



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JHESSICA DE CÁSSIA MENDONÇA

**SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO
PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA E
DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA EM SISTEMA FIA
UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM
MWCNT/NAFION[®]/Ni(OH)₂**

JHESSICA DE CÁSSIA MENDONÇA

**SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO
PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA E
DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA EM SISTEMA FIA
UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM
MWCNT/NAFION[®]/Ni(OH)₂**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo
Teixeira Tarley

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Gava
Segatelli

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mendonça, Jhessica de Cássia.

Síntese de polímero molecularmente impresso para pré-concentração de sarcosina e determinação eletroquímica em sistema FIA utilizando eletrodo impresso modificado com MWCNT/Nafion®/Ni(OH)₂ / Jhessica de Cássia Mendonça. - Londrina, 2019.
140 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.

Coorientador: Mariana Gava Segatelli.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Biomarcador de câncer - Tese. 2. Aminoácido - Tese. 3. MIP - Tese. 4. SPE - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira. II. Segatelli, Mariana Gava. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

JHESSICA DE CÁSSIA MENDONÇA

**SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO PARA
PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA E DETERMINAÇÃO
ELETROQUÍMICA EM SISTEMA FIA UTILIZANDO ELETRODO
IMPRESSO MODIFICADO COM MWCNT/NAFION[®]/Ni(OH)₂**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira
Tarley
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Marcela Zanetti Corazza
Universidade Federal da Grande Dourados –
UFGD

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de maio de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais que, com muito esforço e sacrifício, permitiram que eu chegasse até este momento e que me tornasse a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à Santa Rita de Cássia por me ampararem nos momentos difíceis, mostrarem o caminho nas horas incertas e por me proporcionarem condições para realizar este trabalho.

Ao meu professor, orientador e amigo, Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley, agradeço pela constante orientação neste trabalho, pela sua forma de transmitir todo conhecimento e experiência durante toda esta etapa, mas sobretudo pela sua amizade e confiança durante esses dois anos.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Mariana Gava Segatelli, agradeço pelo apoio, amizade e toda contribuição científica para execução deste trabalho.

Aos meus pais, Benedito Pereira de Mendonça e Maria Luiza de Mendonça, pelo carinho e amor. Agradeço por sempre confiarem em mim e pelo apoio incondicional durante os cinco anos de graduação e os dois anos de mestrado. Com vocês aprendi sobre responsabilidade e respeito. Sem vocês não teria chegado até esta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Juliane Aparecida Mendonça e Benedito Pereira de Mendonça Júnior. Agradeço todo o incentivo, cuidado e amor durante toda a minha vida, e principalmente todo o apoio nesses dois anos. Obrigada por sempre cuidarem de mim e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

Às três princesas da minha vida, minhas sobrinhas, Larissa Mendonça Albertin, Cecília Mendonça Marin e Giovana Galatti Mendonça. A chegada de vocês em minha vida me ensina sobre coração, afeto e entrega. Agradeço por me incentivarem a ser uma mulher melhor a cada dia e buscar ser um exemplo para vocês.

À minha cunhada Gisele Galatti de Mendonça e ao meu cunhado Jonas Marin, por todo apoio e incentivo durante esta etapa.

Às lindas do potenciostato, Luana Rocha e Tainara Capelari. Agradeço pela força, confiança e conhecimento compartilhado durante esses dois anos de mestrado. A amizade e o apoio de vocês foram essenciais para a realização deste trabalho. Obrigada pelas gordices, filmes, risadas, alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Deus nos uniu para apoiar uma a outra e para crescermos juntas. E saibam que enquanto a amizade vive em um coração, os verdadeiros amigos jamais

se separarão.

Aos meus amigos Fábio Cajamarca, Maiyara Prete, Juliana Casarin e Eduardo Duarte, agradeço pela amizade, apoio, incentivo, momentos e conhecimentos compartilhados durante esses anos de mestrado. A amizade e o carinho de vocês foi muito importante durante essa caminhada. Obrigada por me proporcionarem muitos momentos de alegria e por se tornarem amigos que levarei para vida toda.

Agradeço também aos meus amigos do grupo Leandro Luan, Alexandra Beal, Fernanda Midori e Guilherme Sheel. Agradeço por toda experiência e conhecimento compartilhado, e pela amizade construída durante os dois anos de mestrado.

Aos meus colegas do grupo, Pedro Nunes, Gabriel Marques, Leonardo Lemes, Luciane Efftting, Milena Prado, Daniel Nanicuaca, Fernanda Garcia e Dayana Moscardi. Agradeço por todo o auxílio e companheirismo durante esses dois anos de trabalho.

Aos meus amigos da graduação Ana Paula Eisele, Michele Barbosa, Meilyn Ferreira, Carlos Bazoni, Bruno Noronha, Regina Haas e Lissa Mei. Agradeço pela amizade, companheirismo, força e carinho. Vocês me ajudaram muito durante todos esses sete anos.

Às minhas amigas de longa data, Luana Massucato, Isabela Passos, Marilice Marson, Priscila Rocha, Lídia Garcia, Gleice Alves e Neiva Gerioni. Agradeço pelo incentivo, paciência e pelo apoio constantes.

Às técnicas de laboratório Dalva Iamamura e Ana Peretti, pelos bons momentos compartilhados, quitutes e conversas.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica – INCTBio, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela bolsa de mestrado.

À todos os professores que passaram pela minha vida, por todo incentivo, exemplo profissional e conhecimentos passados.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina – UEL, por ser a minha segunda casa durante toda a graduação e mestrado, e aos Laboratórios de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMBM-UEL) e Laboratório de Espectroscopia (ESPEC-UEL) pelas análises realizadas.

À todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”
Eclesiastes 3:1.*

MENDONÇA, Jhessica de Cássia. **Síntese de Polímero Molecularmente Impresso para Pré-concentração de Sarcosina e Determinação Eletroquímica em Sistema FIA Utilizando Eletrodo Impresso Modificado com MWCNT/Nafion®/Ni(OH)₂**. 2019. 140 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A sarcosina, uma molécula presente naturalmente no organismo humano, tem sido considerada como um biomarcador para o rastreamento do câncer de próstata. Assim, o desenvolvimento de um método simples, de baixo custo e seletivo torna-se interessante para a determinação desta molécula em urina visando a detecção precoce da doença. No presente trabalho, foi desenvolvido um método analítico baseado na pré-concentração *off-line* de sarcosina empregando um polímero molecularmente impresso e determinação cronoamperométrica em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizando um eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion®/Ni(OH)₂. Os parâmetros associados ao sistema FIA em linha única, bem como aqueles relativos à modificação do sensor impresso foram otimizados visando a obtenção de maior sinal analítico para sarcosina. As condições otimizadas do sistema FIA foram, volume de amostra de 121,0 µL e solução carregadora NaOH 0,05 mol L⁻¹ com uma vazão de 2,0 mL min⁻¹, ao passo que o melhor desempenho do sensor foi obtido aplicando um potencial de 0,7 V vs Ag/AgCl, utilizando uma suspensão de 2,0 mg mL⁻¹ de MWCNT e 10,0 mmol L⁻¹ de sulfato de níquel depositado eletroquimicamente sobre a superfície de MWCNT para a modificação do eletrodo. Com as condições eletroquímicas e do sistema FIA otimizadas, a detecção de sarcosina foi realizada obtendo um limite de quantificação (LQ) de 62,0 µmol L⁻¹. Em face da detectabilidade do método eletroquímico ser ainda insuficiente para determinação de sarcosina em urina de pacientes com câncer de próstata, fez-se necessária a implementação de uma etapa de pré-concentração. Com intuito de promover melhorias na seletividade do método de pré-concentração um polímero molecularmente impresso (MIP) foi utilizado. O polímero sintetizado foi denominado poli(ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico-co-vinilpiridina) (MIP-AMPS-VP) e caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), fisissorção de gás N₂ à 77 K e análise elementar. Estudos de sorção mostraram maior seletividade do material impresso para sarcosina quando comparado com o material controle (NIP-AMPS-VP), sendo um indicativo do efeito de impressão química no material. O polímero impresso foi utilizado como sorvente para pré-concentração em fase sólida (SPE) de sarcosina. O método apresentou faixa linear de 3,2 até 25,0 µmol L⁻¹ (R² = 0,995), o fator de enriquecimento foi de 50,6, e demonstrou maior seletividade para sarcosina quando comparado com glicina, alanina, prolina e ureia. A aplicabilidade do método foi realizada em amostras de urina sintética obtendo recuperação satisfatória (95-108%) sem efeitos de matriz. Além disso, o método desenvolvido mostrou seletividade para sarcosina na presença de altas concentrações de glicina em amostras de urina sintética.

