenol - Sigma-Aldrich, Belgium;
- L-dopa - Fluka Chemie AG, Germany;
- Metil-L-dopa - Fluka Chemie AG, Germany;
- Ácido ascórbico – Vetec, Brasil;
- Fenol - Acros Organics;
- Catecol - Acros Organics;
- Guaiacol - Acros Organics;
- Ácido Metacrílico (MAA) – Acros Organics;
- Hemina – Acros Organics;
- Etileno Glicol Dimetacrilato (EGDMA) – Acros Organics;
- 4-Vinilpiridina (4-VPy) – Acros Organics;

No preparo das soluções utilizadas nos testes analíticos foi empregado água purificada (Milli-Q). Os reagentes utilizados foram:

- Cloreto de Potássio (KCl) – Sigma, USA;
- Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) – Merck, Alemanha;
- Tris-HCl – Invitrogen, USA;
- Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4) – Synth, Brasil;
- Citrato de Sódio – Synth, Brasil;
- Brometo de potássio (KBr) – Reagen, Brasil.

4.2 Síntese dos polímeros e preparo para aplicação

Foram utilizados durante o desenvolvimento do trabalho diferentes tipos de polímeros que serão apresentados com mais detalhes em momento oportuno. Entretanto, deve-se ressaltar que o procedimento de síntese utilizado foi o mesmo para todos, havendo modificações apenas quanto à composição dos materiais. No caso dos NIP não foi adicionado o analito (EP), e no material sem atividade catalítica e sem impressão foram excluídas da síntese a EP e a hemina.

O método utilizado (via “bulk”) e as concentrações de reagentes utilizados são adaptados de Santos et al. (2007) com pequenas modificações quanto ao

analito utilizado. Para tanto, foi adicionado em recipiente de vidro 2,0 mL da mistura de solventes CHCl_3 :DMSO (1:1) e EP (45 μmol). Agitou-se a mistura até a completa dissolução da EP e em seguida acrescentou-se MAA ou 4VPy (450 μmol), EGDMA (7,95 mmol), hemina (30 μmol) e AIBN (180 μmol). Novamente, agitou-se a mistura até completa homogeneização dos reagentes sólidos e procedeu-se a purga da solução em fluxo de nitrogênio por 15 minutos. Na sequência, o recipiente foi selado hermeticamente e levado ao banho de óleo ajustado na temperatura de 60°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) por 24 horas. Ao final da reação de polimerização o material sólido de coloração marrom foi removido do recipiente de vidro, triturado, seco à temperatura ambiente por 12 horas e peneirado em tamis com abertura de diâmetro 106 μm . Após esta etapa procedeu-se a extração da molécula molde por percolação com solução de metanol:ácido acético (4:1) (v/v), realizando-se o monitoramento dos eluatos por voltametria de pulso diferencial (DPV) até a ausência de sinais de oxidação correspondentes à EP. O material foi novamente seco à temperatura ambiente por 12 horas e armazenado em ausência de luz, estando pronto para uso.

4.3 Instrumentação analítica

Para a realização das amperometrias foi utilizado um potenciostato/galvanostato Autolab® PGSTAT-12 (Eco Chemie BV, Utrecht, The Netherlands), utilizando os seguintes eletrodos: Ag/AgCl (referência), platina (auxiliar) e como eletrodo de trabalho o carbono vítreo (GCE). Porém, a disposição dos eletrodos é diferenciada para as duas técnicas eletroquímicas, sendo adaptadas para os testes de DPV em cela única (modo convencional), e para os testes amperométricos em cela eletroquímica de três vias em modo “wall-jet” acoplada à saída da coluna contendo o material teste. Foi utilizada para a propulsão das soluções do sistema FIA uma bomba peristáltica de oito canais (Ismatec IPC, Zurich, Switzerland) contendo tubos de Tygon® de diferentes diâmetros e tubos de polietileno 0,8 mm de diâmetro interno. Para a inserção das amostras no sistema FIA foi utilizado um injetor/comutador tipo 2:3:2, fabricado em Teflon® (PTFE, politetrafluoroetileno). As minicolunas contendo o material teste (MIP ou NIP) foram produzidas através da junção de duas ponteiros de micropipetas de polietileno

unidas opostamente pelos orifícios de maior diâmetro, em formato bicônico, sendo inserida lã de vidro nas extremidades internas para a retenção do material no interior da coluna. As leituras de pH foram realizadas em um pHmetro marca Metrohm (Herisau, Switzerland) modelo 827 pH Lab. A obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi feita no equipamento JEOL JSM 6360-LV (Tokyo, Japan), com voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras utilizadas nesta análise foram primeiramente recobertas com uma fina camada da liga Au-Pd através do equipamento Bal-Tec MED 020. As análises termogravimétricas foram realizadas no equipamento TA Instruments, modelo TGA 2950 (California, USA) nas temperatura entre 30 e 600 °C, com rampa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de argônio. A caracterização do material teve como objetivo verificar a existência de diferenças morfológicas e químicas entre o MIP-MAA e o NIP1, através da realização das análises de espectroscopia de infravermelho (IR), termogravimetria (TG) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os objetivos específicos das técnicas especificadas são:

- a) IR: verificação da existência de bandas distintas entre o material impresso e o controle; comparação com os espectros de alguns precursores; verificação da existência de bandas referentes à EP no espectro do MIP-MAA após a remoção do “template”.
- b) TG: comparação entre o perfil de decomposição do MIP-MAA, NIP1 e NIP2.
- c) MEV: visualização da superfície e dos grânulos do MIP-MAA, NIP1 e NIP2.

4.4 Sistema FIA acoplado ao potenciostato

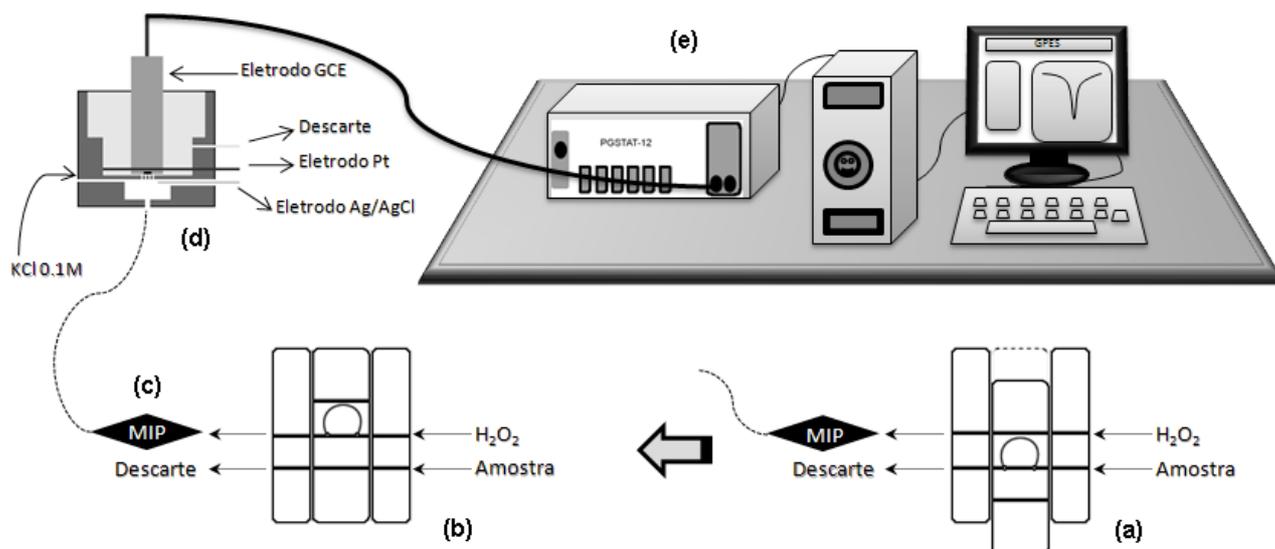


Figura 3. Representação esquemática do sistema FIA acoplado ao potenciostato. (a) amostragem, (b) inserção da amostra, (c) minicoluna contendo MIP ou NIP, (d) cela eletroquímica de três vias modo "wall-jet" e (e) potenciostato operado por microcomputador.

Uma das vantagens do sistema FIA é a possibilidade de conectá-lo a diferentes tipos de instrumentações analíticas para a realização do monitoramento do produto de reação. É muito observado na literatura a utilização de equipamentos de espectrofotometria ultravioleta e visível, espectrofluorímetros e também potenciômetros e potenciostatos. A Figura 3 mostra a disposição da montagem do sistema utilizado (linha única) para a aquisição dos dados por amperometria, que é constituído por (A) um injetor/comutador, capaz de realizar a amostragem em volume fixo e promover a inserção desta no fluxo carreador, (B) uma bomba peristáltica, responsável pela propulsão das soluções utilizadas (amostra, H_2O_2 e eletrólito suporte KCl), (C) uma cela eletroquímica do tipo "wall-jet", que permite a adaptação do eletrodo de trabalho frontalmente ao fluxo proveniente da coluna de MIP, (D) um potenciostato, capaz de detectar variações de corrente na escala de nanoampères (nA), e (E) um microcomputador contendo o software "General Purpose Electrochemical System" (GPES) versão 4.9, Eco Chemie B.V. (Utrecht, The Netherlands), capaz de controlar o equipamento e adquirir os sinais gerados, que foram calculados em função da altura de pico. O sistema possui duas posições fixas conforme demonstrado na Figura 3: (a) amostragem e condicionamento da coluna por meio da oxidação dos sítios ativos promovido pelo H_2O_2 e (b) inserção da amostra no fluxo carreador direcionado para o reator contendo o MIP.

Para a realização dos testes catalíticos foi fixada a massa de 30 mg do material teste dentro da coluna. Os seguintes parâmetros foram otimizados de forma

univariada: potencial aplicado no eletrodo de trabalho (0,0 V), concentração de H_2O_2 no carreador ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$), vazão ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$), volume da amostra ($120 \mu\text{L}$), pH da amostra ($8,0 \pm 0,1$), concentração e tipo do tampão da amostra (Tris HCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$).

4.5 Tratamento estatístico dos dados

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através de ANOVA e a comparação de médias foi realizada através do teste de Tukey. Ambos os testes foram realizados com o auxílio do software OriginPro 7.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do “template” – limpeza do polímero

O monitoramento dos eluatos obtidos no processo de lavagem do material através de voltametria de pulso diferencial (DPV) foi capaz de demonstrar a redução na concentração de EP retida no material. A figura 4 apresenta os resultados obtidos.

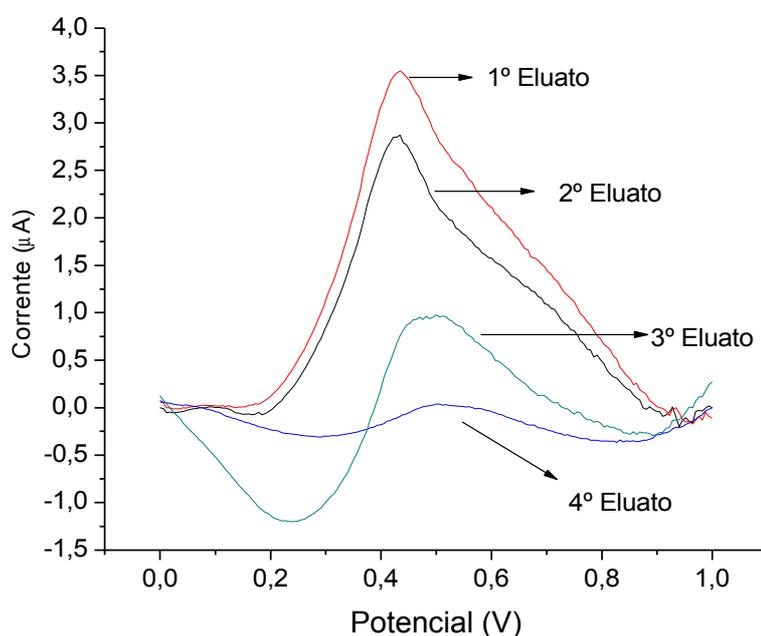


Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial dos eluatos provenientes da lavagem do MIP-MAA para remoção da epinefrina.

5.2 Materiais sintetizados e testes catalíticos iniciais

Foram sintetizados quatro tipos de materiais distintos, sendo eles: (a) MIP catalítico utilizando como monômero funcional o MAA (MIP-MAA), (b) NIP com hemina (NIP1), (c) NIP sem hemina (NIP2) e (d) MIP catalítico utilizando 4-vinilpiridina como monômero funcional (MIP-4VPy). O primeiro teste feito com o MIP e o NIP1 objetivou verificar a existência de atividade catalítica destes materiais e se esta ocorreria conforme o mecanismo mediado por H_2O_2 (Figura 5).

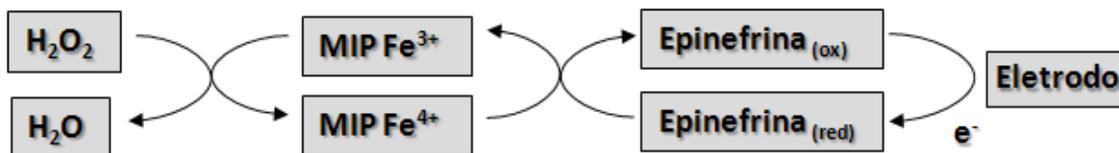


Figura 5. Proposição do mecanismo redox envolvido no sistema.

Para tanto, utilizou-se como solução carreadora apenas água, sem adição de H_2O_2 , e realizou-se as inserções de amostra. Em seguida alterou-se a solução carreadora para H_2O_2 50 μM . O resultado foi satisfatório e demonstrou que na ausência de peróxido de hidrogênio a amplitude de sinal obtida é bastante reduzida e semelhante tanto para o MIP-MAA quanto NIP1 (Figura 6), não podendo inclusive ser atribuída a produtos de reação de oxidação. Por outro lado, com a utilização de H_2O_2 , mesmo que extremamente diluído, a catálise da reação acontece, havendo amplificação considerável do sinal (Figura 7).

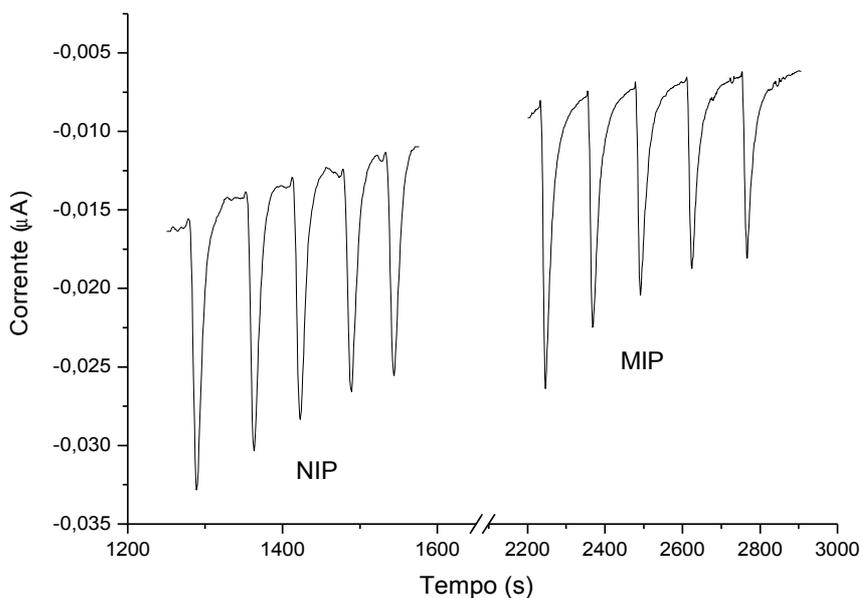


Figura 6. Verificação da atividade catalítica do NIP1 e MIP-MAA. Solução carreadora sem peróxido de hidrogênio.

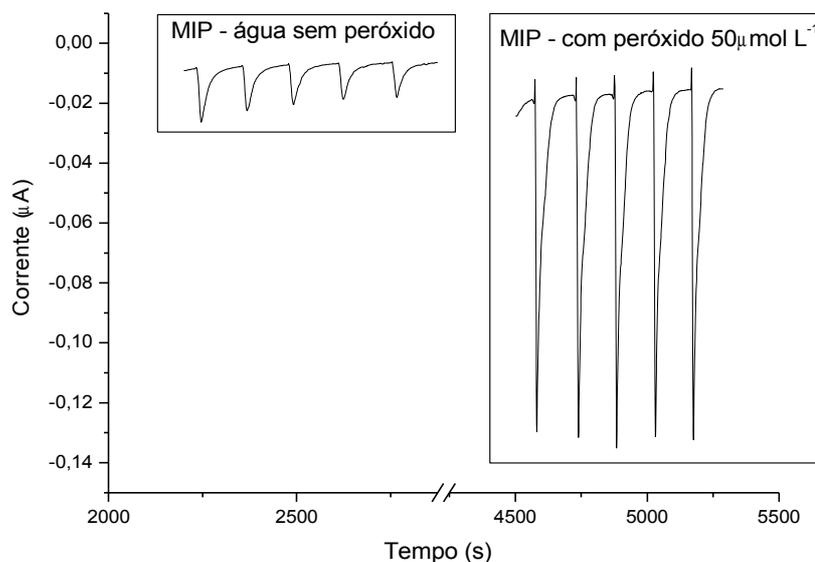


Figura 7. Comparação de atividade catalítica do MIP-MAA utilizando como carreador água sem (primeiro quadro) e com (segundo quadro) peróxido de hidrogênio ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$, $0,0 \text{ V}$, EP $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em água Milli-Q)

Uma vez atestada a capacidade de realizar catálise oxidativa dos materiais partiu-se para a verificação da efetividade da impressão e, conseqüentemente, o aumento no potencial catalítico provocado por esta. Nesta análise os materiais foram submetidos a uma comparação da atividade catalítica utilizando parâmetros não otimizados do sistema FIA, porém com capacidade de fornecer resultados. Esta afirmação baseia-se nos parâmetros utilizados por Santos et al. (2007), que desenvolveu seu trabalho em condições semelhantes. As Figuras 8 e 9 mostram o resultado obtido utilizando-se potencial de $0,0 \text{ V}$, concentração de H_2O_2 de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e concentração de EP em água de $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

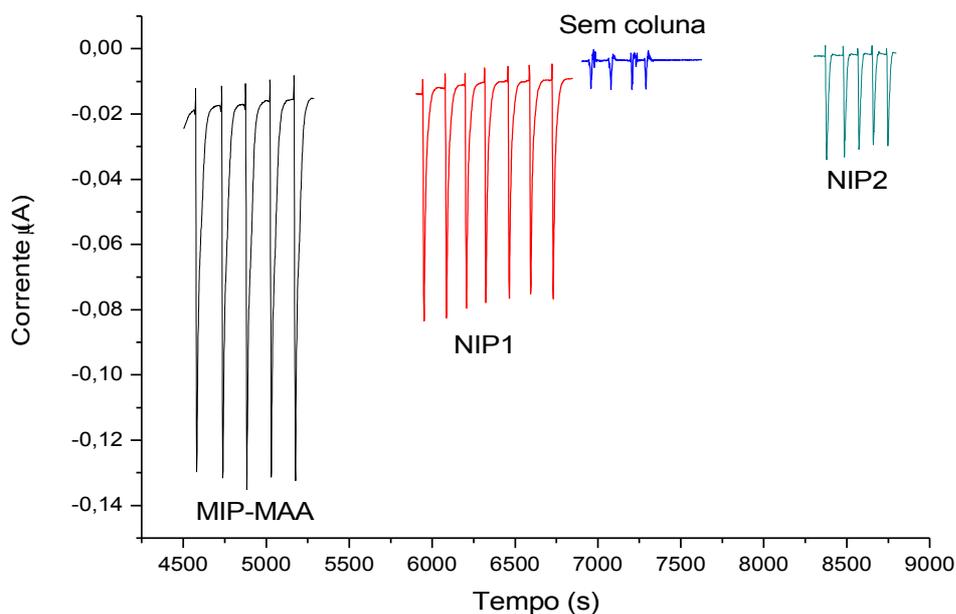


Figura 8. Diagrama comparativo entre os sinais obtidos com epinefrina (EP) $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ após eluição com peróxido de hidrogênio $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ através de colunas contendo MIP-MAA, NIP com hemina (NIP1), sem coluna e NIP sem hemina (NIP2), respectivamente.

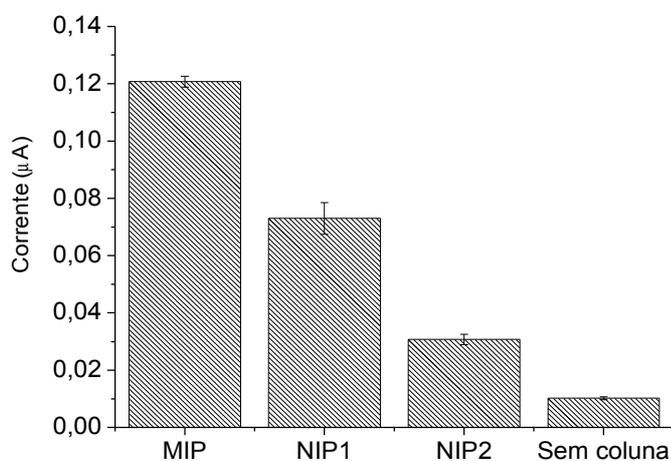


Figura 9. Comparação de atividade catalítica entre os materiais produzidos. Amplitude de sinal obtida com cada coluna (n=3).

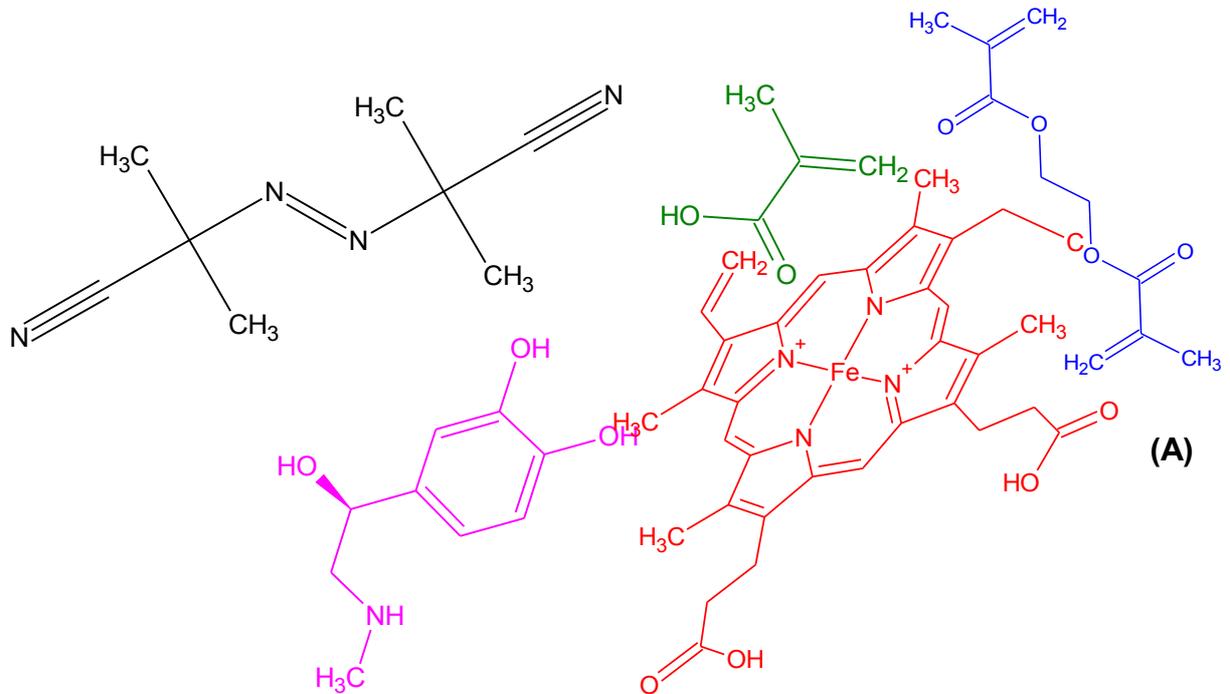
A partir dos resultados obtidos nesse teste é possível observar uma diferença de amplitude nos sinais obtidos com os diferentes materiais, o que é um indicativo da variação de potencial catalítico existente entre eles, principalmente entre o MIP-MAA e o NIP1, onde observou-se um ganho de sinal de 1,7 vezes para o material impresso. Comparando-se o MIP-MAA e o NIP sem hemina verifica-se também a atividade catalítica aumentada do MIP, porém deve-se ressaltar que neste caso a redução drástica da catálise pelo NIP é devida à ausência de hemina. Com o

intuito de verificar se a amostra poderia estar oxidada antes mesmo do contato com a minicoluna realizou-se o teste sem a presença da mesma, conectando-se diretamente a saída da amostra com a cela eletroquímica. Deste modo comprovou-se que a amostra de EP em solução aquosa permanecia em seu estado reduzido, sendo oxidada apenas pelo material contido na coluna.

A partir deste resultado algumas observações podem ser feitas. A primeira é em relação à presença de sinal utilizando-se a coluna de NIP sem hemina, o que indica a oxidação da EP. Neste caso, sugere-se que a coluna contendo o material atua como um reator, ocasionando o distúrbio hidrodinâmico da amostra e desta forma elevando a probabilidade de choques intermoleculares entre a EP e o peróxido de hidrogênio existente no meio reacional. E a segunda é referente ao ganho de sinal de oxidação quando se utiliza a coluna contendo o material impresso em relação ao NIP1, pois sabe-se que a única diferença existente entre estes é a presença de EP no meio reacional do MIP no momento da síntese. Entretanto, após a sua remoção a composição de ambos os materiais é idêntica, diferenciando apenas no arranjo molecular dos monômeros funcionais e da cadeia polimérica. Desta forma, já é possível afirmar que a impressão molecular foi efetiva e conseguiu tornar disponível um maior número de sítios catalíticos, ou seja, permitiu que o grupo prostético capaz de realizar a catálise ficasse posicionado de tal forma no material a permitir o contato entre ele e o substrato, no caso a EP. Sendo assim, devido ao maior número de moléculas oxidadas o MIP-MAA apresentou sinal de maior amplitude (WULFF, 2002).

Este dado demonstra que o simples fato de possuir hemina na composição do material não é garantia de atividade catalítica elevada, pois é necessária a presença de sítios catalíticos e que estes possuam homogeneidade, ou seja, precisam ser similares. Para se alcançar este objetivo a impressão molecular apresenta-se como uma boa alternativa, pois é capaz de organizar previamente a disposição das moléculas que irão interagir com o analito, entre elas o centro ativo do sítio prostético, e fixá-las nestas posições após o processo de polimerização. Fato este que não ocorre com o NIP1, que apesar de apresentar atividade catalítica esta não é específica, sendo ocasionada por sítios não-específicos presentes no material. Estes sítios não-específicos podem ser descritos como locais que permitem o contato do substrato com o centro catalítico que não estão inseridos em cavidades e sim distribuídos aleatoriamente (WULFF, 2002).

No caso da hemina o átomo de ferro coordenado no centro da molécula deve estar estericamente disponível para o contato com os grupamentos funcionais da EP, visto que serão estes os pontos que sofrerão a oxidação. A Figura 10 demonstra esquematicamente a possível interação existente entre a EP e a cavidade presente no MIP,



Legenda:

- | | |
|---|---|
|  Iniciador Radicalar AIBN |  Epinefrina |
|  Ácido Metacrílico |  Hemina |
|  Etilegoglicol dimetacrilato (EGDMA) | |

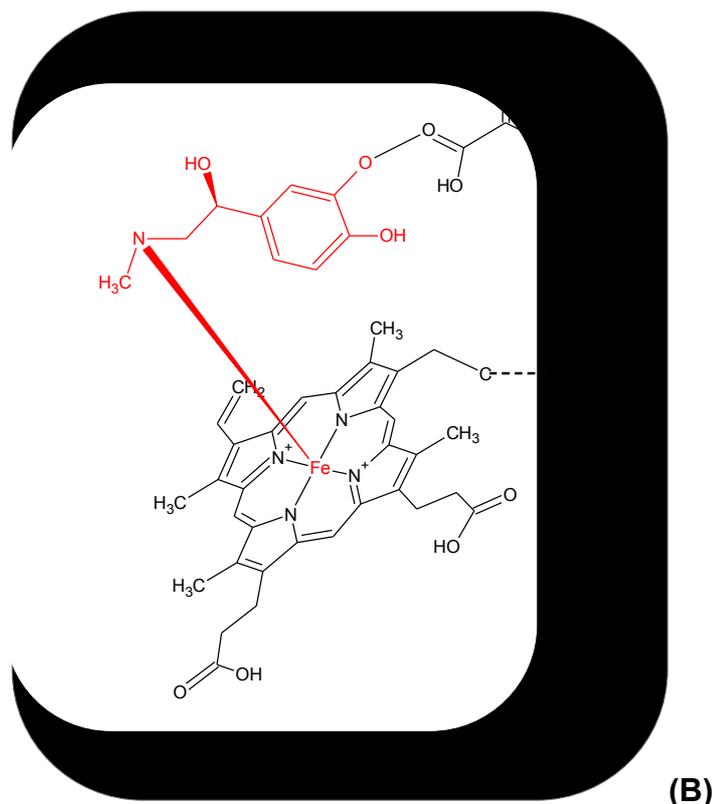


Figura 10. Representação da possível interação entre as moléculas utilizadas na síntese do polímeros (A) e a cavidade formada no MIP (B).

Segundo Corona-Averdaño et al. (2005) as ionizações da molécula de EP (Figura 11) iniciam-se no grupo amino, na seqüência os grupos hidroxila do anel catecol, sendo um de cada vez, e finalmente a quarta ionização na função álcool. Ele também calcula o valor de pKa para estas ionizações em 8,02; 9,46; 10,28 e 13,50 respectivamente.

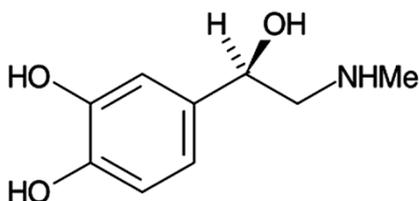


Figura 11. Estrutura molecular da epinefrina (EP).

Uma vez comprovada a atividade catalítica superior do material impresso, foi realizado um teste a fim de se verificar a reprodutibilidade tanto do método analítico quanto da atividade do material. Na realização deste teste foram confeccionadas novas colunas de MIP e NIP que ainda não haviam sido utilizadas e repetiu-se o

teste sob as mesmas condições do teste inicial, porém com intervalo de 83 dias (Figura 12). Comparando-se estas análises observa-se um ganho de sinal em relação ao NIP de 1,7 (dia A) (Figura 13) e 1,6 vezes (dia B) (Figura 14) respectivamente, ou seja, uma variação aproximada de 5%, o que é aceitável para o procedimento. Pode-se observar também uma pequena variação na amplitude (ΔI) dos sinais nos diferentes dias, o que pode ser considerado normal visto a escala nanométrica de corrente em que se trabalha e também o fato do método ainda não estar otimizado.

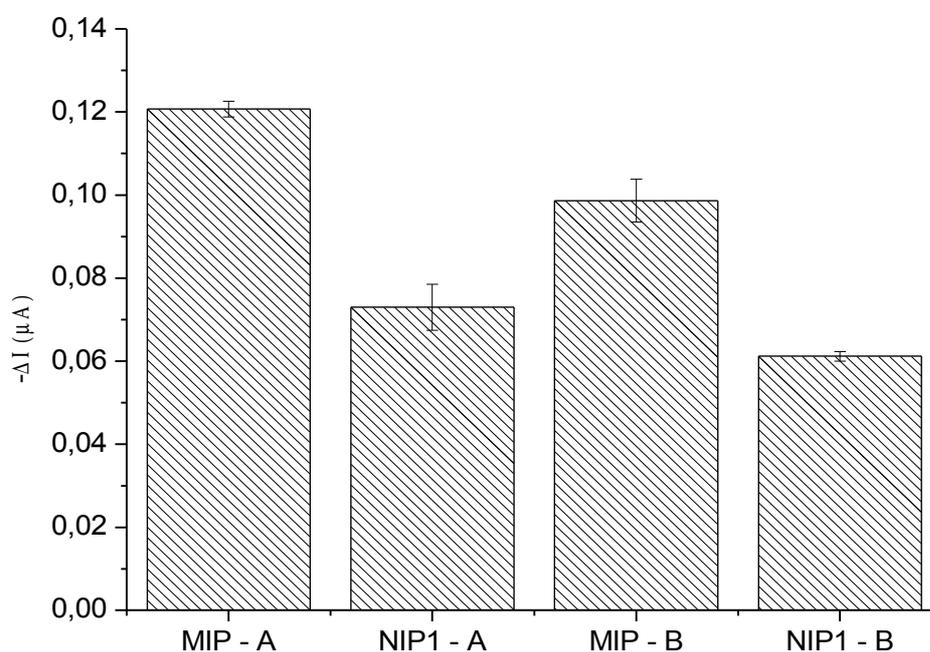


Figura 12. Comparação entre a eficiência catalítica do MIP-MAA *versus* NIP1 em diferentes datas (A e B) e com colunas contendo porções de material renovadas.