Palavras-chave: Biomarcador de câncer. MIP. Urina sintética. Aminoácido.

MENDONÇA, Jhessica de Cássia. **Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer for Sarcosine Preconcentration and Electrochemical Determination in FIA System Using MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂-modified Screen-Printed Electrode.** 2019. 140 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Sarcosine, a naturally occurring molecule in the human body, has been considered as an biomarker for the screening of prostate cancer. Thus, the development of a simple, low cost and selective method becomes interesting for the determination of this molecule in urine for the early detection of the disease. In the present work, an analytical method based on the *off-line* preconcentration of sarcosine using a molecularly imprinted polymer and chronoamperometric determination in flow injection analysis system (FIA) using a modified carbon electrode with MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ was developed. The parameters associated to the single-line FIA system as well as those related to the modification of the screen-printed sensor were optimized in order to obtain a higher analytical signal for sarcosine. The optimized conditions of the FIA system were, 121.0 μL sample volume and 0.05 mol L⁻¹ NaOH carrier solution with a 2.0 mL min⁻¹ flow rate, while the best sensor performance was obtained by applying a potential of 0.7 V vs Ag/AgCl and using a suspension of 2.0 mg mL⁻¹ of MWCNT and 10.0 mmol L⁻¹ of nickel sulfate deposited electrochemically on the MWCNT surface for electrode modification. By using the optimized FIA and electrochemical conditions, the detection of sarcosine was achieved obtaining limit of quantification (LQ) of 62.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. In view of the detectability of the electrochemical method being insufficient for the of sarcosine determination in the urine of patients with prostate cancer, it was necessary to implement a preconcentration step. In order to promote improvements in the selectivity of the preconcentration method a molecularly imprinted polymer (MIP) was utilized. The polymer was synthesized as poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic-co-vinylpyridine) (MIP-AMPS-VP) and characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TG), scanning electron microscopy (SEM), N₂ physisorption at 77 K and elemental analysis. Sorption studies showed greater selectivity of the imprinted material toward sarcosine when compared to the control material (NIP-AMPS-VP), being an indication of chemical imprinting effect on the material. The imprinted polymer was used as a sorbent for solid preconcentration (SPE) of sarcosine. The method showed linear range from 3.2 up to 25.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0.995$), the enrichment factor was 50.6, and the method demonstrated greater selectivity for sarcosine when compared to glycine, alanine, proline and urea. The applicability of the method was performed in synthetic urine samples obtaining satisfactory recovery (95-108%) without matrix effects. In addition, the developed method showed selectivity toward sarcosine in the presence of high concentrations of glycine in synthetic urine samples.

Keywords: Cancer biomarker. MIP. Synthetic urine. Amino acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da sarcosina.....	25
Figura 2 – Esquema representativo do metabolismo de sarcosina.....	32
Figura 3 – Reação de derivatização para sarcosina empregando ninidrina.....	33
Figura 4 – Representação esquemática do processo de síntese dos MIP.....	41
Figura 5 – Estrutura química dos monômeros funcionais mais utilizados na síntese de MIP.	42
Figura 6 – Estrutura química dos agentes de ligação cruzada normalmente empregados na síntese de MIP.	44
Figura 7 – Estrutura química dos iniciadores radicalares usualmente utilizados na síntese de MIP.	45
Figura 8 – Representação do processo de SPE.	49
Figura 9 – Eletrodo impresso de carbono.	56
Figura 10 – Esquema representativo do preparo do sensor.	58
Figura 11 – Representação da detecção eletroquímica em sistema FIA. (1) Bomba peristáltica, (2) injetor, (3) entrada de soluções, (4) saída de soluções, (5) célula eletroquímica de fluxo e eletrodo, (6) detector.....	59
Figura 12 – Fotografia da célula eletroquímica de fluxo: (1) entrada da solução carregadora (NaOH)/amostra, (2) saída da solução carregadora/amostra e (3) eletrodo impresso de carbono.	59
Figura 13 – Fotografia do sistema de banho de óleo contendo o frasco reacional.....	61
Figura 14 – Representação esquemática da síntese do polímero MIP-AMPS-VP.....	62
Figura 15 – Representação do sistema de extração <i>off-line</i> para sarcosina com posterior detecção eletroquímica empregando sistema FIA.....	65
Figura 16 – Representação do sistema de pré-concentração <i>off-line</i> para sarcosina com posterior detecção eletroquímica empregando sistema FIA.	66

Figura 17 – Micrografias eletrônicas de varredura do eletrodo impresso de carbono não modificado com ampliações de (A) 45, (B) 400, (C) 6000 e (D) 50000 vezes.	72
Figura 18 – Micrografias eletrônicas de varredura do eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ com ampliações de (A) 45, (B) 400, (C) 6000 e (D) 50000 vezes.....	73
Figura 19 – Espectro de EDS para o eletrodo impresso de carbono não modificado (A) e para o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ (B).	74
Figura 20 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo impresso de carbono não modificado, modificado com MWCNT/Nafion [®] , modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ e modificado apenas com Ni(OH) ₂ , na ausência de sarcosina. Condições: Eletrólito NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , 100 mV s ⁻¹ , 20° ciclo. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion [®] foi de 2,0 mg mL ⁻¹	76
Figura 21 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo impresso de carbono não modificado e modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ na ausência e na presença de sarcosina. Condições: Eletrólito NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , 100 mV s ⁻¹ , 3° ciclo. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion [®] foi de 2,0 mg mL ⁻¹	77
Figura 22 – Representação das etapas do sistema FIA e registro do sinal analítico para o (A) branco analítico e para a (B) solução de sarcosina.	78
Figura 23 – Diagramas em solução carregadora NaOH 0,1 mol L ⁻¹ com vazão de 1,2 mL min ⁻¹ utilizando o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ para o branco no potencial de 0,7 V e para sarcosina 1,12 mmol L ⁻¹ nos potenciais de 0,3; 0,6 e 0,7. Volume de injeção: 121,0 µL. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion [®] foi de 2,0 mg mL ⁻¹	79