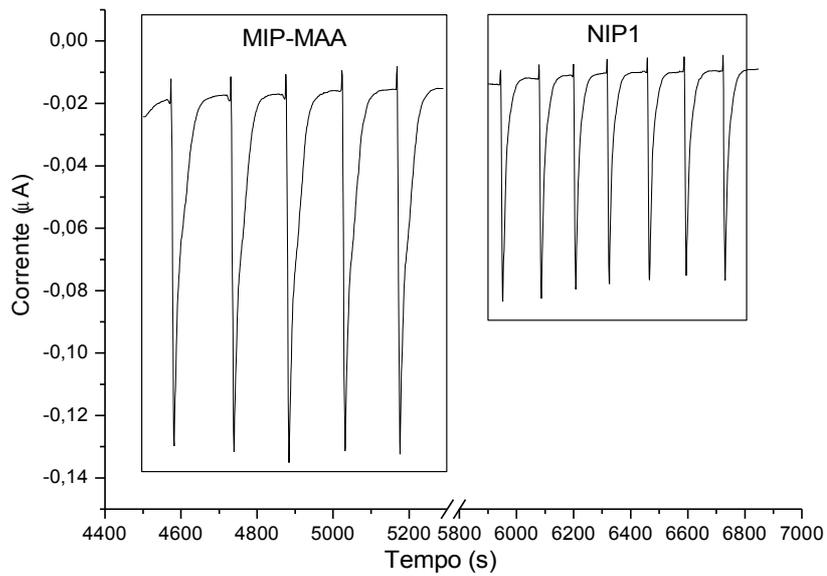


Figura 13. Comparação entre MIP-MAA e NIP1 (dia 12/12/2008). Condições analíticas: H_2O_2 50 μM 0,9 mL min^{-1} , EP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água, 120 μL amostra, potencial 0,0 V.

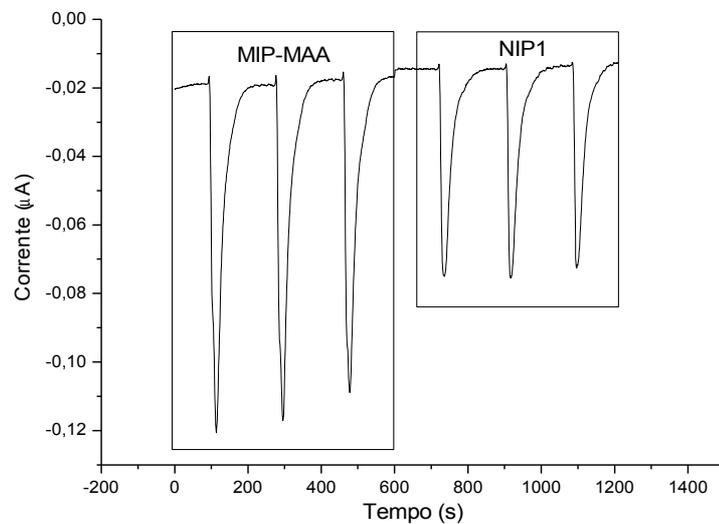


Figura 14. Comparação entre MIP-MAA e NIP1 (dia 04/03/2009). Condições analíticas: H_2O_2 50 μM 0,9 mL min^{-1} , EP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água, 120 μL amostra, potencial 0,0 V.

5.2.1 Comparação MIP-MAA e MIP-4VPy

Conforme citado anteriormente, a seleção do monômero funcional que será utilizado deve ser criteriosa e racional, pois deve assegurar a existência de sua interação química com o analito. Com o objetivo de demonstrar essa teoria foi realizada a comparação da atividade catalítica entre os MIP sintetizados utilizando MAA e 4-VPy. A Figura 15 mostra o resultado obtido.

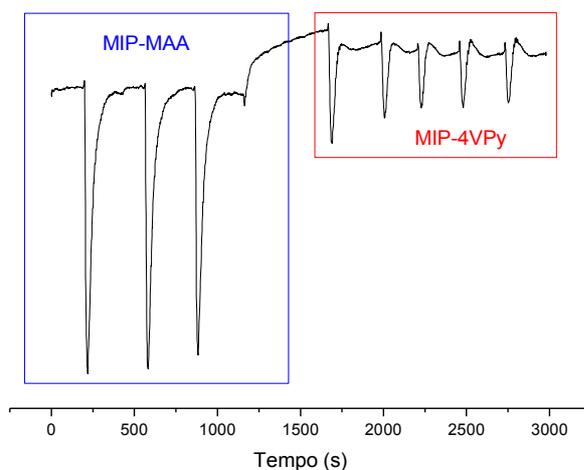


Figura 15. Diagrama comparativo entre o MIP-MAA e o MIP-4VPy. (H_2O_2 50 μM 0,9 mL min^{-1} , EP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água, 120 μL amostra, potencial 0,0 V)

Pôde-se observar que a atividade catalítica obtida com o MIP-4VPy é bastante inferior àquela observada quando da utilização do MIP-MAA, o que comprova a necessidade de se optar pela utilização de monômero funcional que tenha afinidade pelo analito. Sugere-se então, neste caso, que a interação entre a 4-VPy e a EP foi prejudicada pelo caráter básico apresentado por ambos os compostos, diferentemente do observado quando se utilizou o MAA, que é um composto ácido e teoricamente mais propenso à interagir com a EP. Este comportamento também fortalece a teoria da impressão molecular, que prevê a organização prévia dos monômeros na presença do analito como fator fundamental para a formação de cavidades tridimensionais.

Diante dos resultados obtidos, ficou evidenciada a não necessidade de se prosseguir os testes catalíticos com o MIP-4VPy.

5.3 Caracterização do material

5.3.1 Infravermelho

A análise do espectro de IR (Figura 16) demonstrou não haver diferenças significativas que indicassem a influência da impressão molecular na estrutura química dos materiais. Entretanto, algumas observações podem ser feitas.

Comparando-se com os espectros isolados das substâncias precursoras, sugere-se que as seguintes bandas, apresentadas pelos espectros do MIP e NIP, sejam provenientes destes compostos: 2960 cm^{-1} (EGDMA, estiramento CH de ligações sp^2 e sp^3), 2340 e 2365 cm^{-1} (AIBN, estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ insaturado). Outras bandas importantes na região de 1700 (estiramento $\text{C}=\text{O}$), 1445 (deformação assimétrica C-H) e 1160 cm^{-1} (deformação OH e estiramento CO) são comuns ao MAA, hemina e EGDMA, e devido à concentração bastante elevada deste último várias bandas da região de “fingerprint” referentes ao MAA e hemina podem estar sendo suprimidas (SDBSWeb, 2009). A diferença de maior expressão é observada na porcentagem de transmitância (%T) da banda associada ao AIBN, o que pode indicar a diferença de consumo deste reagente nos dois processos de síntese, sendo que neste caso aparentemente houve maior consumo na polimerização do NIP1.

Outro fato importante foi a ausência de bandas de absorção típicas da molécula de EP em 1420, 1496, 1588 e 2716 cm^{-1} , o que é outro indicativo de sucesso no processo de remoção do “template”.

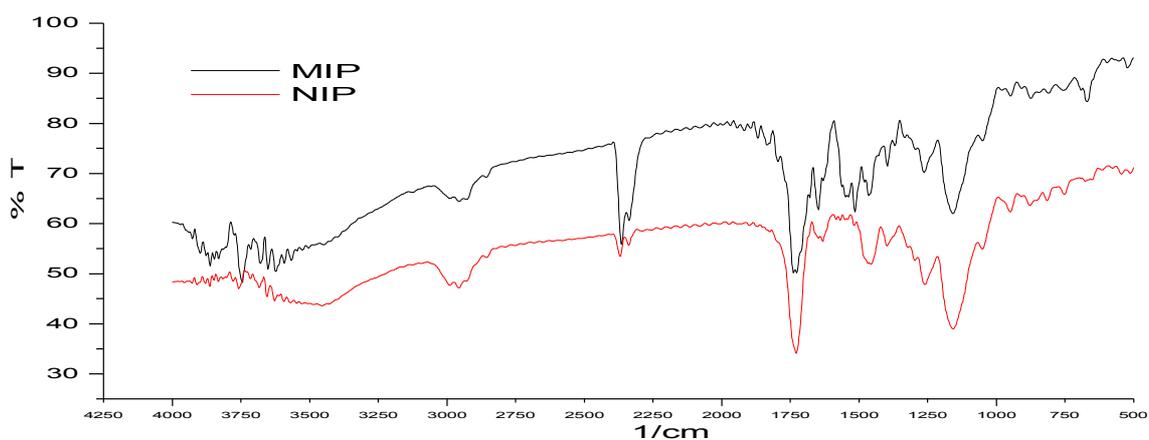


Figura 16. Espectro de infravermelho do MIP-MAA e NIP1.

5.3.2 Termogravimetria (TG)

Para facilitar o acompanhamento desta discussão dividiu-se os termogramas em três etapas, conforme demonstrado na Figura 17.

A principal diferença observada no perfil de degradação dos polímeros estudados está vinculada à presença ou não de hemina. No caso do NIP2, que não contém hemina, a curva de decomposição apresenta basicamente dois pontos de inflexão, sendo que o primeiro inicia-se em torno de 60°C, e provavelmente corresponde à liberação de água e possíveis solventes de baixo ponto de ebulição adsorvidos nas partículas (LAMPE; SCHULTZE; ZYGALSKY, 2001). O segundo ponto de inflexão inicia-se ao redor de 220°C, sendo que a partir deste momento a taxa de degradação permanece praticamente constante até o consumo quase total ($\approx 98\%$) da amostra ao redor de 480°C. A partir desta temperatura observa-se apenas uma pequena variação de massa de aproximadamente 0,5% (2,0 \rightarrow 1,5%). Lampe et al. (2001) sugere que este resíduo seja composto por átomos de carbono livres e hidrocarbonetos de alto peso molecular. Este comportamento sugere uma composição química bastante homogênea do material, o que é condizente com os reagentes utilizados e o tipo de síntese, que levam a formação de um homopolímero (polimetacrilato) com grau de polimerização (tamanho de cadeias poliméricas) semelhante para as diversas cadeias poliméricas da rede.

Em relação aos resultados obtidos para o MIP-MAA e o NIP1 pode-se observar um perfil de degradação distinto daquele observado para o NIP2. Na primeira etapa de degradação, que ocorre para todos até aproximadamente 150°C as três amostras apresentaram comportamento distinto, e podem ser comparados de duas formas: (1) posição das inflexões (°C) e (2) perda de massa ao final de uma etapa de degradação.

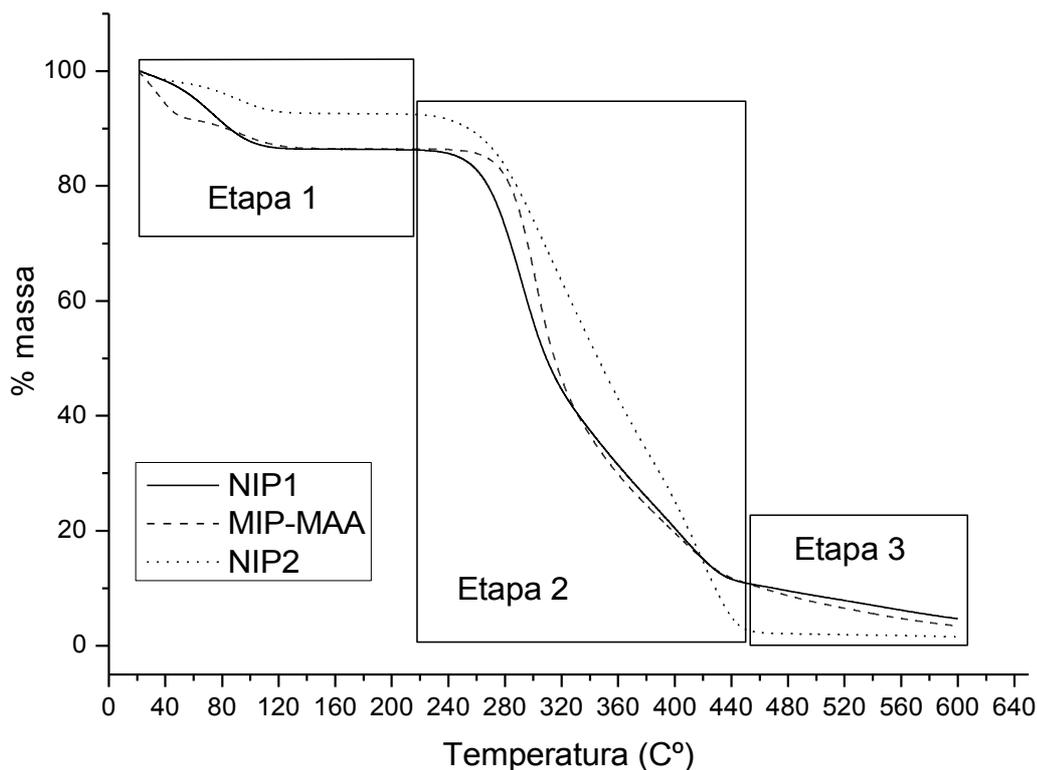


Figura 17. Termogramas do MIP-MAA, NIP1 e NIP2.

Considerando-se estas metodologias, observa-se inicialmente que NIP1 e NIP2 apresentam perfil semelhante para a primeira etapa, pois ambos possuem apenas um ponto de inflexão entre 30-150°C, o que não ocorre para o MIP-MAA, que apresenta perda de massa constante entre 30-45°C, onde ocorre a primeira inflexão. Neste momento a taxa de degradação diminui e inicia-se uma nova rampa de menor inclinação que permanece constante até aproximadamente 120°C. Conforme descrito anteriormente, sugere-se que nesta primeira etapa ocorra a liberação de água e solventes para todos os materiais. Entretanto, o perfil distinto entre MIP-MAA e NIP1 pode ser um indicativo de diferenças físicas de tamanho de partícula entre estes, sendo que o MIP-MAA provavelmente possui uma distribuição do tamanho de partículas maior, ou seja, é menos uniforme. Pode-se atribuir esta diferença à porosidade distinta existente entre os materiais, que influencia diretamente no tamanho das partículas formadas no processo de moagem, ou seja, quanto mais poroso o material maior a sua susceptibilidade à moagem mecânica.

Aproximando-se da região de 150°C os três materiais retomam perfis semelhantes e permanecem constantes até 220°C, onde novamente retomam perfis

distintos. Porém, outra observação deve ser feita em relação à primeira etapa considerando-se a perda de massa de cada amostra, sendo elas de 7,5% para o NIP2 e 13,5% para o MIP-MAA e NIP1. Logo, percebe-se que a presença de hemina no material proporciona a elevação na quantidade de substâncias adsorvidas na superfície, principalmente água. Esta constatação se faz bastante importante, pois é mais um indicativo da compatibilidade do material com amostras aquosas.

Na segunda etapa novamente observa-se comportamento distintos para os três materiais. Pode-se dizer que o MIP-MAA e o NIP1 apresentam perfis semelhantes, mas com diferenças nos pontos de inflexão (°C). Já o NIP2 apresenta perfil distinto de ambos os materiais que contém hemina, conforme descrito anteriormente.

Entre o MIP-MAA e o NIP1 duas observações podem ser feitas na segunda etapa. A primeira é em relação à temperatura de início da primeira inflexão, que foi de 229°C para o NIP1 e 242 °C para o MIP-MAA, ou seja, uma diferença de 13°C. A segunda é relacionada à taxa de decomposição, que é maior para o MIP-MAA, que apesar de iniciar o processo de decomposição da segunda etapa 13°C após o NIP1, é finalizado exatamente na mesma temperatura e com perda de massa idêntica (450°C e 75,5% de massa). Já a diferença entre os polímeros contendo hemina e o polimetacrilato nesta segunda etapa é a existência de duas rampas de inclinações distintas tanto para o NIP1 e o MIP-MAA.

Diante do exposto para esta etapa de decomposição sugere-se que a formação de duas rampas no MIP-MAA e NIP1 é uma característica típica da decomposição da molécula de hemina, presente em ambos. Sugere-se também que a diferença de 13°C existente entre estes no início da decomposição é devido à desorganização (heterogeneidade) das cadeias poliméricas formadas na ausência do “template” associada ao fato de ser um copolímero, diferentemente do polimetacrilato que possui processo de polimerização menos complexo por tratar-se de um homopolímero.

Por fim a terceira etapa demonstra que o MIP-MAA e o NIP1 apresentam menor perda de massa ($\approx 96,0\%$) ao final do processo (600°C) em relação ao NIP2 ($\approx 98,5\%$), o que provavelmente é ocasionado pela presença dos átomos de ferro provenientes das moléculas de hemina.

5.3.3 *Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)*

As imagens obtidas através de MEV (Figura 18) não foram conclusivas para a existência de diferenças superficiais entre o MIP-MAA e o NIP1 em ampliação de 10.000x. Maiores ampliações não foram obtidas com sucesso para aprofundamento do estudo. Já na ampliação de 200x, apesar de não haver valor estatístico por tratar-se de uma região amostral não representativa do todo, pode-se observar que o MIP-MAA possui partículas de menor diâmetro em relação ao NIP1. Em relação ao NIP2 observou-se a existência de rugosidade na superfície do material e também a presença de partículas de diâmetro inferior aos demais materiais, o que provavelmente é ocasionado pela menor quantidade de água no material, tornando-o mais duro e conseqüentemente mais afetado pelo processo de moagem.

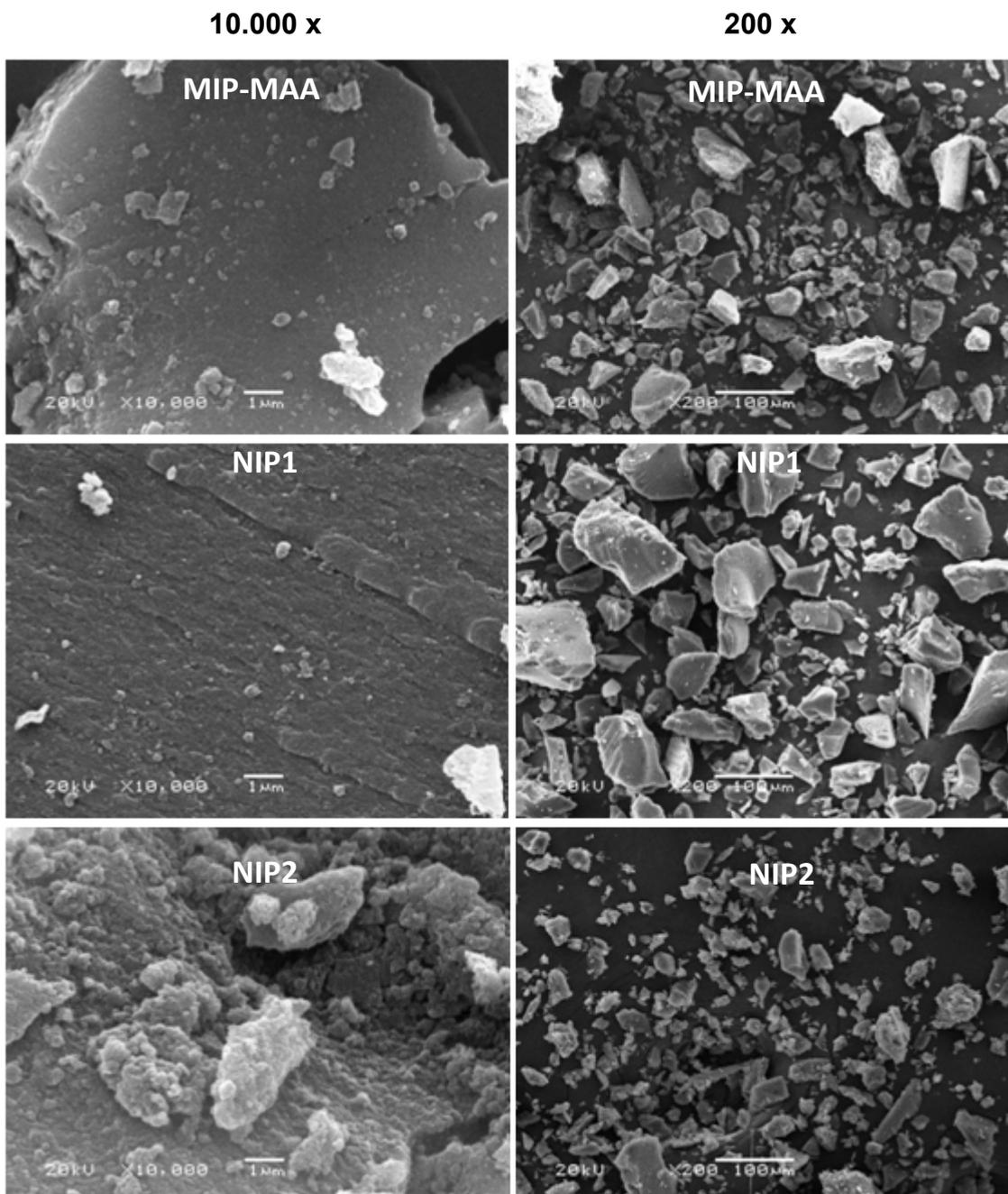


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura do MIP-MAA, NIP1 e NIP2.

5.4 Otimização do método analítico

Finalizados os testes iniciais e comprovada a atividade catalítica aumentada do MIP, partiu-se para a etapa de otimização da metodologia analítica com o intuito de se obter o melhor valor a ser aplicado em cada parâmetro de análise e,

consequentemente, obter as condições otimizadas do sistema. Em outras palavras, o objetivo principal é obter sinais analíticos amplos e bem resolvidos.

O sistema FIA caracteriza-se pela inserção de amostra em um sistema em fluxo através da simples comutação de canais e o respectivo alinhamento da alça de amostragem previamente carregada neste fluxo. No momento que a amostra é inserida na solução carreadora rapidamente a zona de amostra sofre dispersão. Em um sistema convencional onde não há presença de colunas ou reatores sólidos entre o comutador e o detector, este percurso é feito totalmente em tubos de diâmetro interno único, onde a alternativa para o aumento da formação de produto é ampliar o comprimento do percurso, o que proporciona maior tempo de reação. Neste cenário o fator limitante para a obtenção de sinais de amplitude elevada está relacionado com a velocidade de formação dos produtos de reação, pois uma vez que não haja tempo suficiente para que todo o analito contido na amostra seja consumido e transformado em um produto detectável, a amplitude do sinal não atingirá o valor máximo possível. Neste caso, os fatores que podem exercer influência direta na amplitude do sinal são a vazão do eluente, a concentração do analito na amostra, o volume de solução amostra que será inserido no sistema e o tempo disponível para que ocorra a reação desejada antes da detecção (entenda-se comprimento do reator).

Portanto, considerando-se estes fatores relacionados ao sistema FIA realizou-se a otimização do método de forma univariada, sobre os seguintes parâmetros: potencial aplicado no eletrodo de trabalho, concentração de H_2O_2 no carreador, vazão, volume da amostra, pH da amostra, concentração e tipo do tampão da amostra. Além destes parâmetros foram testados também variações no pH da solução carreadora e uso de tampão na solução carreadora. Dentre os principais parâmetros que geralmente são feitos, o único não testado neste trabalho foi o comprimento de reator, visto que se utiliza no sistema um reagente sólido contido em uma minicoluna, e um dos objetivos é justamente diminuir o percurso da amostra sem que haja redução na amplitude do sinal, o que é indicativo da boa atividade catalítica do MIP.

5.4.1 Potencial aplicado no eletrodo de trabalho

A otimização do potencial (V) que será aplicado no eletrodo de trabalho é de extrema importância para a obtenção de um método analítico mais seletivo, pois a utilização de potenciais extremos (neste caso, potenciais muito negativos) é capaz de magnificar a detecção do produto formado pela oxidação no MIP. Porém, a quantidade de energia existente na interface eletrodo/solução é capaz de reduzir, além do produto de oxidação da EP, outros produtos interferentes. Neste caso, o sinal gerado pode ser devido à somatória de processos redox simultâneos (Figura 19).

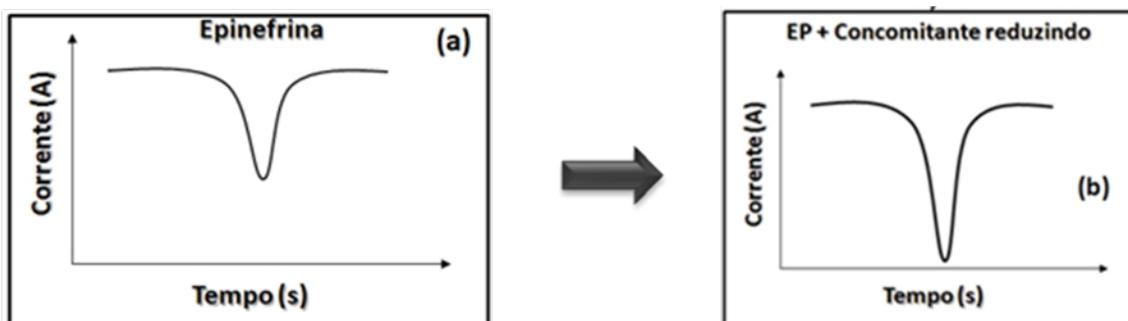


Figura 19. Processos de interferência no sinal analítico da epinefrina provocado pelo uso de potenciais extremos, sendo (a) o sinal obtido em amostra sem presença de interferentes e (b) na presença de interferentes, onde há somatória de sinais.

Para esta otimização foram feitas variações de 0,05 V ($n=3$) no intervalo entre 0,00 e -0,50 V, obtendo-se o resultado apresentado na Figura 20. Nesta figura fica evidenciada a ampliação de sinal obtida com a variação negativa do potencial aplicado. Entretanto, optou-se por utilizar o potencial de 0,0 V, pois os sinais obtidos nesta voltagem foram reprodutíveis ($n=3$, $rsd = 6,8\%$) e ainda apresentam amplitude suficiente para a realização da análise. Embora o sinal seja menor, a utilização de potenciais com baixo poder redutor contribui para o aumento da seletividade do método, visto que substâncias com potencial de redução inferiores à 0,0 V não serão reduzidas e conseqüentemente não serão detectadas.

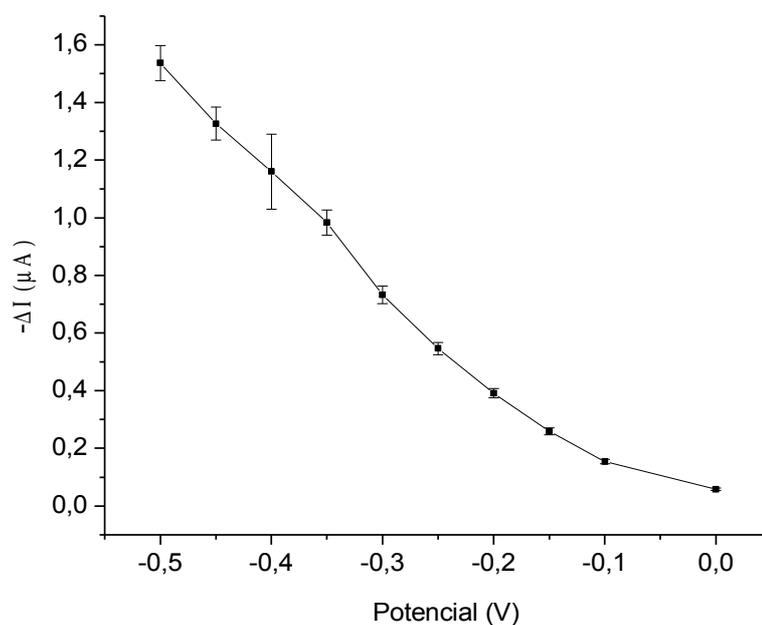


Figura 20. Otimização do potencial (V) que será aplicado no eletrodo de trabalho nos testes amperométricos. (H_2O_2 $50 \mu mol L^{-1}$, $0,9 mL min^{-1}$, EP $500 \mu mol L^{-1}$ em água, $120 \mu L$ amostra)

5.4.2 Concentração de H_2O_2 na solução carreadora

Como pôde ser observado no tópico 5.1, a adição de H_2O_2 na solução carreadora proporciona incremento substancial na atividade catalítica do material, pois é esta a condição básica para que haja a reativação de um sítio catalítico, uma vez que cada molécula de hemina possui apenas um átomo de ferro, que por sua vez é capaz de realizar a troca de um elétron por vez. Para ilustrar melhor esta situação, consideremos hipoteticamente que todas as moléculas de hemina disponíveis para a catálise da reação estejam no estado oxidado (Fe^{4+}). Em seguida, imaginemos que igual quantidade de moléculas de EP em estado reduzido seja inserida no sistema e entre em contato com a hemina e sofram oxidação. O resultado desta etapa é o igual número de moléculas de hemina e EP respectivamente reduzidas e oxidadas. Logo, caso seja feita nova inserção de amostra no sistema sem que as moléculas de hemina sejam re-oxidadas pelo H_2O_2 estas não estarão aptas a realizar nova reação de oxidação, ou seja, o material torna-se inativo.

Considerando as possíveis variações de amplitude de sinal proporcionalmente à concentração de H_2O_2 na solução carreadora realizou-se o

teste de otimização deste parâmetro no intervalo entre 50-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com incrementos de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, totalizando 7 níveis ($n=3$) (Figura 21).

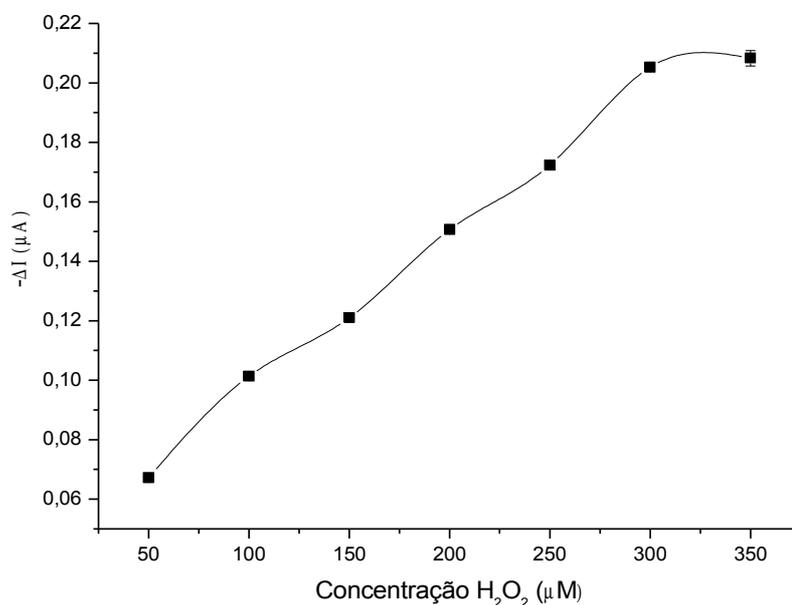


Figura 21. Otimização da concentração de peróxido de hidrogênio na solução carreadora. (vazão 0,9 mL min⁻¹, EP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água, 120 μL amostra, potencial 0,0 V)

O resultado obtido demonstrou que o aumento na concentração de H_2O_2 promove o aumento da amplitude do sinal analítico, ou seja, aumenta a atividade catalítica do material. Esse aumento ocorreu de forma praticamente linear até a concentração de 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e permaneceu estatisticamente igual no próximo nível (350 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Desta forma, adotou-se a concentração de 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como sendo ótima para a realização da análise, pois nesta concentração é possível se obter o máximo rendimento do MIP.

O fato da atividade catalítica permanecer estável em concentrações superiores a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ está relacionado com o número de sítios catalíticos presentes na porção de MIP utilizada na coluna, pois nesta concentração de agente oxidante todos estes sítios foram ativados, o que é traduzido na atividade máxima do material. Por este motivo, incrementos na concentração não fazem sentido, assim como a leitura de amostras com concentração de EP superior a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ também não o são.

Uma alternativa para o aumento da capacidade oxidativa do sistema, ou seja, permitir o aumento do limite superior da concentração da amostra, seria a elevação da quantidade de MIP na minicoluna, que foi de 30,0 mg. Porém, após a

realização de testes com variação de massa de MIP verificou-se que o sistema não suportaria tal elevação devido ao aumento de pressão interna da minicoluna, ocasionando o rompimento das conexões.

Outro fator que foi considerado é a baixa estabilidade química da hemina em concentrações elevadas de H_2O_2 , que pode resultar no rompimento dos anéis planares da porfirina de forma irreversível, o que reduziria a atividade catalítica do material (CHENG; ZHANG; LI, 2004 apud BROWN; DEAN; JONES, 1970; BROWN; HATZIKONSTANTINOU; HERRIES, 1978; HATZIKONSTANTINOU; BROWN, 1978).

5.4.3 Vazão

A influência da vazão utilizada no sistema FIA pode ser notada em dois aspectos: (1) pressão interna do sistema e (2) largura da base do sinal. A pressão do sistema deve ser mantida em tal nível que não provoque o rompimento de conexões, bem como vazamentos. Já a largura da base do sinal não deve ser grande, pois eleva o tempo de análise e reduz a frequência analítica. O aumento no tempo de permanência da EP em contato com o MIP e o peróxido de hidrogênio pode permitir a ocorrência de outras reações com o produto da reação principal, podendo ocorrer assim a formação de sub-produtos desconhecidos e que possam interferir no sinal analítico. Logo, o sistema ideal deve possuir vazão suficiente para proporcionar análise rápida e sem que haja vazamentos. Neste sentido, realizou-se o teste com 5 níveis de vazão ($n=3$) no intervalo entre 0,7 e 1,1 $mL\ min^{-1}$ medidos na saída da coluna, ou seja, verificou-se o fluxo que chega ao eletrodo de trabalho e não somente a velocidade utilizada na bomba peristáltica sem a influência da pressão do sistema.

Verificou-se nesse teste que somente na vazão de 0,7 $mL\ min^{-1}$ houve uma variação estatisticamente significativa ($p<0,05$) com ganho de sinal. Nas demais vazões não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 95%.