Figura 24 – Diagramas utilizando o eletrodo impresso de carbono modificado com Nafion [®] 1,0%, MWCNT/Nafion [®] e MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ para sarcosina 1,12 mmol L ⁻¹ no potencial de 0,7 V. Solução carregadora NaOH 0,1 mol L ⁻¹ com vazão de 1,2 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 121,0 µL. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion [®] foi de 2,0 mg mL ⁻¹	81
Figura 25 – Diagramas utilizando o eletrodo impresso de carbono não modificado e eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ utilizando a suspensão MWCNT/Nafion [®] de 1,0 mg mL ⁻¹ ; 2,0 mg mL ⁻¹ e 5,0 mg mL ⁻¹ de MWCNT para sarcosina 1,12 mmol L ⁻¹ no potencial de 0,7 V. Solução carregadora NaOH 0,1 mol L ⁻¹ com vazão de 1,2 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 121,0 µL.....	83
Figura 26 – Variação da corrente anódica em relação à concentração da solução carregadora NaOH. (A) Concentração de 100,0 µmol L ⁻¹ e (B) concentração de 1,12 mmol L ⁻¹ de sarcosina no potencial de 0,7 V. Vazão de 1,2 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 121,0 µL.....	84
Figura 27 – Variação da corrente anódica em relação à vazão. (A) Concentração de 100,0 µmol L ⁻¹ e (B) concentração de 1,12 mmol L ⁻¹ de sarcosina no potencial de 0,7 V. Solução carregadora NaOH 0,05 mol L ⁻¹ . Volume de injeção: 121,0 µL.....	85
Figura 28 – Variação da corrente anódica em relação ao volume da alça de amostragem para 100,0 µmol L ⁻¹ de sarcosina no potencial de 0,7 V. Solução carregadora NaOH 0,05 mol L ⁻¹ . Volume de injeção: 50,0 a 400,0 µL.....	87
Figura 29 – Corrente de pico anódica em relação aos eletrodos estudados. Condições: Sarcosina 1,12 mmol L ⁻¹ ; potencial de 0,7 V; solução carregadora NaOH 0,05 mol L ⁻¹ e volume de injeção de 121,0 µL.....	88

Figura 30 – (A) Variação da corrente anódica para sarcosina 1,12 mmol L ⁻¹ utilizando eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ com NiSO ₄ •6H ₂ O 5,0 e 10,0 mmol L ⁻¹ . Condições: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L ⁻¹ ; potencial de 0,7 V; vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 121,0 µL. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ empregando 5,0; 10,0 e 15,0 mmol L ⁻¹ de NiSO ₄ •6H ₂ O. Condições: Eletrólito NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , 100 mV s ⁻¹ , 20° ciclo.	89
Figura 31 – Diagramas para concentrações crescentes de sarcosina (100,0 a 1300,0 µmol L ⁻¹) utilizando o eletrodo modificado com (A) 5,0 mmol L ⁻¹ e (B) 10,0 mmol L ⁻¹ de NiSO ₄ •6H ₂ O. Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L ⁻¹ , potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 121,0 µL.	90
Figura 32 – Curva analítica de sarcosina utilizando o eletrodo modificado com (A) 5,0 mmol L ⁻¹ e (B) 10,0 mmol L ⁻¹ de NiSO ₄ •6H ₂ O. Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L ⁻¹ , potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 121,0 µL.	91
Figura 33 – Corrente anódica para sarcosina 1,12 mmol L ⁻¹ utilizando eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ em relação ao número de medidas. Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L ⁻¹ , potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 121,0 µL.	93
Figura 34 – Estruturas dos interferentes.	94
Figura 35 – Correntes obtidas para sarcosina, glicina, alanina, prolina, creatinina, ureia e ácido úrico na concentração de 100,0 µmol L ⁻¹ em solução carregadora de NaOH 0,05 mol L ⁻¹ , no potencial de 0,7 V com vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e volume injetado de 121,0 µL.	94

Figura 36 – Espectro FT-IR do SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP.....	97
Figura 37 – Curva termogravimétrica e curva termogravimétrica derivada para o MIP-AMPS-VP. Vazão de N ₂ : 20,0 mL min ⁻¹ com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ a 900 °C.....	99
Figura 38 – Micrografias eletrônicas de varredura do SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP com ampliações de (A) 200, (B) 10000 e (C) 50000 vezes.	100
Figura 39 – Sorção de sarcosina no MIP-AMPS-VP em função do pH. Foram percolados 10,0 mL de uma solução de 250,0 μmol L ⁻¹ de sarcosina e o efluente foi analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.	104
Figura 40 – Distribuição das espécies de sarcosina em função do pH.	104
Figura 41 – Distribuição das espécies de 4-VP em função do pH.....	105
Figura 42 – Distribuição das espécies de AMPS em função do pH.	105
Figura 43 – Representação da interação entre sarcosina e os monômeros funcionais AMPS e 4-VP em pH 5,0.....	106
Figura 44 – Sorção de sarcosina no MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP em pH 5,0. Foram percolados 10,0 mL de uma solução de 250,0 μmol L ⁻¹ de sarcosina e o efluente foi analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.	106
Figura 45 – Estudo de sorção em função da massa do sorvente MIP-AMPS-VP. Foram percolados 10,0 mL de uma solução de 250,0 μmol L ⁻¹ de sarcosina e o efluente foi analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.....	108
Figura 46 – Corrente de pico anódica em função do solvente de eluição. Foram percolados 100,0 mL de uma solução de 25,0 umol L ⁻¹ de sarcosina e eluído com 2,0 mL de solvente.	109
Figura 47 – Corrente de pico anódica em função da vazão de pré-concentração da amostra. Foram percolados 100,0 mL de uma solução de 25,0 μmol L ⁻¹ de sarcosina e eluído com 2,0 mL de MeOH:HAc (90:10, v/v).	110

- Figura 48** – Curva analítica de sarcosina com etapa de pré-concentração no cartucho de MIP-AMPS-VP. Inserido: Diagramas para concentrações crescentes de sarcosina (5,0 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L^{-1} , potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min^{-1} e volume de injeção de 121,0 μL111
- Figura 49** – Curva analítica de sarcosina com etapa de pré-concentração no cartucho de MIP-AMPS-VP incluindo o LQ. Inserido: Diagramas para concentrações crescentes de sarcosina (3,2 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L^{-1} , potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min^{-1} e volume de injeção de 121,0 μL112
- Figura 50** – Corrente de pico anódica para sarcosina 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e para os interferentes glicina, alanina, prolina e ureia na concentração de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada empregando (A) MIP-AMPS-VP e (B) NIP-AMPS-VP. Foram percolados 100,0 mL de cada solução e eluído com 2,0 mL de MeOH:HAc (90:10, v/v).113
- Figura 51** – Corrente de pico anódica para sarcosina 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e para interferentes na concentração de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada empregando (A) MIP-AMPS-VP e (B) NIP-AMPS-VP. Foram percolados 100,0 mL de cada solução e eluído com 2,0 mL de MeOH:HAc (90:10, v/v).114
- Figura 52** – Estrutura química de sarcosina e glicina.115
- Figura 53** – Relação da corrente de pico anódico para sarcosina 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e glicina 280,0; 1330,0 e 2990,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com sarcosina 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em amostras de urina sintética utilizando o método MISPE.116
- Figura 54** – Relação da corrente de pico anódico para sarcosina 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, glicina 1330,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; e glicina 1330,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com sarcosina 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, em amostras de urina sintética utilizando o método MISPE.117