Porém, apesar da vazão de 0,7 $mL\ min^{-1}$ ter apresentado o sinal de maior amplitude, a sua base também foi alargada (Figura 22), o que acaba sendo uma desvantagem para o método pelas razões citadas anteriormente. Já os valores mais altos (1,0 e 1,1 $mL\ min^{-1}$) elevaram consideravelmente a pressão interna do sistema,

com grande risco de vazamento. Portanto, adotou-se como valor ótimo a vazão de 0,9 mL min⁻¹.

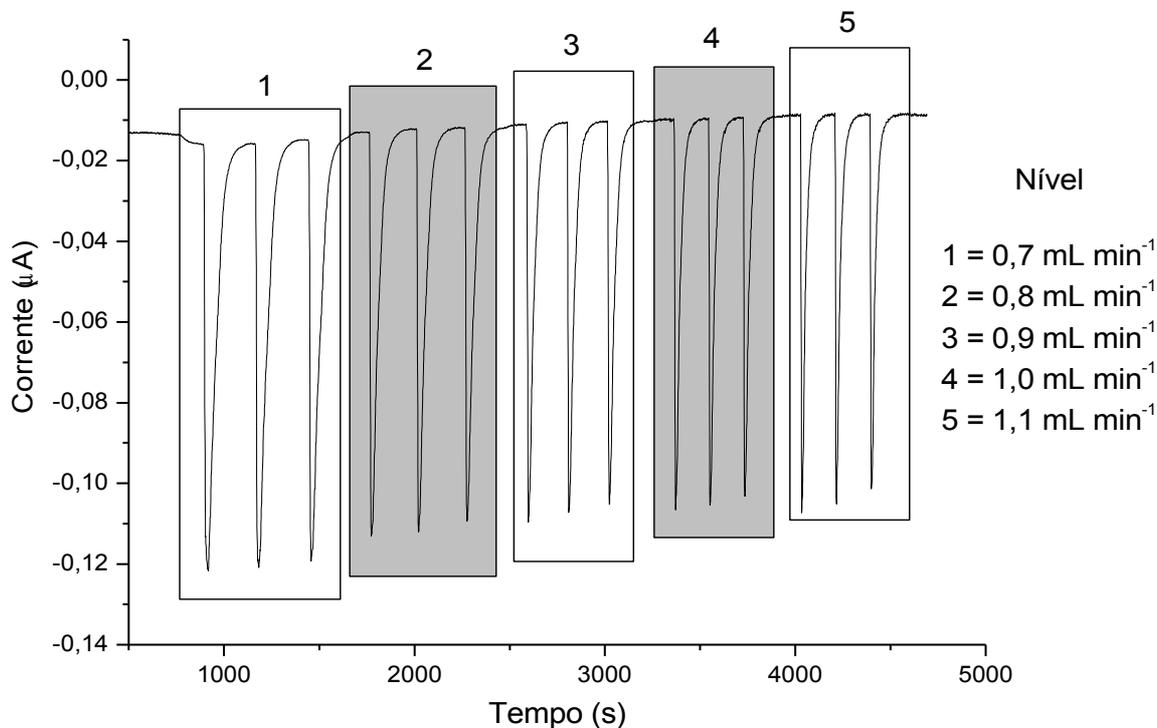


Figura 22. Diagrama do processo de otimização da vazão do sistema FIA. (H₂O₂ 50 µmol L⁻¹, EP 500 µmol L⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V)

5.4.4 Volume de amostra

Conforme citado anteriormente, o volume de amostra é um fator importante para a obtenção de sinais amplificados, pois é diretamente proporcional à quantidade (número de mols) de analito que será inserido no sistema. Para esta análise foram utilizadas alças de amostragem de polietileno (0,8 mm diâmetro interno) de comprimento distinto, adotando-se volumes de 15 a 150 µL. A conversão realizada entre comprimento da alça e o volume correspondente de amostra obedeceu à seguinte relação: 1,0 cm = 5,0 µL.

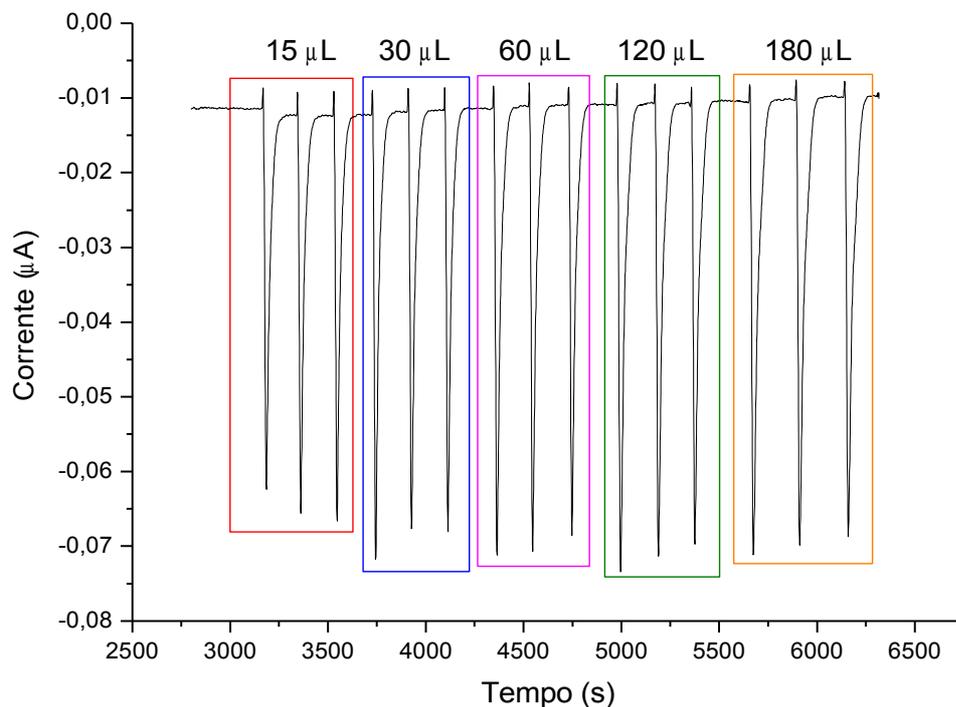


Figura 23. Influência do volume de amostra na resposta analítica. Condições analíticas: H_2O_2 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, EP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água, $120 \mu\text{L}$ amostra, potencial $0,0 \text{ V}$.

O resultado obtido nesse teste demonstrou que o volume de amostra pouco influencia na amplitude do sinal, sendo observada diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% apenas para a alça de $15 \mu\text{L}$ que apresentou sinal de menor amplitude em relação aos demais níveis (Figura 23). A explicação para a inexistência de diferenças entre os diferentes volumes de amostra está relacionada à presença da minicoluna contendo o MIP no trajeto do sistema FIA, o que diferentemente dos sistemas convencionais, permite a homogeneização da amostra com a solução carreadora, permitindo assim que a amostra tenha contato por completo com o H_2O_2 , resultando na diluição da mesma. Desta forma, o fator que toma maior importância é a concentração da solução amostra, conforme será demonstrado mais adiante.

Entretanto, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas entre os volumes de 30 até $180 \mu\text{L}$, adotou-se o volume de $120 \mu\text{L}$ por apresentar no teste a maior amplitude de sinal.

5.4.5 pH da amostra

A utilização de amostras tamponadas e com pH definido é de fundamental importância para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. Portanto, a otimização deste parâmetro foi baseada nos resultados previamente encontrados por Cheng; Zhang; Li (2004), o qual obteve sinais de melhor resposta no pH de 8,3. Foi realizada também a leitura da solução branco para cada valor de pH para posterior subtração da leitura da amostra. Diante deste valor optou-se por realizar a otimização com valores de pH não muito extremos (6,0, 7,0 e 8,0) por dois motivos: (1) o uso de reagentes em excesso (HCl ou NaOH) para ajustar o pH em valores extremos poderia provocar influência direta no processo de oxidação da EP e suprimir a atividade catalítica do MIP, e (2) evitar uma possível degradação da hemina. A concentração do tampão utilizado foi de 0,25 mmol L⁻¹.

O resultado obtido é apresentado na Figura 24, ficando evidente que o método é robusto para diferentes valores de pH (6,0 a 8,0).

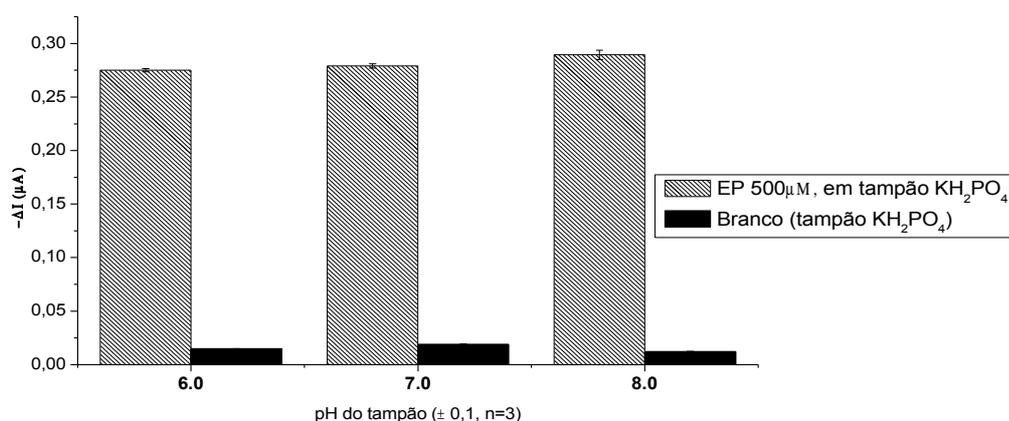


Figura 24. Influência do pH da amostra na resposta analítica. Condições analíticas: H₂O₂ 500 µmol L⁻¹ 0,9 mL min⁻¹, EP 500 µmol L⁻¹ em água, 120 µL amostra, potencial 0,0 V.

Quando feito o cálculo da razão entre a amplitude do sinal da amostra e do branco obteve-se para a amostra em pH 8,0 o maior valor, ou seja, o sinal da amostra foi 24,1 vezes maior que o sinal do branco. Realizando-se a análise estatística obteve-se que a média de amplitude de sinal neste pH foi significativamente diferente dos valores de pH 6,0 e 7,0. Para esta análise estatística utilizou-se os valores obtidos através do seguinte cálculo: ΔI da amostra – ΔI média do branco para o respectivo pH. Desta forma, adotou-se o pH 8,0 como o valor ótimo para o sistema em estudo.

5.4.6 Variação de pH da solução carreadora e uso de tampão na solução carreadora

Conforme citado anteriormente, estes parâmetros foram testados na tentativa de adicioná-los ao processo de otimização do método, entretanto não se obteve sucesso devido às respostas obtidas.

No caso da variação do pH da solução carreadora deve-se considerar que o ajuste de pH em água sem tamponamento é extremamente difícil e instável, não podendo-se garantir a fidelidade do mesmo no momento da análise. Entretanto, não foi possível também realizar o tamponamento da solução carreadora, pois foi observada nesta situação uma forte supressão do sinal analítico (Figura 25) mesmo em concentrações extremamente baixas de tampão tris-HCl e KH_2PO_4 . Comportamento semelhante foi observado por Cheng; Zang; Li (2004). Diante desta situação optou-se por utilizar como solução carreadora apenas água Milli-Q sem nenhum tipo de ajuste de pH com adição de H_2O_2 na concentração desejada.

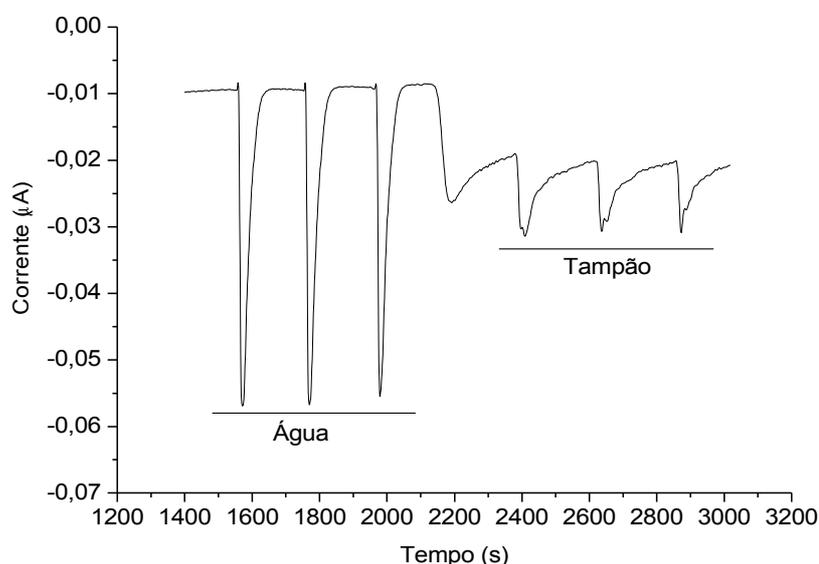


Figura 25. Comparação entre a utilização de solução carreadora tamponada e sem tamponamento (H_2O_2 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, EP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água, $120 \mu\text{L}$ amostra, potencial $0,0 \text{ V}$).

5.4.7 Tipo de tampão

Na escolha do tipo de tampão foram utilizados sais que permitem o tamponamento na faixa de pH 8,0, sendo eles o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e Tris-HCl ([tris(Hidroximetil)aminometano, HCl]), preparados na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

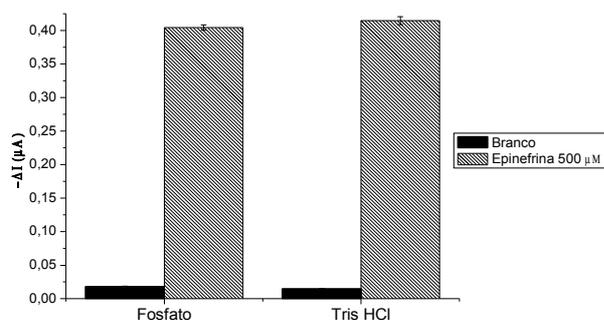


Figura 26. Influência do tipo de tampão sobre a resposta analítica (H_2O_2 $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, $120 \mu\text{L}$ amostra, potencial $0,0 \text{ V}$).

O resultado desse teste (Figura 26) não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as médias de amplitude para os dois tipos de tampão. Entretanto optou-se por dar prosseguimento nos testes utilizando o tampão tris-HCl, conforme realizado por Cheng; Zhang; Li (2004).

5.4.8 Concentração do tampão na amostra

Com o objetivo de verificar possíveis interferências do tampão tris-HCl na amplitude do sinal analítico, conforme foi observado nos testes descritos nos tópicos 5.2.5 e 5.2.7, realizou-se um teste variando-se a concentração da solução branco entre $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

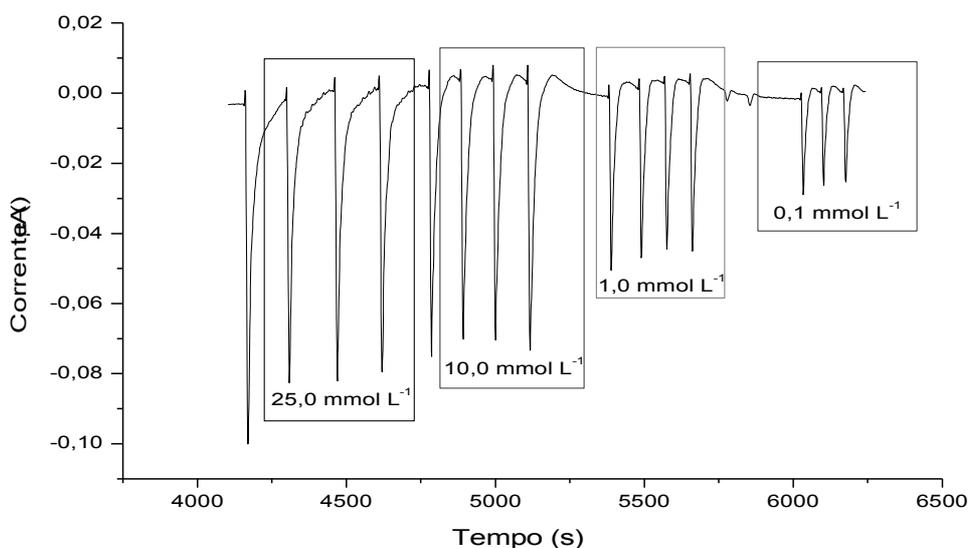


Figura 27. Diagrama do estudo de concentração do tampão (H_2O_2 $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, $120 \mu\text{L}$ amostra, potencial $0,0 \text{ V}$).

A Figura 27 mostra com clareza a geração de sinal devido à concentração do tampão sendo constatado que a concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ apresenta o menor nível de interferência. Sugere-se que o aumento de sinal apresentado por soluções de maior concentração seja gerado pela alteração físico-química provocada no sistema, como alteração de viscosidade, coeficiente de partição, alterações hidrodinâmicas, entre outros, pois não pode-se atribuir este sinal à mecanismos redox no eletrodo, pois o tampão tris-HCl não é eletroativo, ou seja, não pode ser reduzido ou oxidado.