Figura 55 – (A) Curva analítica fixando a concentração de sarcosina ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e variando a concentração de glicina ($280,0$ a $2990,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (B) curva analítica variando a concentração de sarcosina ($5,0$ a $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e fixando a concentração de glicina ($1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de urina sintética utilizando o método MISPE.119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Área específica, volume de poro e tamanho de poro dos polímeros.	101
Tabela 2 – Teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos pela análise elementar dos polímeros.	102
Tabela 3 – Análise de variância fator único para comparação dos coeficientes angulares obtidos pelas curvas analíticas sem e com LQ.	113
Tabela 4 – Comparação do método proposto com outros métodos analíticos.	111
Tabela 5 – Porcentagem de recuperação de sarcosina em amostras de urina sintética após extração com MISPE a partir do procedimento de adição e recuperação (n = 3).	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-VP	4-vinilpiridina
ACN	Acetonitrila
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrila
A-IDA	Ensaio de Deslocamento de Indicador Amperométrico (do inglês <i>Amperometric Indicator Displacement Assay</i>)
ALA	Alanina
AMPS	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico
AUR	Ácido úrico
BET	Brunauer, Emmet, Teller
BJH	Barrett, Joyner, Halenda
C18	Octadecil
CaP	Câncer de Próstata
CHN	Carbono, hidrogênio e nitrogênio
CRE	Creatinina
DBP	Dibutilftalato
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DMF	N,N-dimetilformamida
DMGDH	Dimetilglicina-desidrogenase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTG	Derivada Termogravimétrica
EDAC	Hidrocloridrato de N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva (do inglês <i>Dispersive energy spectroscopy</i>)
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent assay</i>)
EtOH	Etanol
FIA	Análise por Injeção em Fluxo (do inglês <i>Flow Injection Analysis</i>)

FIA-ED	Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Eletroquímica (do inglês <i>Flow Injection Analysis Electrochemical Detection</i>)
FT-IR	Infravermelho com Transformada em Fourier
GC-FID	Cromatografia a Gás com Detector de Ionização de Chama (do inglês <i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i>)
GC-MS	Cromatografia a Gás com Espectrometria de Massas (do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GC-MS/MS	Cromatografia a Gás com Espectrometria de Massas com Duplo Quadrupolo (do inglês <i>Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>)
GLI	Glicina
GNMT	Glicina-N-metiltransferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HAc	Ácido Acético
HCl	Ácido Clorídrico
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada com Espectrometria de Massas com Duplo Quadrupolo (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>)
IELC	Cromatografia Líquida de Troca Iônica (do inglês <i>Ion Exchange Liquid Chromatography</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ipa	Corrente de Pico Anódico
INT	Interferentes
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)
LQ	Limite de Quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i>)
MAH	Metacrilóil amino histidina
MeOH	Metanol
MEPS	Microextração por Sorvente Empacotado (do inglês <i>Microextraction by Packed Sorbent</i>)

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	Polímeros Molecularmente Impressos (do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymers</i>)
MIP-AMPS-VPP	Polímero Molecularmente Impresso de poli(ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico-co-vinilpiridina)
MISPE	Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (do inglês <i>Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction</i>)
MWCNT	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (do inglês <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>)
N ₂	Gás nitrogênio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
Ni(OH) ₂	Hidróxido de níquel
NiO(OH)	Óxido hidróxido de níquel
NIP	Polímero Não Impresso (do inglês <i>Non Imprinted Polymers</i>)
NIP-AMPS-VP	Polímero Não Impresso de poli(ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico-co-vinilpiridina)
O ₂	Gás oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRO	Prolina
PSA	Antígeno Prostático Específico (do inglês <i>Prostate Specific Antigen</i>)
PVA	Poli(álcool vinílico)
PVC	Policloreto de vinila
SAR	Sarcosina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SF	Fluorimetria de Varredura (do inglês <i>Scanning Fluorometry</i>)
SOX	Sarcosina Oxidase (do inglês <i>Sarcosine Oxidase</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPe	Eletrodos Impressos (do inglês <i>Screen-Printed Electrodes</i>)
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>)
SWCNT	Nanotubos de Carbono de Parede Única (do inglês <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>)

t	Tempo
TCL	Cromatografia em Camada Delgada (do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TG	Análise Termogravimétrica
TRIM	Trimetilpropano trimetacrilato
URE	Ureia
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	SARCOSINA COMO BIOMARCADOR PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA	31
2.2	ELETRODOS MODIFICADOS COM Ni(OH) ₂ PARA DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	36
2.3	POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS.....	40
2.4	POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E SARCOSINA	47
3	OBJETIVO GERAL	54
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	PARTE EXPERIMENTAL	55
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	55
4.2	EQUIPAMENTOS	56
4.3	MODIFICAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO	57
4.4	SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO	58
4.5	SÍNTESE DOS POLÍMEROS MIP E NIP	60
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	62
4.6.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada em Fourier (FT-IR).....	63
4.6.2	Análise Termogravimétrica (TG).....	63
4.6.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	63
4.6.4	Fisissorção de Gás N ₂ à 77 K.....	64
4.6.5	Análise Elementar (CHN)	64
4.7	SISTEMA DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO	64
4.8	ESTUDO DO PH NA SORÇÃO DE SARCOSINA	66
4.9	AVALIAÇÃO DA MASSA DO SORVENTE MIP-AMPS-VP NA SORÇÃO DE SARCOSINA	67
4.10	ESTUDO DO SOLVENTE DE ELUIÇÃO NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA.	67

4.11	OTIMIZAÇÃO DA VAZÃO NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA	68
4.12	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO.....	68
4.13	AVALIAÇÃO DO PERFIL SORTIVO DE MOLÉCULAS ESTRUTURALMENTE SIMILARES À SARCOSINA UTILIZANDO MIP-AMPS-VP E NIP-AMPS-VP	69
4.14	APLICAÇÃO DO MÉTODO MISPE EM AMOSTRAS DE URINA SINTÉTICA	69
4.15	INFLUÊNCIA DE GLICINA NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	AVALIAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM MWCNT/NAFION [®] /Ni(OH) ₂ PARA DETECÇÃO DE SARCOSINA	71
5.1.1	Caracterização Morfológica e Superficial dos Eletrodos.....	71
5.1.2	Influência da Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono no Perfil Voltamétrico de Ni(OH) ₂	74
5.1.3	Avaliação do Potencial de Oxidação de Ni(OH) ₂ Utilizando o Eletrodo Impresso de Carbono Modificado com MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ em Sistema FIA	77
5.1.4	Avaliação da Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono com Nafion [®] , MWCNT/Nafion [®] e MWCNT/Nafion [®] /Ni(OH) ₂ no Sistema FIA	80
5.1.5	Estudo da Quantidade de MWCNT Utilizada para a Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono.....	81
5.1.6	Efeito da Concentração da Solução Carregadora (NaOH) no Sistema FIA.....	83
5.1.7	Estudo da Vazão da Solução Carregadora no Sistema FIA	85
5.1.8	Estudo do Volume da Alça de Amostragem no Sistema FIA.....	86
5.1.9	Estudo da Reprodutibilidade do Preparo do Sensor.....	87
5.1.10	Estudo da Concentração de Sulfato de Níquel Utilizado na Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono.....	85
5.1.11	Desempenho Analítico do Sensor na Determinação de Sarcosina	87
5.1.12	Estudo para Avaliar a Reusabilidade do Sensor	92
5.1.13	Avaliação de Possíveis Interferentes na Detecção de Sarcosina Utilizando o Método Eletroanalítico Desenvolvido	93
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS- VP E NIP-AMPS-VP	95