5.4.9 Resumo e aplicação dos parâmetros otimizados

A Tabela 5 demonstra todos os parâmetros otimizados e os respectivos valores obtidos.

Tabela 5. Parâmetros otimizados e os respectivos valores encontrados.

Parâmetro	Valor
Potencial (V)	0,0
Concentração de H_2O_2 no carreador ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	300
Vazão (mL min^{-1})	0,9
Volume de amostra (μL)	120

pH da amostra	8,0
Concentração do tampão da amostra (mmol L ⁻¹)	0,1
Tipo de tampão	Tris HCl

Após a finalização da otimização dos parâmetros que serão utilizados na execução das análises, uma nova comparação entre MIP-MAA e NIP1 foi realizada utilizando-se estes parâmetros. A Figura 28 mostra o resultado obtido nesta comparação que mais uma vez comprova a atividade catalítica aumentada do MIP-MAA, que apresentou amplitude de sinal 2,7 vezes maior que o NIP1, ou seja, após a otimização do método a atividade catalítica do MIP-MAA foi ainda superior que a do NIP1 submetido ao mesmo sistema.

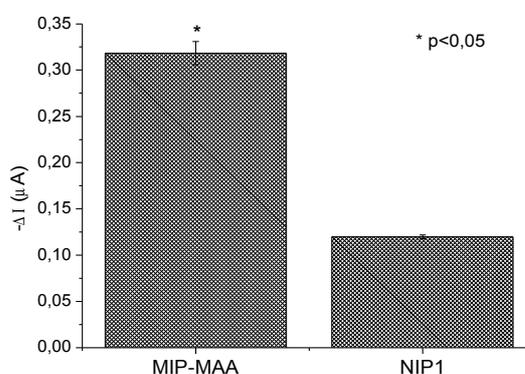


Figura 28. Comparação da atividade catalítica entre MIP e NIP após a otimização do método.

Entre os parâmetros otimizados pode-se atribuir o aumento da amplitude de sinal em relação ao NIP1 principalmente devido ao aumento da concentração de H₂O₂ na solução carreadora para 300 µmol L⁻¹. A isto se atribui o maior número de sítios catalíticos disponíveis no MIP-MAA em relação ao NIP1, pois ficou evidente que desde que seja fornecido agente oxidante suficiente para ativar todos estes sítios, o material irá apresentar sua atividade catalítica máxima.

5.5 Estudo de interferentes

Um dos principais trunfos dos polímeros com impressão molecular é justamente a capacidade de reconhecimento adquirida no momento da síntese. Ótimos resultados têm sido obtidos para vários tipos de moléculas atingindo-se alto

potencial de seletividade. Portanto, foi realizado o estudo de interferentes que possivelmente pudessem ser reconhecidos pelo MIP-MAA devido à composição química e semelhança estrutural com a molécula de EP, podendo sofrer oxidação e gerar sinais analíticos interferentes. Foram testadas também algumas substâncias que não possuem semelhança estrutural, porém são bastante comuns em amostras de diversos tipos e são eletroativas, que é o caso do ácido ascórbico.

O estudo foi realizado injetando-se separadamente diversos tipos de substância (Figura 29) em concentração semelhante à EP ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sob as condições otimizadas apresentadas no tópico 5.2.9.

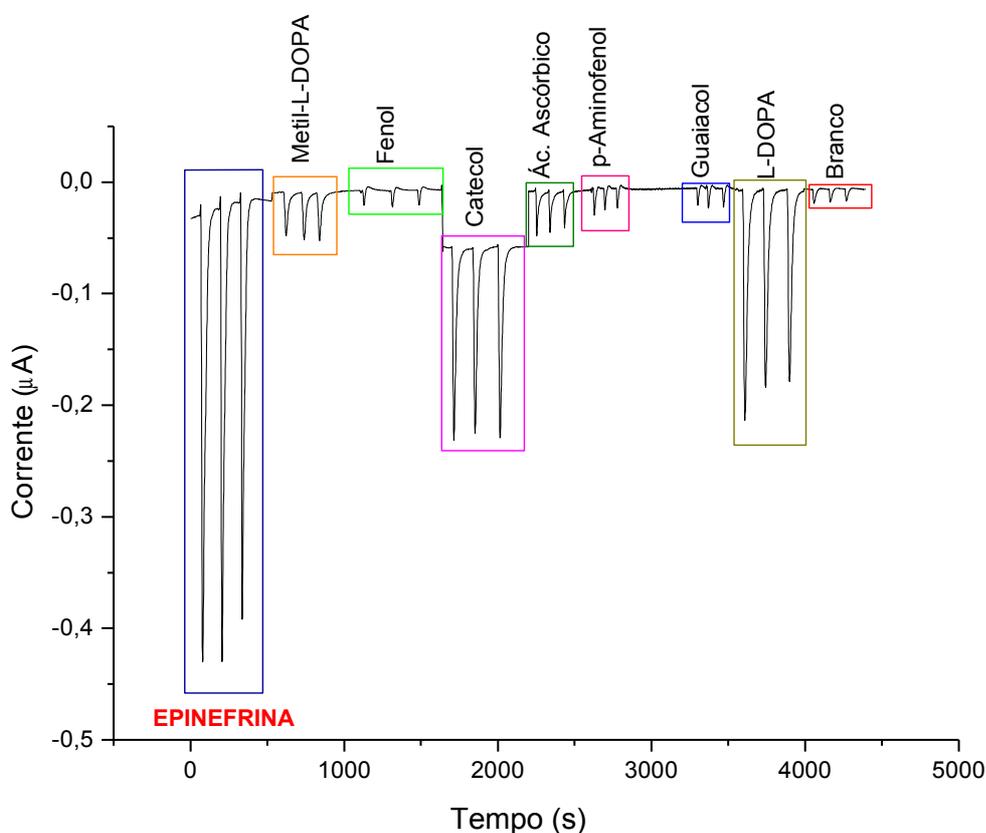


Figura 29. Teste de interferentes realizado com diversas moléculas nas condições otimizadas do sistema.

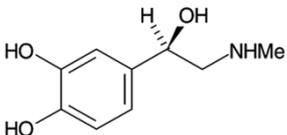
Conforme demonstrado na Tabela 6 o resultado foi bastante satisfatório para as moléculas testadas, pois a maioria delas não representou nível de interferência superior a 10% (fenol, ácido ascórbico, metil-L-dopa, p-aminofenol e guaiacol). Neste grupo de compostos, com exceção do ácido ascórbico, destaca-se a semelhança das moléculas com a EP ou mesmo parte dela. Em relação ao fenol,

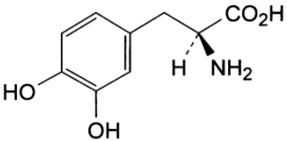
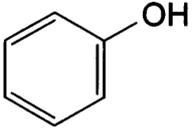
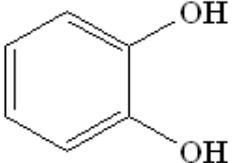
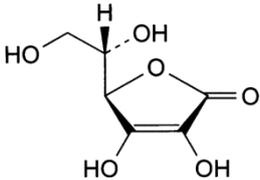
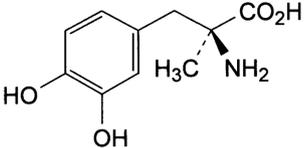
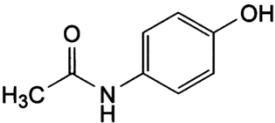
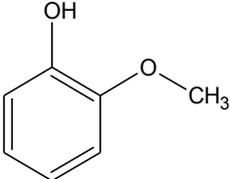
além de possuir uma hidroxila ligada ao anel aromático, também possui estrutura molecular menor que a EP, o que poderia lhe proporcionar certa facilidade de acesso ao sítio catalítico do MIP-MAA, o que não ocorreu. Merecem destaque também a metil-L-dopa, que além de possuir geometria espacial semelhante à EP também possui um anel aromático contendo duas hidroxilas, e o p-aminofenol, que possui uma hidroxila ligada ao anel aromático e um átomo de nitrogênio na cadeia lateral.

Por outro lado, as outras moléculas que foram testadas apresentaram amplitude de sinal superior a 20%, porém em nenhum caso ultrapassou os 45%. Foram elas o catecol e a L-dopa.

Observando-se os dados obtidos para o catecol (40,8%) e a L-dopa (44,9%), foi possível perceber duas características marcantes que estas possuem e que provavelmente estão associadas ao aumento da formação de produto de oxidação. Em relação ao catecol, pode-se dizer que ele é uma parte da molécula de EP, pois é composto por duas hidroxilas ligadas a carbonos adjacentes de um anel aromático e sem cadeia lateral. E é neste cenário que observamos a primeira característica responsável pela formação de produtos de oxidação. A segunda característica importante que foi observada na análise de L-dopa foi a presença de um átomo de nitrogênio na cadeia lateral, porém mais desprotegido estericamente do que o encontrado na metil-L-dopa. Portanto, sugere-se que para uma determinada molécula suplantar as dificuldades impostas pela impressão molecular e se encaixar na cavidade por ela formada, sua estrutura deve não apenas possuir tamanho e composição química semelhantes, mas também a sua estrutura geométrica deve ser a mais próxima possível. Este é mais um indicativo da efetividade da impressão e da existência de cavidades tridimensionais no MIP-MAA.

Tabela 6. Substâncias utilizadas no teste de interferentes.

Composto	Estrutura Molecular	Amplitude de sinal (μA)	Resposta (%)
Epinefrina		0,386	100
L-Dopa		0,173	44,9

			
Fenol		0,0031	0,8
Catecol		0,158	40,8
Ácido ascórbico		0,026	6,6
Metil-L-Dopa		0,029	7,5
p-Aminofenol		0,0092	2,4
Guaiacol		0,0059	1,5

5.5.1 Dopamina

A dopamina (DP) (Figura 30) é uma catecolamina que possui estrutura molecular muito semelhante à EP e atende aos requisitos descritos anteriormente, ou seja, possui um anel aromático com duas hidroxilas ligadas à carbonos adjacentes e o átomo de nitrogênio estericamente mais desprotegido na cadeia lateral. Desta forma ela se apresenta como um possível interferente de grande importância frente à EP.

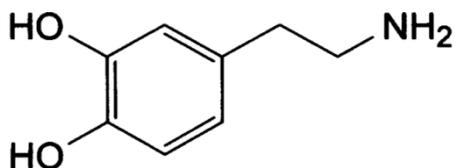


Figura 30. Estrutura molecular da dopamina

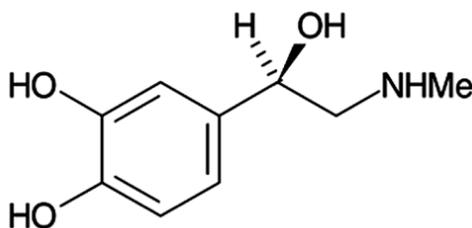


Figura 31. Estrutura molecular da epinefrina

Sendo assim, foi proposto um experimento no qual duas estratégias foram utilizadas: (a) injeções seqüenciais de dopamina utilizando NIP1 e MIP-MAA e (b) injeções intercaladas de EP-DP, em ambos os casos na concentração de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$.

No primeiro teste, utilizando o NIP1, observou-se que o material foi realmente capaz de provocar oxidação da DP, conforme era esperado. Entretanto, de acordo com a Figura 32 pôde-se verificar que o comportamento da DP frente ao NIP1 é distinto daquele observado para a EP, pois a amplitude do sinal aumentava conforme eram feitas inserções seqüenciais da amostra (DP) mantendo-se estável após a terceira injeção. Ao final do fiagrama, entretanto, nota-se que após a injeção de uma amostra de EP a amplitude do sinal retorna ao seu tamanho original para este analito e assim permanece.

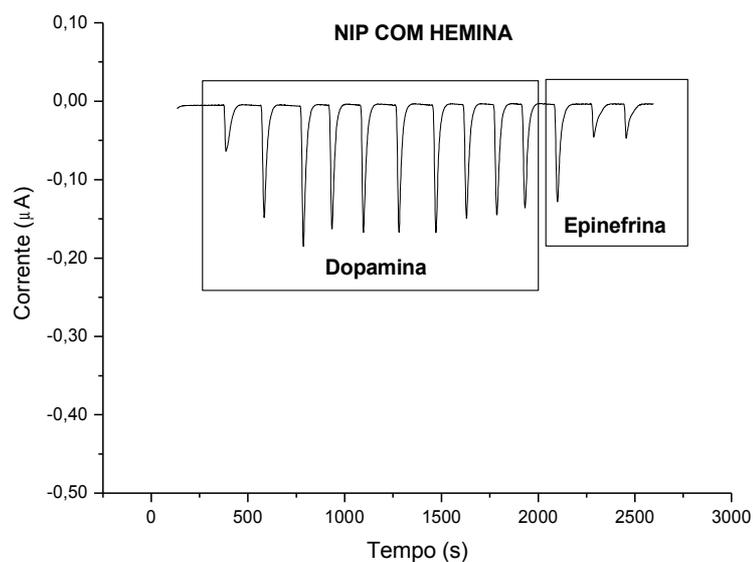


Figura 32. Teste de seletividade do NIP para dopamina (H_2O_2 $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, analito $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água, $120 \mu\text{L}$ amostra, potencial $0,0 \text{ V}$).

O mesmo teste foi realizado utilizando-se o MIP-MAA (Figura 33), e novamente obteve-se comportamento semelhante, porém em amplitude mais elevada. O número de injeções necessárias para a estabilização do sinal de DP em um valor máximo foi maior, sendo atingido apenas na quinta amostra.

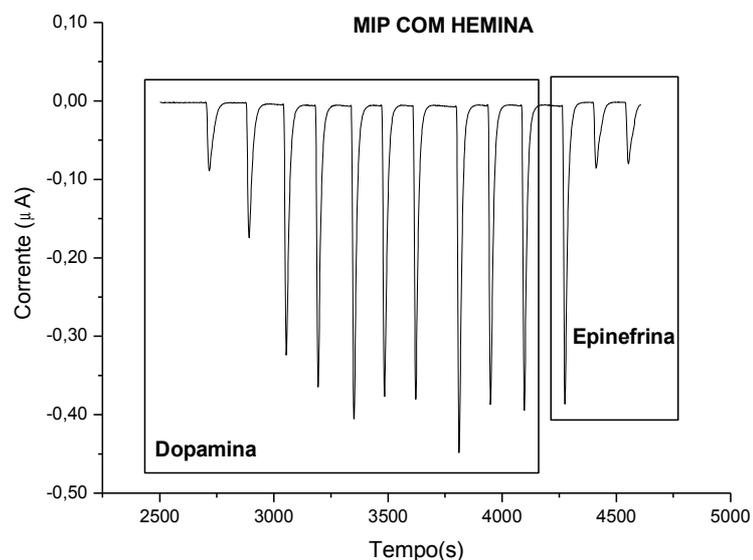


Figura 33. Teste de seletividade do MIP para dopamina (H_2O_2 $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, analito $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água, $120 \mu\text{L}$ amostra, potencial $0,0 \text{ V}$).

Através desses resultados foi possível concluir que o MIP-MAA é capaz de catalisar a oxidação da DP, apesar de esta não ter sido utilizada como template,

mas sim devido a sua semelhança com a EP nos aspectos estéricos e de composição molecular, conforme descritos anteriormente. Como resultado secundário, novamente ficou demonstrado a diferença de amplitude de sinal existente entre o MIP-MAA e o NIP1 e também o comportamento distinto, pois foram necessárias mais injeções de amostra para a estabilização do sinal de DP quando se utilizou o MIP-MAA.

Retiradas estas conclusões pode-se sugerir que ambos os materiais são capazes de realizar a catálise, porém via mecanismos distintos. Como já discutido anteriormente a existência de sítios não-específicos é responsável pela catálise do NIP1, enquanto que no MIP-MAA o que ocorre é o sinergismo entre a catálise realizada por sítios específicos e não-específicos, o que culmina na ampliação do sinal analítico.

Quanto ao comportamento observado de aumento do sinal referente à DP após injeções seqüenciais, atribui-se a falta de reconhecimento molecular como sua causadora, o que ocasionaria a possível retenção da DP em sítios não-específicos por interações diversas com os componentes do material, e que seriam aos poucos oxidados e liberados. Fato este que não ocorre com a EP, pois como é observado, suas injeções seqüenciais permanecem sempre com a mesma amplitude, o que indica o funcionamento correto do mecanismo que foi planejado para o material, ou seja, havendo a presença de cavidade seletiva ativada (oxidada) a EP imediatamente entra em contato com o grupo prostético, é oxidada e segue o fluxo. Este resultado também indica que o MIP-MAA possivelmente possui melhores parâmetros cinéticos para a EP do que para a DP, pois ambas as velocidades de formação do complexo substrato-MIP (v_1) e liberação do MIP + Produto (v_2) são maiores (Equação 1).