5.2.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho	95
5.2.2	Análise Termogravimétrica	97
5.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	99
5.2.4	Fisissorção de Gás Nitrogênio à 77 K	100
5.2.5	Análise Elementar.....	102
5.3	AVALIAÇÃO DE MIP-AMPS-VP COMO SORVENTE DE SPE PARA SARCOSINA	102
5.3.1	Otimização do pH na Sorção de Sarcosina	103
5.3.2	Estudo da Massa do Sorvente MIP-AMPS-VP na Sorção de Sarcosina.....	107
5.3.3	Otimização do Solvente de Eluição na Pré-concentração de Sarcosina.....	108
5.3.4	Avaliação da Vazão na Pré-concentração de Sarcosina.....	110
5.3.5	Características Analíticas do Método MISPE	111
5.3.6	Avaliação de Possíveis Interferentes na Determinação de Sarcosina Utilizando o Método MISPE	112
5.3.7	Aplicação do Método MISPE em Amostras de Urina Sintética.....	114
5.3.8	Influência de Glicina na Determinação de Sarcosina Utilizando o Método MISPE.....	115
6	CONCLUSÃO.....	120
	REFERÊNCIAS.....	122
	ANEXO.....	138
	ANEXO A – Distribuição de poros	139

1 INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula exclusiva dos homens e com o envelhecimento pode crescer de forma normal ou desenvolver o câncer de próstata. Este órgão, localizado abaixo da bexiga, e que envolve a parte superior da uretra, é responsável por produzir parte do sêmen a partir do estímulo da testosterona presente nos testículos (INCA, 2018; TOFANI; VAZ, 2007).

As doenças da próstata se dividem entre cancerosa e não-cancerosas. Dentre as não-cancerosas cita-se a prostatite aguda, prostatite crônica e hiperplasia prostática benigna (HPB). A prostatite aguda é causada por infecção bacteriana, sendo tratada por meio de medicamentos e, na maioria dos casos, é possível atingir a cura. A prostatite crônica caracteriza-se por ser uma infecção bacteriana recorrente, e além do uso de medicamentos, a massagem prostática é necessária no tratamento. A HPB é um crescimento benigno da próstata, que normalmente ocorre em homens a partir dos 40 anos de idade. O tratamento é feito por meio do uso de medicamentos e, em casos mais graves, cirurgicamente (INCA, 2018; SROUGI *et al.*, 2008).

O câncer de próstata (CaP) caracteriza-se pela presença de tumores malignos que dividem-se sem ordem e sem controle, podendo invadir e danificar órgãos próximos à próstata, sendo capaz de se espalhar e atingir outros órgãos do corpo, causando a morte. No Brasil, o CaP é o segundo tipo de câncer mais incidente entre os homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma. De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), em 2018 foram diagnosticados mais de 68 mil novos casos de CaP e, em 2015, foram confirmadas mais de 14 mil mortes causadas pela doença (INCA, 2018; SROUGI *et al.*, 2008).

O CaP normalmente não apresenta sintomas em estágio inicial, e quando apresenta, são semelhantes com os da HPB, como dificuldade de urinar e necessidade de urinar mais vezes durante o dia. Porém, em estágio avançado causa sintomas urinários graves, como infecção generalizada e insuficiência renal. A doença comumente atinge homens a partir dos 45 anos de idade e cerca de 75% dos casos ocorrem a partir dos 65 anos de idade (INCA, 2018).

O rastreamento do CaP é recomendado pela dosagem do antígeno prostático específico (PSA, do inglês *Prostate Specific Antigen*) associado com exame de

toque retal em homens a partir dos 50 anos ou a partir dos 45 anos de idade, caso haja a presença de fatores de risco. O PSA é uma proteína produzida pela próstata, sendo o biomarcador tumoral comumente utilizado para o rastreamento e diagnóstico do CaP. Este rastreamento é realizado por meio de exame de sangue, em que o valor de PSA aceito como normal deve estar abaixo de $4,00 \mu\text{g L}^{-1}$ (INCA, 2018; CALVETE *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007; DAMIÃO *et al.*, 2015).

O exame de PSA é realizado por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em que, em uma placa, conhecida como placa de ELISA, contendo poços com o anticorpo específico para o CaP é adicionada uma alíquota da amostra de sangue do paciente. Se na amostra houver o antígeno, ocorrerá a ligação entre antígeno e anticorpo, conhecido como processo de incubação. Após a incubação, uma etapa de lavagem é realizada a fim de retirar o que não se ligou. Logo após, é adicionado um anticorpo conjugado, o qual está ligado com a enzima que permite identificar a amostra como positiva ou negativa. Há mais uma etapa de incubação e lavagem e, por fim, ocorre a adição do substrato para a enzima. Uma mudança na coloração identifica a amostra como positiva e, a análise é realizada por densidade óptica ou por intensidade de fluorescência (ALPO DIAGNOSTICS, 2018).

Apesar de o teste ELISA ser sensível e específico, apresenta desvantagens como o alto custo, gerado pelo valor dos anticorpos específicos necessários, difícil manuseio e variação no tempo de incubação e no processo de lavagem, o que gera uma baixa estabilidade química. Ainda, uma alteração no valor de PSA no sangue pode indicar resultados falso-positivos ou falso-negativos, pois um aumento do PSA pode estar relacionado tanto com a presença do câncer quanto com a de doenças não-cancerosas, por isso torna-se necessário sua associação com o exame de toque, o qual possibilita o examinador palpar a próstata e identificar a presença de nódulos e/ou tecidos enrijecidos que possam indicar a doença.

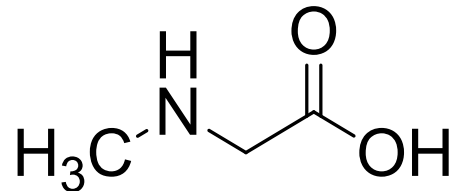
No entanto, a combinação desses exames ainda não possibilita um diagnóstico preciso, assim torna-se necessário realização da biópsia prostática para confirmar a presença do câncer. Nesse exame há a retirada de amostras de tecido da próstata do paciente para análise e durante sua realização pode ocorrer desconforto e presença de sangue na urina ou no sêmen nos dias posteriores ao procedimento, havendo risco de infecção, necessitando com isso do uso de antibióticos (INCA, 2018; DAMIÃO *et al.*, 2015).

Assim, a busca por novos biomarcadores que possibilitem um diagnóstico precoce da doença como uma estratégia de identificar o tumor no estágio inicial e possibilitar melhor chance de tratamento e cura, além de descartar a realização de biópsias desnecessárias, tem sido alvo de estudos.

Os biomarcadores tumorais são moléculas presentes no tumor, no sangue e em outros fluidos biológicos. Seu surgimento e/ou a alteração em sua concentração ocorre com o crescimento de células cancerosas no organismo, auxiliando o diagnóstico e a avaliação prognóstica do câncer (ALMEIDA *et al.*, 2007).

A sarcosina (SAR), também conhecida como N-metilglicina (Figura 1) com fórmula química $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$, tem-se mostrado como um potencial biomarcador para o rastreamento e prognóstico do CaP. Esta molécula está presente naturalmente no organismo, e sua biossíntese ocorre nas mitocôndrias por meio de duas vias. A primeira via a partir da dimetilglicina, catalisada pela dimetilglicina-desidrogenase (DMGDH), e a segunda, por meio da metilação da glicina, sendo catalisada pela glicina-N-metiltransferase (GNMT) (RODWELL *et al.*, 2017).

Figura 1 – Estrutura química da sarcosina.



Fonte: o próprio autor.