Outros dados que suportam esta teoria foram obtidos no teste (b), que intercala a injeção de amostras de EP e DP (Figura 34).

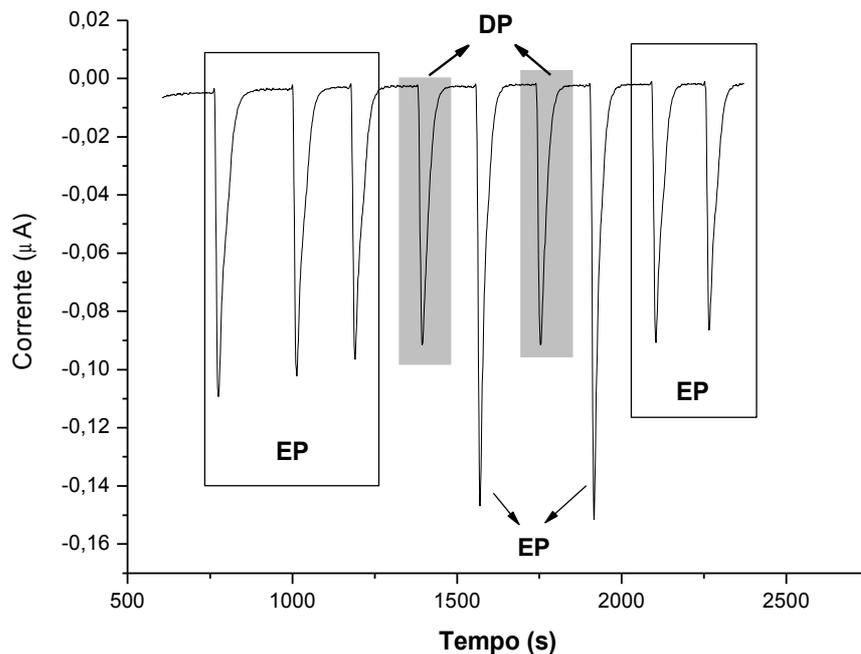


Figura 34. Teste de seletividade para dopamina (H_2O_2 $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, analito $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água, $120 \mu\text{L}$ amostra, potencial $0,0 \text{ V}$).

Neste caso a sequência de injeções foi invertida, sendo iniciada com a injeção de EP (3x) e pela intercalação de DP-EP. Nota-se que a primeira injeção de DP possui a mesma amplitude dos sinais anteriores referentes à EP, indicando que neste momento provavelmente todos os sítios ativos estavam aptos a realizar a catálise, e que apenas parte da DP tenha ficado retida no material. Na sequência, após a injeção de uma amostra de EP o sinal obtido é amplificado em relação ao normal para uma amostra de EP ($500 \mu\text{M}$), o que indica que provavelmente as moléculas de DP que porventura tenham ficado retidas no material tenham sido neste momento deslocadas pela EP, a qual possui maior afinidade com os sítios do material. Este comportamento se mantém constante, e só desaparece no momento que são realizadas duas injeções subsequentes de EP, que neste momento restabelece a amplitude de sinal inicialmente observada para este analito e permanece constante.

5.6 Determinação das figuras de mérito do método analítico

Realizou-se por meio da construção de uma curva analítica de 5 níveis ($n=3$) nas concentrações de 10, 50, 100, 250 e 500 μM de EP utilizando o MIP-MAA como reagente sólido catalítico (Figura 35), a determinação do coeficiente de correlação linear (r), os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD).

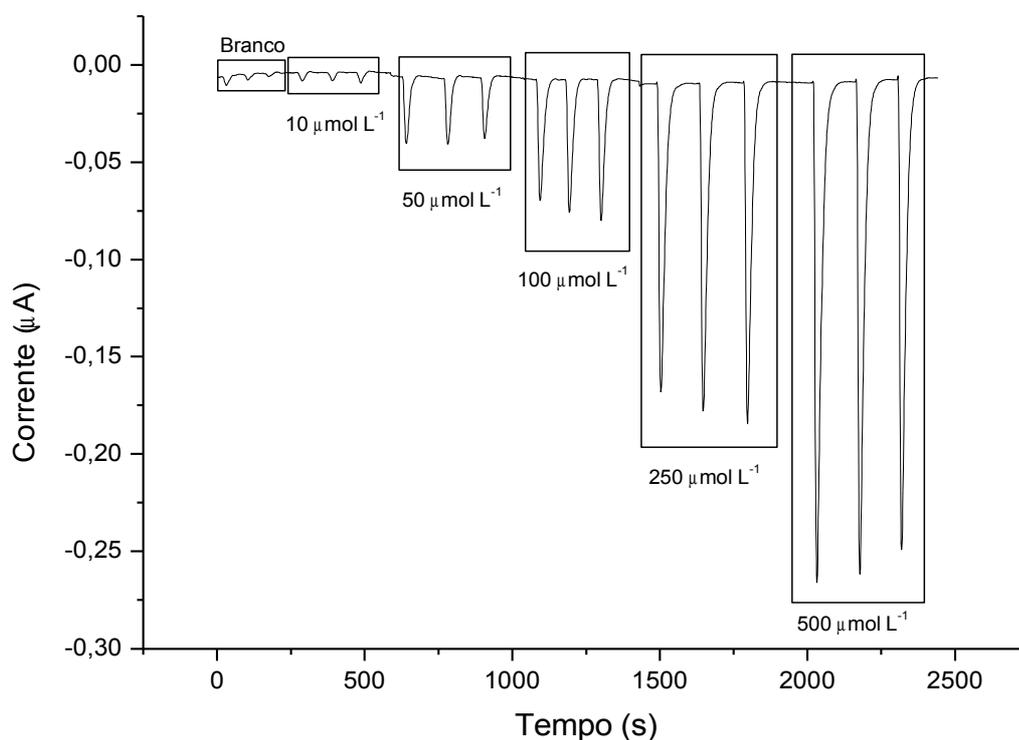


Figura 35. Diagrama obtido com EP no intervalo de concentração entre 10 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (H_2O_2 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 0,9 mL min^{-1} , EP em água, 120 μL amostra, potencial 0,0 V).

Os valores de amplitude de sinal obtidos na curva analítica foram submetidos à análise de regressão linear (Figura 36), sendo determinados o coeficiente de correlação linear ($r=0,9926$), e os valores do coeficiente angular da reta ($b=4,5586 \times 10^{-4}$) e do intercepto ($a=0,02223$). Por meio destes valores foi possível determinar o valor de LD (5,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 0,95 mg L^{-1}) e LQ (17,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 3,19 mg L^{-1}) utilizando as seguintes equações:

$$LD = 3 \times \frac{DP_{\text{branco}}}{b} \quad (\text{Eq. 2}) \quad \text{e} \quad LQ = 10 \times \frac{DP_{\text{branco}}}{b} \quad (\text{Eq. 3}),$$

onde DP_{branco} corresponde ao desvio padrão da amplitude da solução branco (tampão tris-HCl 0,1 mmol L⁻¹, pH 8,0) e b equivale à inclinação da reta.

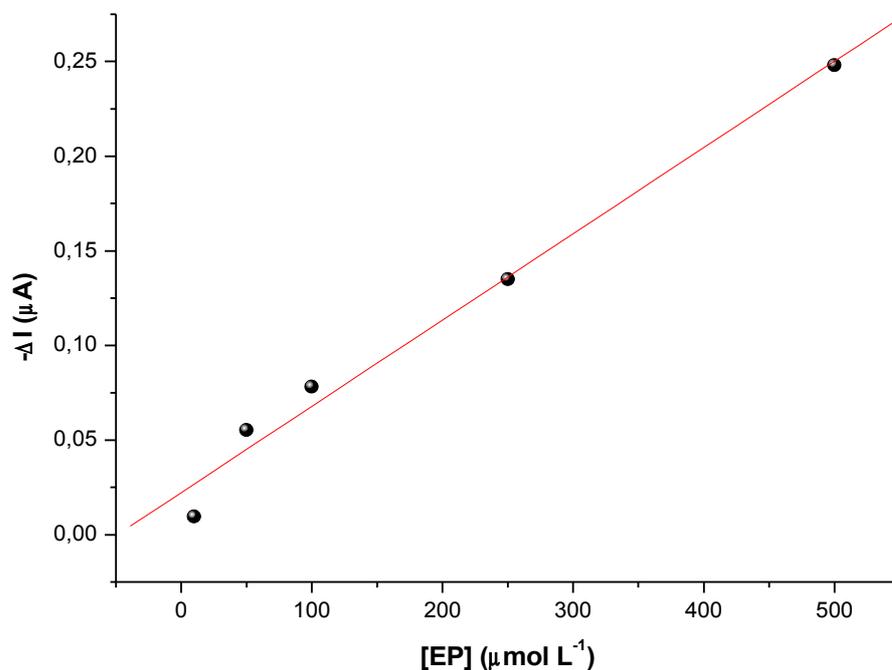


Figura 36. Regressão linear dos valores obtidos na curva analítica para EP ($a=0,02223$, $b=4,55855 \times 10^{-4}$, $r=0,99226$)

Os dados obtidos permitem concluir que:

- O método apresentou linearidade satisfatória para a faixa de concentração testada, o que foi demonstrado pelo valor de $r > 0,99$.
- A faixa linear apresentada permite a utilização do método na determinação de EP nos produtos existentes no mercado, que variam entre 5,0 e 1000,0 mg L⁻¹.

5.7 Aplicação em amostra

O método desenvolvido foi aplicado em amostra do produto farmacêutico DRENALIN® Solução Injetável de hemitartrato de epinefrina 1,0 mg mL⁻¹, lote 070053. Para a realização da análise procedeu-se a diluição da amostra em 20 vezes utilizando solução tampão tris-HCl pH 8,0, obtendo-se a concentração teórica

de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 273,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Por meio da equação da reta obtida ($y=0,02223+0,00045586x$) na calibração do método entre 10 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, foi possível determinar a concentração encontrada na amostra, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação da concentração de EP em amostra farmacêutica.

Variável	Valor
y (μA)	0,139
a	0,02223
b	0,00045586
x ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	256,2
Desvio padrão	0,009963
Desvio padrão relativo (%)	7,0
Concentração teórica (mg mL^{-1})	1,0
Concentração determinada (mg mL^{-1})	0,94 (94%)
Especificação (USP, 2007)	90-115%

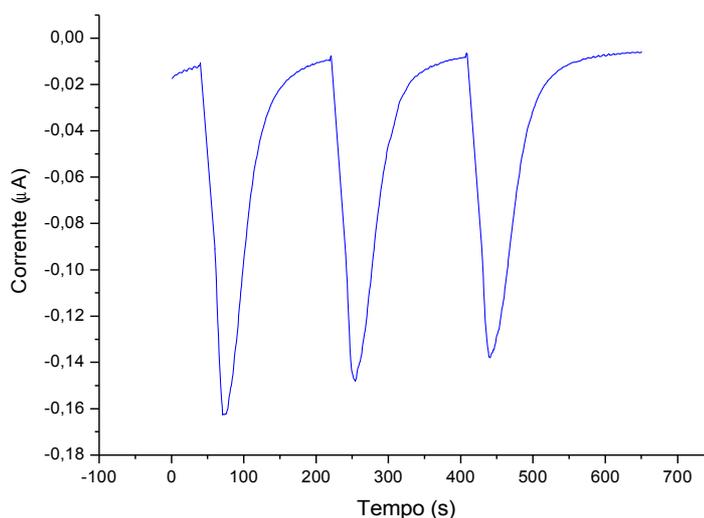


Figura 37. Diagrama obtido na aplicação do método na determinação da concentração de EP em solução injetável.

O resultado obtido demonstrou que o método pode ser utilizado na determinação da concentração de EP em produto farmacêutico dentro das condições preconizadas pela farmacopéia.

5.8 Determinação de parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros de cinética enzimática como constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) são de fundamental importância para a avaliação da qualidade da atividade catalítica, pois é possível quantificar o potencial catalítico do material e desta forma realizar comparações com dados de enzimas naturais.

O comportamento de uma reação enzimática considerando-se a quantidade de enzima (MIP) constante é caracterizado pela variação da velocidade inicial da reação (V_0) conforme a concentração de substrato [S]. No início da reação, quando [S] é baixa, pequenos incrementos de substrato provocam aumento de V_0 de forma praticamente linear. Após certa concentração do substrato, no entanto, o aumento de V_0 fica dificultado, até o momento que não sofrerá mais alterações mesmo que se aumente a [S] (LINEWEAVER; BURK, 1934). Este comportamento característico de reações enzimáticas é também conhecido como perfil Michaelis-Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913), e fornece informações acerca da afinidade entre a enzima e o substrato, bem como a velocidade da reação.

Entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros não é simples e necessita da utilização de ferramentas matemáticas que são capazes de fornecer valores estimados, porém suficientemente próximos do real, uma vez que a determinação absoluta é impossível devido ao perfil hiperbólico apresentado pela relação $V_0/[S]$ em reações enzimáticas, o que torna a curva assintótica, ou seja, estende-se de - infinito a + infinito, sem nunca tocar o eixo horizontal, e portanto a função de x jamais se anula (ANTON; BIVENS; DAVIS, 2005).

Dentre as alternativas possíveis para a determinação do K_m e do V_{max} por meio de manipulação matemática dos dados, a aplicação da linearização da equação de Michaelis-Menten pela equação de Lineweaver-Burk é uma das mais utilizadas em métodos enzimáticos. Neste modelo, a transformação matemática aplicada sobre a equação de Michaelis-Menten é em função de $1/V_0$ e $1/[S]$, logo:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \Rightarrow \quad \frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}, \text{ onde}$$
$$\frac{1}{V_{max}} = a \text{ (coeficiente linear ou intercepto) , e}$$
$$\frac{K_m}{V_{max}} = b \text{ (coeficiente angular)}$$

Porém, a aplicação da equação de Lineweaver-Burk exige um tratamento prévio dos dados analíticos, de tal modo a se obter uma relação entre a amplitude

do sinal obtido e o seu respectivo valor de V_0 , ou seja, deve-se estabelecer uma relação entre a amplitude do sinal analítico e a concentração de substrato. Para tanto, foi construído o gráfico demonstrado na Figura 38, o qual relaciona a proporcionalidade entre a $[S]$ e a densidade de corrente do sinal analítico ($j = \Delta I / \text{área do eletrodo}$), considerando este último fator como representativo da velocidade de reação, ou seja, V_0 . Logo, V_0 equivale ao valor de j para cada concentração de EP.

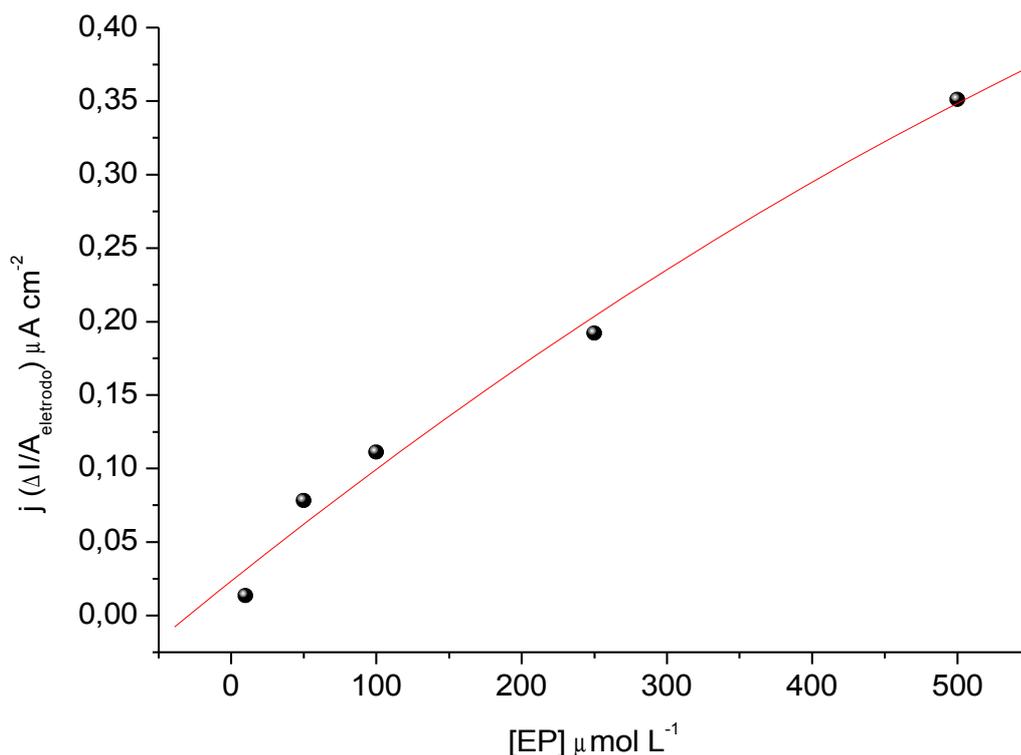


Figura 38. Efeito da concentração de substrato sobre a densidade de corrente.