O desenvolvimento do câncer está relacionado com uma alteração na metilação do DNA (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*), causando uma produção excessiva do gene GNMT, responsável por controlar a glicina-N-metiltransferase, que como mencionado, catalisa a síntese de sarcosina. A produção excessiva desse gene provoca uma clivagem elevada de glicina em sarcosina, resultando assim em maior presença de sarcosina na urina, o que a tem tornado um metabólito interessante no estudo de biomarcadores para o câncer (HUANG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2011; STABLER *et al.*, 2011; CERNEI *et al.*, 2013; IANNI *et al.*, 2013; NARDINI *et al.*, 2013; NGUY *et al.*, 2017). Cabe salientar que embora a sarcosina seja obtida à partir da glicina, os teores de sarcosina na urina são

substancialmente inferiores a glicina, tanto em pacientes com câncer e sem a neoplasia.

Em 2009, Sreekumar e colaboradores relataram a relação da concentração da sarcosina com o CaP. Neste estudo, os pesquisadores analisaram 1126 metabólitos utilizando Cromatografia a Gás com Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) e observaram que um subconjunto de 6 metabólitos, incluindo sarcosina, uracila, quinurenina, leucina, prolina e glicerol-3-fosfato aumentaram seus níveis durante a progressão da doença. No entanto, a atenção foi voltada para a sarcosina, pois os pesquisadores observaram que havia maior concentração de sarcosina na urina de pacientes com a doença ($0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina) quando comparado com os indivíduos saudáveis ($0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina) (SREEKUMAR *et al.*, 2009). Assim, a sarcosina passou a ser estudada como um potencial biomarcador para o diagnóstico e a avaliação prognóstica do CaP, chamando a atenção por possibilitar um rastreamento não invasivo.

Por outro lado, Jentzmik e colaboradores (2010) analisaram amostras de urina de indivíduos saudáveis e de pacientes com o CaP empregando GC-MS e concluíram que a sarcosina não pode ser utilizada como um biomarcador para distinguir pacientes com CaP de indivíduos saudáveis. Neste trabalho, a quantidade de sarcosina em pacientes com a doença foi 13% menor quando comparado com pacientes saudáveis (JENTZMIK *et al.*, 2010). Entretanto, desde este estudo até o momento, não foram encontrados na literatura outros trabalhos que coloquem em dúvida o emprego de sarcosina como biomarcador no monitoramento do CaP.

Os métodos cromatográficos e espectrofotométricos são os mais comumente usados para a determinação de sarcosina em fluidos biológicos. Jiang e colaboradores (2010) utilizaram pela primeira vez a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada com Espectrometria de Massas com Duplo Quadropolo (HPLC-MS/MS, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) para a quantificação simultânea de sarcosina e outros seis metabólitos em amostras de urina de indivíduos saudáveis e de pacientes com CaP. Neste trabalho foi encontrado mais sarcosina nas amostras de urina de pacientes com CaP ($0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$) comparado com indivíduos saudáveis ($0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$) e, dentre os metabólitos estudados, a sarcosina foi o que apresentou níveis mais elevados (JIANG *et al.*, 2010).

Em outro trabalho, Cernei e colaboradores (2012) realizaram a quantificação de sarcosina utilizando Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis empregando derivatização com ninidrina. O limite de quantificação obtido foi de $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (CERNEI *et al.*, 2012). No entanto, o método desenvolvido não foi aplicado em amostras de urina.

Em 2013, Shamsipur, Naseri e Babri desenvolveram um método utilizando GC-MS para a determinação de sarcosina em amostras de urina humana. O método foi baseado em Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) utilizando acetonitrila como solvente extrator e clorofornato de isobutila como agente de derivatização. A concentração de sarcosina encontrada em pacientes com CaP foi igual a $5,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ e em indivíduos saudáveis igual a $4,27 \mu\text{mol L}^{-1}$ (SHAMSIPUR; NASERI; BABRI, 2013).

Diante do exposto, observa-se que os métodos mais comumente utilizados para a determinação de sarcosina faz uso de instrumentação analítica de custo relativamente alto e utilização de reagentes de derivatização.

Neste contexto, a determinação de sarcosina empregando técnicas eletroanalíticas torna-se uma alternativa devido às vantagens que apresenta em comparação com as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, pois exibem um curto tempo de análise, baixos limites de detecção, menor geração de resíduos e instrumentação de baixo custo (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; PACHECO *et al.*, 2013).

Porém, poucos trabalhos são reportados para a determinação de sarcosina utilizando técnicas eletroanalíticas, uma vez que a sarcosina, bem como aminoácidos de maneira geral, são eletroinativos na janela de potencial de eletrodos à base de carbono (VIDOTTI; TORRESI; KUBOTA, 2008), justificando assim o emprego de modificações nos eletrodos a fim de viabilizar a análise.

Com o intuito de possibilitar a detecção de aminoácidos, tem sido relatado na literatura o uso de hidróxido de níquel $[\text{Ni}(\text{OH})_2]$ depositado eletroquimicamente sobre a superfície de eletrodos convencionais. Deo, Lawrence e Wang (2004) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de parede única (SWCNT, do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes*) e uma camada de $\text{Ni}(\text{OH})_2$ depositado e gerado eletroquimicamente sobre a superfície dos nanotubos para a determinação de asparagina. Neste trabalho os autores demonstraram que a modificação com hidróxido de níquel permitiu a detecção de

asparagina e os nanotubos de carbono proporcionaram uma maior eficácia na deposição do Ni(OH)_2 , produzindo um sinal analítico para asparagina superior àquele obtido com um eletrodo modificado apenas com hidróxido de níquel (DEO; LAWRENCE; WANG, 2004).

A determinação de aminoácidos por meio do uso de hidróxidos metálicos, como hidróxido de níquel, na modificação de eletrodos é possibilitada devido à alta atividade electrocatalítica apresentada pela espécie óxido hidróxido de níquel ($[\text{NiO(OH)}]$) (CATALDI; CENTONZE; RICCIARDI, 1995). No entanto, apesar de possibilitar a análise de aminoácidos, os trabalhos reportados na literatura que utilizam hidróxidos metálicos para detecção de aminoácidos comumente fazem uso de eletrodos convencionais de custo relativamente elevado, como eletrodos de carbono vítreo e platina.

Assim, o emprego de eletrodos impressos (SPe, do inglês *Screen-Printed Electrodes*) tem sido uma alternativa para o desenvolvimento de novos sensores. Os SPe apresentam o eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar e o eletrodo de referência impressos em um único suporte. O emprego de eletrodos impressos frente aos eletrodos convencionais, além de apresentarem vantagens como baixo custo, resposta rápida e facilidade de modificação, dispensam procedimentos de pré-tratamento, como polimento ou pré-tratamento electroquímico, normalmente aplicado em eletrodos convencionais, tais como eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de diamante, respectivamente (NASCIMENTO; ANGNES, 1998; BARTON *et al.*, 2016; COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016). Além do mais, estes podem ser acoplados em células de fluxo para serem utilizados em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), permitindo melhorias do método no que tange à frequência analítica e consumo de reagentes e amostras.

Diante disso, as vantagens do sistema FIA associadas à modificação de um eletrodo impresso utilizando hidróxido de níquel, mostra-se promissora para a detecção electroquímica de sarcosina. No entanto, cabe salientar que a detectabilidade dos eletrodos modificados com Ni(OH)_2 não é adequada para a determinação de sarcosina em urina, uma vez que a faixa reportada é de 0,11 a $5,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pacientes portadores de câncer (SREEKUMAR *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2010; SHAMSIPUR; NASERI; BABRI, 2013). Neste sentido, justifica-se a adoção de método prévio de preparo de amostra visando elevar a detectabilidade do método, bem como propiciar *clean-up* da amostra.

Dentre as técnicas de pré-concentração e/ou extração, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é a mais comumente utilizada por apresentar vantagens como menor consumo de solventes orgânicos, facilidade de automação, baixo custo, altos fatores de pré-concentração, bem como a regeneração da fase sólida. No procedimento de SPE, a amostra contendo o analito é percolada em um cartucho recheado com o material sorvente pelo qual o analito é retido e, em seguida, um solvente é utilizado para a eluição deste e levado ao sistema de detecção. A eluição pode ser realizada com um pequeno volume de solvente a fim de isolar e pré-concentrar o analito alvo. Esta técnica também permite incluir etapas de lavagem do cartucho por meio do uso de um solvente adequado com a finalidade de remover possíveis interferentes sorvidos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; JARDIM, 2010; CALDAS *et al.*, 2011).

A escolha do material sorvente é de grande importância, principalmente pela natureza do analito e da matriz da amostra. Comercialmente, há diversos sorventes sólidos disponíveis, no entanto, polímeros sintéticos com impressão molecular, conhecidos como MIP (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) vêm se destacando por serem uma alternativa frente aos sorventes disponíveis comercialmente, pois caracterizam-se por apresentarem elevada seletividade e facilidade de síntese.

O processo de síntese comumente é realizado a partir da interação (covalente ou não covalente) da molécula molde (comumente o analito de interesse) com os sítios de ligação do monômero, seguido pela adição de um reagente de ligação cruzada a fim de permitir a formação de ligações cruzadas para obter uma matriz polimérica rígida. A reação é iniciada após a adição de um iniciador radicalar, sob aquecimento ou luz UV. Após a síntese, a molécula molde é removida da matriz polimérica utilizando um solvente apropriado, em que a cavidade seletiva é criada após a remoção do analito impresso (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a, 2005b; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN *et al.*, 2016).

Embora apresente substancial vantagem como sorvente de SPE comparado aos sorventes comerciais, o emprego de MIP na sorção de sarcosina e sua utilização em SPE ainda é pouco difundido na literatura. Em 2013, Hashemi-Moghaddam, Rahimian e Niromand desenvolveram um método MISPE (do inglês *Molecularly Imprinted-Solid Phase Extraction*) para sorção de sarcosina em amostras de urina. O polímero foi sintetizado empregando ácido metacrílico como monômero

funcional, EGDMA (etileno glicol dimetacrilato) como agente de ligação cruzada, AIBN (2,2-azobisisobutironitrila) como iniciador radicalar e uma mistura de acetonitrila:água na proporção 4:1 (v/v) como solvente porogênico. Para a determinação de sarcosina foi utilizado o método de derivatização por ninidrina e em seguida as medidas foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis em 570 nm. (HASHEMI-MOGHADDAM; RAHIMIAN; NIROMAND, 2013). No entanto, este trabalho fez uso de reagente de derivatização para possibilitar a detecção de sarcosina, o que pode influenciar na sua detectabilidade e aumentar o tempo de análise, bem como não apresentou os valores dos limites de detecção e quantificação obtidos empregando o método desenvolvido. Ainda, o método de derivatização por ninidrina é suscetível à interferências de aminoácidos presentes na amostra, pois trata-se de um teste colorimétrico, em que a ninidrina oxida todos os aminoácidos do meio formando um complexo de coloração púrpura (CONN; STUMPF, 1980).

Como relatado, dados da literatura ainda são incipientes em relação ao emprego de MIP para pré-concentração de sarcosina, sendo que os trabalhos publicados exploram apenas o uso de ácido metacrílico como monômero funcional no preparo dos polímeros. Considerando que a sarcosina caracteriza-se por ser uma molécula anfótera, a qual pode comportar-se como ácido ou como base, torna-se interessante o uso de mais de um monômero funcional no processo de síntese, os quais possam interagir com a molécula por meio de interações eletrostáticas, buscando um MIP que apresente maior seletividade para sarcosina.

Mediante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método eletroanalítico baseado na pré-concentração *off-line* de sarcosina em MIP e posterior detecção em sistema FIA empregando um eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*) e hidróxido de níquel, denominado de MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SARCOSINA COMO BIOMARCADOR PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA

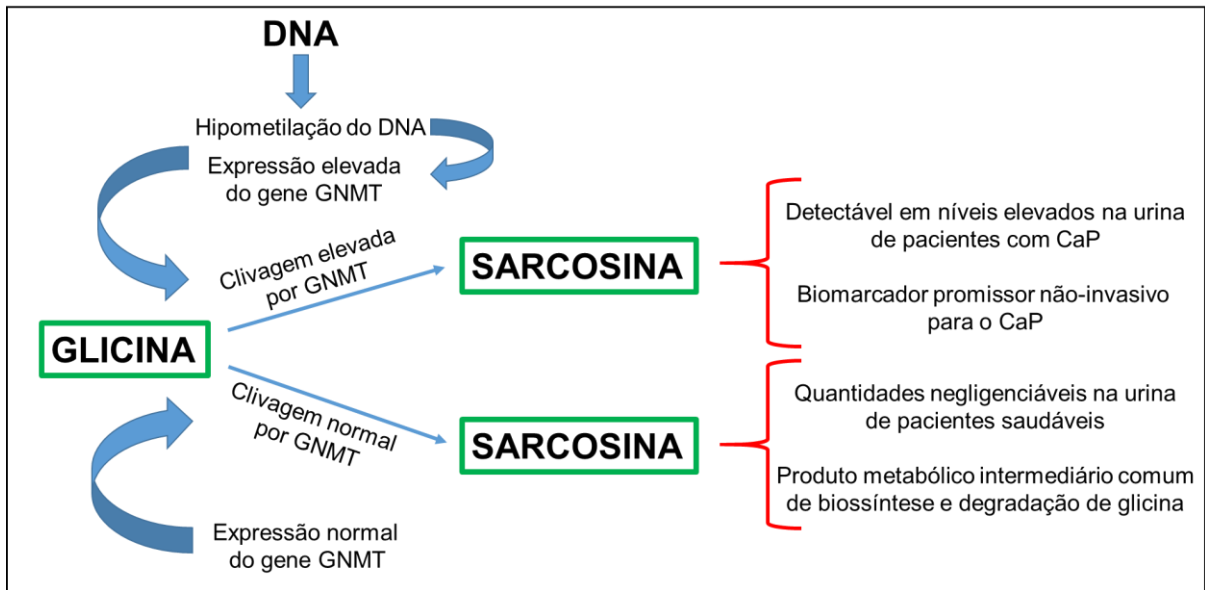
Os metabólitos são responsáveis por auxiliarem na compreensão das reações biológicas e, assim, as mudanças em seus níveis contribuem para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos que possam diagnosticar doenças específicas (CERNEI *et al.*, 2013).

A sarcosina é um aminoácido presente no organismo humano, derivado da glicina, que se classifica como um metabólito por resultar de reações enzimáticas do metabolismo. Esta molécula vem sendo investigada como um biomarcador para o diagnóstico e avaliação prognóstica do câncer de próstata por estar envolvida em reações que estão relacionadas com o desenvolvimento do câncer (HUANG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; STABLER *et al.*, 2011; CERNEI *et al.*, 2013; IANNI *et al.*, 2013; NARDINI *et al.*, 2013; NGUY *et al.*, 2017).