Deste modo, realizando-se as devidas substituições das incógnitas da equação temos:

$$\frac{1}{j} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[EP]} \Leftrightarrow y = a + bx$$

Por fim, foi construído o gráfico apresentado na Figura 39, o qual permite por meio da regressão linear entre seus pontos, a obtenção dos valores de a e b , os quais são posteriormente utilizados para a obtenção dos valores de V_{\max} e K_m respectivamente, como será mostrado adiante.

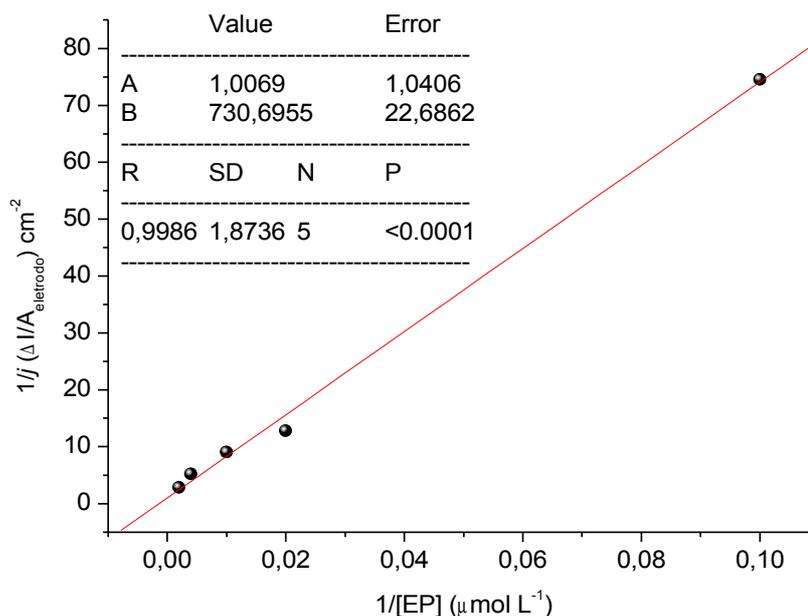


Figura 39. Gráfico de Lineweaver burk para determinação de K_m e V_{max} .

Foi obtida por meio da regressão linear a seguinte equação da reta:

$$Y = 1,0069 + 730,6955X, \text{ que pode ser convertida em}$$

$$\frac{1}{V_0} = 1,0069 + 730,6955 \frac{1}{[S]}, \text{ portanto}$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 1,0069 \Rightarrow V_{max} = 0,9931 \mu\text{A cm}^{-2}, \text{ e}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 730,6955 \Rightarrow K_m = 730,6955 \times 0,9931 = 725,65 \mu\text{mol L}^{-1}$$

Estes dados indicam que a atividade catalítica do material é inferior à de uma enzima natural ($K_m=1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para compostos fenólicos) (SANTOS et al., 2009a), pois o valor bastante superior de K_m ($725,65 \mu\text{mol L}^{-1}$) em relação à enzima natural indica menor afinidade pelo substrato, ou seja, o MIP não é capaz de realizar a catálise da EP em quantidade detectável em concentrações muito baixas de substrato, e o baixo valor de V_{max} indica que a velocidade da reação é lenta, ou seja, a velocidade de formação do complexo ES e da liberação de produto não é consideravelmente alta, o que torna a taxa de conversão do substrato em produto baixa.

Entretanto, apesar destas características, a utilização dos MIP com atividade catalítica pode e deve ser bastante explorada devido ao seu alto poder de reconhecimento molecular e resistência em condições físico-química adversas, que

é traduzido em alta estabilidade do material durante longo período de tempo, seja estocado ou em uso. Outro fator vantajoso na utilização dos MIP em detrimento as enzimas naturais está relacionado ao seu custo inferior e também à possibilidade de síntese *in loco*.

6 CONCLUSÃO

Considerando-se os dados obtidos foi possível concluir que a impressão molecular foi efetiva e determinante no aumento da atividade catalítica do MIP frente ao NIP. Observou-se também que este comportamento só é apresentado quando se utiliza o monômero funcional apropriado, que seja capaz de interagir com o “template” antes da reação de polimerização.

Sugere-se também que o material possui seletividade para a molécula de EP, e que esta é devida à presença de cavidades tridimensionais que possuem afinidade química e são estericamente complementares à mesma.

A caracterização física do material permitiu concluir a existência de diferenças morfológicas entre o MIP e NIP, principalmente na análise de TG, a qual demonstrou a diferença entre os perfis de decomposição destes materiais.

Em relação à otimização do método, pôde-se concluir que os fatores que exercem maior influência sobre a amplitude do sinal analítico são a concentração de H_2O_2 na solução carreadora e o potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Constatou-se também que o tamponamento da solução carreadora suprime o sinal analítico.

Por meio do estudo de interferentes foi possível verificar a existência de relação entre os mecanismos de reconhecimento molecular apresentados pelo MIP e relacioná-los à estrutura e composição das moléculas testadas. A utilização de DP como interferente reforçou a hipótese de que a impressão molecular é efetiva e extremamente responsiva às características do analito “template”.

REFERÊNCIAS

ADAK, S. et al. Mechanism of horseradish peroxidase catalyzed epinephrine oxidation: obligatory role of endogenous O_2^- and H_2O_2 . **Biochemistry**, v. 37, p. 16922-16933, 1998.

ALEXANDER, C. et al. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 2, p. 106-180, 2006.

ALLENDER, C. J. Molecularly imprinted polymers: technology and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p.1731– 1732, 2005.

ANSELL, R. J.; KRIZ, D.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers for bioanalysis: chromatography, binding assays and biomimetic sensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 89-94, 1996.

ANTON, H.; BIVENS, I.; DAVIS, S. **Cálculo**, 8 ed., v. 1, Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2005.

ARSHADY, R.; MOSBACH, K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. **Macromolecular Chemistry and Physics-Makromolekulare Chemie**, Basel, v. 182, n. 2, p. 687-692, 1981.

ASHLEY, S. E. Q.; Spectrophotometric methods in modern analytical chemistry. **Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition**, v. 11, p. 72-79, 1939.

BAGGIANI, C.; ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C. Molecular imprinted polymers: useful tools for pharmaceutical analysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p.219-247, 2006.

BARD, A.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2 ed., New York: John Wiley and Sons, 2001.

BROWN, S. B.; DEAN, T. C.; JONES, P. Catalytic activity of iron(III)-centred catalysts: role of dimerization in the catalytic action of ferrihaems. **Biochemical Journal**, London, v. 117, 741-744, 1970.

BROWN, S. B.; HATZIKONSTANTINOY, H.; HERRIES, D. G. A study of the oxidation of ferrihaems by hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, London, v. 174, p. 901-907, 1978.

BRÜGGEMANN, O. Chemical reaction engineering using molecularly imprinted polymeric catalysts. **Analytica Chimica Acta**, v. 435, p. 197-207, 2001.

CALATAYUD, J. M. **Flow injection analysis of pharmaceuticals: automation in the laboratory**. London: Taylor and Francis, 1996.

CASTILHO, T. J.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase for biogenic amine determinations in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.785-791, 2005.

CHE, X. et al. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on an electrode modified with DNA-L-cysteine-gold-platinum nanoparticles in polypyrrole film. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 167, n. 3/4, p. 159-165, 2009.

CHEN, X.; ZHAO, T.; ZOU, J. A novel mimetic peroxidase catalyst by using magnetite-containing silica nanoparticles as carriers. **Microchimica Acta**, v. 164, p. 93-99, 2009.

CHEN, Z. et al. Molecularly imprinted soluble nanogels as a peroxidase-like catalyst in the oxidation reaction of homovanillic acid under aqueous conditions. **Applied Catalysis A: General**, v.328, p.252-258, 2007.

CHENG, Z.; ZHANG, L.; LI, Y. Synthesis of an enzyme-like imprinted polymer with the substrate as the template, and its catalytic properties under aqueous conditions. **Chemistry: A European Journal**, v. 10, p. 3555-3561, 2004.

CHENG, Z.; LI, Y. The role of molecular recognition in regulating the catalytic activity of peroxidase-like polymers imprinted by a reductant substrate. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 256, p. 9-15, 2006.

CORONA-AVENDAÑO, S. et al. Study on the stability of adrenaline and on the determination of its acidity constants. **Spectrochimica Acta – Part A**, Oxford, v. 61, n. 1/2, p. 305-311, 2005.

CUNLIFFE, D.; KIRBY, A.; ALEXANDER, C. Molecularly imprinted drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1836-1853, 2005.

DAMOS, F. S. et al. Iron(III) tetra-(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrin as a biomimetic catalyst of horseradish peroxidase on the electrode surface: An amperometric sensor for phenolic compound determinations. **The Analyst**, London, v.128, p. 255-259, 2003.

DAVIS, M. E.; KATZ, A.; AHMAD, W. R. Rational catalyst design via imprinted nanostructured materials. **Chemistry of Materials**, Washington, v.8, n. 8, p.1820-1839, 1996.

DEVLIN, T. M. Enzymatic methods in analytical chemistry. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 977- 981, 1959.

EFENDIEV, A. A.; KABANOV, V.A. Selective polymer complexons prearranged for metal ions sorption. **Pure and Applied Chemistry**, v.54, p.2077-2092, 1982.

FISCHER, E. Ueber die optischen isomeren des traubenzuckers, der gluconsäure und der zuckersäure. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, Weinheim, v. 23, n. 2, p. 2611-2624, 1890.

GARCIA MATEO, J. V.; KOJIO, A. Flow-injection biamperometric determination of epinephrine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1821-1828, 1997.

HAMID, M.; REHRMAN, K. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v.115, p. 1177-1189, 2009.

HATZIKONSTANTINO, H.; BROWN, S. B. Decomposition of hydrogen peroxide catalysed by mesoferrihaem, deuteroferrihaem, coproferrihaem and haematoferrihaem. **Biochemical Journal**, London, v. 174, p. 893-900, 1978.

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M. **Compendium of analytical nomenclature**, 3 ed., Durham: Blackwell Science, 1998. Cap. 8.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Glossary of basic terms in polymer science, **Pure Applied Chemistry**, v. 68, p. 2287-2311, 1996.

JEYKUMARI, D. R. S.; NARAYANAN, S. S. Fabrication of an amperometric bienzyme biosensing system with neutral red functionalized carbon nanotubes. **The Analyst**, London, v. 134, p. 1618–1622, 2009.

KAPLAN, N. O. **Methods of enzymology**, New York: Academic Press, 1957.

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

KIM, D. C.; JANG, A-R.; KANG, D. J. Biological functionality of active enzyme structures immobilized on various solid surfaces. **Current Applied Physics**, v. 9, p.1454–1458, 2009.

KITAMURA, Y. et al. Catalytic activity of silica gels bound manganese(III)–porphyrin on oxidative reaction of adrenaline. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 500-502, 2007.

LAMPE, I.; SCHULTZE, D.; ZYGALSKY, F. Thermal degradation of poly(methacrylic acid) and Y–Ba–Cu polymethacrylate precursors for the preparation of high temperature superconductors. **Polymer degradation and stability**, v. 73, n. 1, p. 87-92, 2001.

LAKSHMI, D. et al. Electrochemical sensor for catechol and dopamine based on a catalytic molecularly imprinted polymer-conducting polymer hybrid recognition element. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, n. 9, p.3576-3584, 2009.

LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F. R. P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 337-341, 2004.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

LISDAT, F. et al. Catecholamine detection using enzymatic amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, London, v. 12, n. 12, p. 1199-1211, 1997.

MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 370, p.795–802, 2001.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M.L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochem. Z.**, v. 49, p. 333–369, 1913.

MIKA, A.; LUTHJE, S. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 132, p. 1489–1498, 2003.

MISHRA, A. et al. Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine by high performance liquid chromatography. **Scientia Pharmaceutica**, Vienna, v. 77, p. 367-374, 2009.

MOSBACH, K.; HAUPT, K. Some new developments and challenges in noncovalent molecular imprinting technology. **Journal of Molecular Recognition**, v. 11, p. 62–68, 1998.

NAVES, A. F.; **Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo/ Programa de Pós-graduação em Química, 2008.

PASSOS, M. L. C. et al. Enzymatic oxidation in aqueous and micellar media based on horseradish peroxidase–hydrogen peroxide system using a SIA manifold. **Talanta**, v. 77, p. 484–489, 2008.

PAULING, L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, p. 2643-2657, 1940.

PEREIRA, F. C. et al. Aplicações de nanoeletrodos como sensores na química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1054-1060, 2006.

PICHON, V.; CHAPUIS-HUGON, F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 48-61, 2008.

PILETSKY, S. A. et al. Molecularly imprinted polymers – tyrosinase mimics. **The Ukrainian Biochemical Journal**, v.77, n. 6, p. 63-67, 2005.

PRESCOTT, A. B. Certain distinct advances in the analytical chemistry of recent years. **Advances in Analytical Chemistry**, p. 376-379, 1893.

QIAO, F. et al. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. **Chromatographia**, v.64, p. 625-634, 2006.

RAGGI, M. A. et al. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 730, n. 2, p. 201–211, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**, 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

RISHI, L. et al. Enzymatic determination of vitamin A in pharmaceutical formulations with spectrophotometric detection. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v. 72, p. 989–993, 2009.

SAGI, A.; RISHPON, J.; SHABAT, D. Amperometric assay for aldolase activity: antibody-catalyzed ferrocenylamine formation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, p. 1459-1461, 2006.

SALAMONE, J. C. **Polymeric materials encyclopedia**. v.4, p. 2595, Boca Raton: CRC Press, 1996.

SALOMON, L. L.; JOHNSON, J. E. Enzymatic microdetermination of glucose in blood and urine. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, p. 453-456, 1959.

SANTOS, W. J. R. et al. A catalytically active molecularly imprinted polymer that mimics peroxidase based on hemin: application to the determination of p-aminophenol. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, p. 1919-1929, 2007.

SANTOS, W. J. R. et al. Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. **Journal Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 20, p. 820-825, 2009a.

SANTOS, W. J. R. et al. T. Synthesis and application of a peroxidase-like molecularly imprinted polymer based on hemin for selective determination of serotonin in blood serum. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 631, p.170–176, 2009b.

SCHACHAT, R.E.; BECKER, E.I.; MCLAREN, A.D. Enzyme models I: the preparation of some artificial carboxylases. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 16, n. 8, p. 1349-1355, 1951.

SCHACHAT, R.E.; BECKER, E.I.; MCLAREN, A.D. Enzyme models II: the kinetics of an artificial carboxylase catalysis. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 56, n. 6, p. 722-726, 1952.

SDBSWeb : <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 22/01/2009)

SELLERGREN, B.; GERMANY, M. Noncovalent molecular imprinting: antibody-like molecular recognition in polymeric network materials. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 16, p. 310-320, 1997.

SILVA, F.R.O. et al. Analytical quantification of low-density lipoprotein using europium tetracycline indicator. **Luminescence**, Chichester, v. 24, n. 3, p. 189-193, 2009.

SVENSON, J. et al. Spectroscopic studies of the molecular imprinting self-assembly process. **Journal of Molecular Recognition**, Chichester, v. 11, p. 83-86, 1998.

TAKEUCHI, T.; MATSUI, J. Molecular imprinting: an approach to "tailor-made" synthetic polymers with biomimetic functions. **Acta Polymerica**, Weinheim, v. 47, p. 471-480, 1996.

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

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. parte 2: aplicações de MIP ("molecularly imprinted polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, São Paulo, v.28, p. 1087-1101, 2005b.

VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. **The Analyst**, London, v. 123, p. 1809-1812, 1998.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, 2 ed., New York: Wiley-VCH, 2000.

WANG, Q.; LU, G.; YANG, B. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized on carbon paste electrode by silica sol-gel film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 10, p. 1269-1275, 2004.

WHITCOMBE, M. J.; MARTIN, L.; VULFSON, E. N. Predicting the Selectivity of Imprinted Polymers. **Chromatographia**, v. 47, n. 7/8, 1998.

WHITCOMBE, M. J.; VULFSON, E. N. Imprinted polymers. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 13, n. 7, p. 467-478, 2001.

WULFF, G.; SARHAN, A. Über die anwendung von enzymanalog gebauten polymeren zur racemattrennung. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 84, n. 8, p. 364, 1972.

WULFF, G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, n. 1, p. 1-27, 2002.

WULFF, G.; CHONG, B-O; KOLB, U. Soluble single-molecule nanogels of controlled structure as a matrix for efficient artificial enzymes. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 45, n. 18, p. 2955-2958, 2006.

YAO, H. et al. Selective determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid and uric acid by electrocatalytic oxidation at poly(eriochrome black T) film-modified glassy carbon electrode. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 23, n. 6, p. 677-682, 2007.

YE, L.; MOSBACH, K. Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 20, n. 3, p. 859-868, 2008.

ZHU, R.; KOK, W. T. Determination of catecholamines and related compounds by capillary electrophoresis with postcolumn terbium complexation and sensitized luminescence detection. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, n. 19, p. 4010-4016, 1997.