No organismo, a sarcosina é gerada como produto intermediário da síntese e degradação do aminoácido glicina por meio da atividade enzimática do gene GNMT, o qual está envolvido com o processo de metilação do DNA. Quando há deficiência de grupos metilo no organismo, ocorre uma perturbação na expressão gênica, desencadeando a hipometilação do DNA, a qual está associada com o desenvolvimento do CaP. Esse processo de alteração na metilação do DNA interfere na produção do gene GNMT, e quando este é produzido de maneira elevada, provoca uma clivagem excessiva de glicina em sarcosina, elevando a presença de sarcosina na urina.

Dessa forma, a sarcosina tornou-se um potencial biomarcador não invasivo do câncer de próstata, promovendo o desenvolvimento de diferentes métodos analíticos para sua determinação em urina. Na Figura 2 pode-se observar o esquema representativo do metabolismo de sarcosina no organismo humano.

Figura 2 – Esquema representativo do metabolismo de sarcosina.

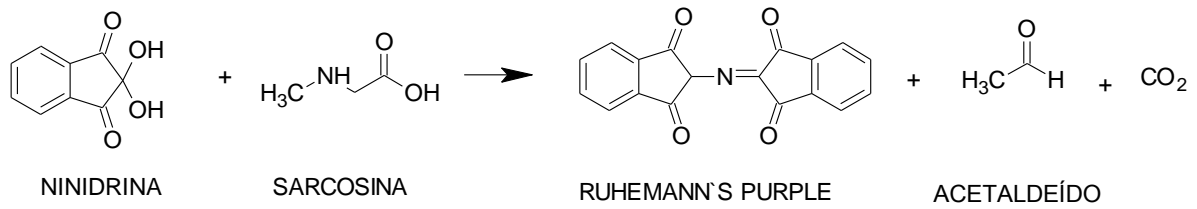


Fonte: Adaptado de Cernei *et al.*, 2013.

Os métodos normalmente empregados para a determinação de sarcosina em fluidos biológicos apresentam instrumentação analítica de alto custo, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada com Espectrometria de Massas, Cromatografia a Gás com Espectrometria de Massas e Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis, e geralmente, necessitam do emprego de reagentes de derivatização. O uso destes reagentes torna-se necessário pelo fato da molécula de sarcosina não apresentar grupos cromóforos ou fluoróforos em sua estrutura (MEYER *et al.*, 2011; CERNEI *et al.*, 2012).

Os reagentes de derivatização utilizados incluem ninidrina, 7-cloro-4-nitrobenzo-2-ox-1,3-diazol (NBD-Cl), cloreto de dansila, cloroformato de etila, entre outros. Dentre estes, a ninidrina (2,2-diidroxihidríndeno-1,3-diona) tem sido o mais comumente empregado para determinação de sarcosina e de aminoácidos em geral. Na Figura 3 pode-se observar a reação entre ninidrina e sarcosina. Nesta reação há o deslocamento de uma espécie nucleofílica de um grupo hidroxila (OH) da ninidrina por um grupo amino não-protonado do aminoácido, formando um composto de coloração púrpura, denominado Ruhemann's purple (SPACKMAN; STEIN; MOORE, 1958; BOTTOM; HANNA; SIEHR, 1978; TAHBOUB; PARDUE, 1985; CERNEI *et al.*, 2012), permitindo assim a detecção de sarcosina.

Figura 3 – Reação de derivatização para sarcosina empregando ninidrina.



Fonte: o próprio autor.

Apesar dos derivados formados por meio das reações de derivatização possibilitarem a análise de sarcosina, estes caracterizam-se por serem instáveis, além da derivatização ser um procedimento lento (CONN; STUMPF, 1980).

Em 1984, Bellon e colaboradores determinaram sarcosina no sangue e na urina por Cromatografia em Camada Delgada (TCL, do inglês *Thin Layer Chromatography*) e Fluorimetria de Varredura (SF, do inglês *Scanning Fluorometry*) empregando o composto fluorogênico NBD-Cl como reagente de derivatização. Na urina os autores encontraram sarcosina na faixa de 1,75 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e, no sangue encontraram na faixa de 0,5 a 2,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (BELLON *et al.*, 1984). Contudo, os valores de referência para sarcosina na urina, até então, eram imprecisos (GERRITSEN; WAISMAN, 1966; WAISMAN; GERRITSEN, 1967).

A partir de 2009, após ser apontada por Sreekumar e colaboradores como um possível biomarcador para o CaP, a sarcosina passou a ser investigada pela comunidade científica com maior interesse.

Em 2011, Meyer e colaboradores empregaram Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de Massas (HPLC-MS, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) para separar sarcosina de α e β alanina no soro e na urina. Os autores utilizaram cloreto de dansila como reagente de derivatização a fim de viabilizar a análise, obtendo limite de quantificação de 0,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Com o método proposto, foi encontrado em média 1,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina em amostras de urina e 1,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina em amostras de sangue (MEYER *et al.*, 2011).

Ainda em 2011, Cavaliere e colaboradores empregaram Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas com Duplo Quadrupolo (GC-MS/MS, do

inglês *Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) para determinação de sarcosina em amostras de urina. A sarcosina foi derivatizada com cloroformato de etila/etanol e o derivado foi extraído por Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*). As condições do procedimento de SPME foram otimizadas, obtendo 20 minutos como tempo de extração, concentração de NaCl de 10% e 270 °C como temperatura de dessorção, utilizando uma fibra de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano. O limite de quantificação obtido foi de 1,8 nmol L⁻¹. O método foi aplicado em amostras de urina de 10 pacientes saudáveis com faixa etária de 24 a 35 anos e a concentração média de sarcosina encontrada foi igual a 2,37 µmol L⁻¹ (CAVALIERE *et al.*, 2011).

A determinação de sarcosina também tem sido reportada na literatura utilizando técnicas eletroquímicas. Cernei e colaboradores (2012) empregaram análise por injeção em fluxo com detecção eletroquímica (FIA-ED, do inglês *Flow Injection Analysis-Electrochemical Detection*) para determinação de sarcosina. Os autores utilizaram tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 9,0 com vazão de 0,75 mL min⁻¹, e um volume de injeção de 5,0 µL aplicando um potencial de 1,0 V com detecção coulométrica. O método desenvolvido apresentou um limite de quantificação de 0,38 µmol L⁻¹ (CERNEI *et al.*, 2012). No entanto, os autores utilizaram Cromatografia Líquida de Troca Iônica (IELC, do inglês *Ion Exchange Liquid Chromatography*) para separação prévia, e, além disso, neste trabalho não foi avaliada a influência de possíveis interferentes, bem como o método não foi aplicado em amostras de urina.

Em outro trabalho, Rebelo e colaboradores (2014) utilizaram um biossensor para determinação de sarcosina em amostras de urina sintética. Um eletrodo impresso de carbono modificado com sarcosina oxidase (SOX, do inglês *Sarcosine Oxidase*) foi utilizado como eletrodo de trabalho, e a enzima imobilizada (SOX) no eletrodo foi responsável por converter sarcosina em glicina, formaldeído e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Dessa forma, os autores monitoraram sarcosina por meio da detecção eletroquímica de H₂O₂. Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 foi utilizado como eletrólito suporte e o potencial aplicado foi de 0,6 V, obtendo um limite de detecção de 0,02 nmol L⁻¹. A atividade da enzima permaneceu estável dentro de um período de 60 dias e a mesma imobilização pôde ser utilizada por 10 vezes (REBELO *et al.*, 2014). No entanto, o uso de enzimas em modificações de sensores encarece o método desenvolvido, além de apresentarem baixa estabilidade química. Ainda, os autores avaliaram apenas a presença de creatinina e ureia como possíveis

interferentes, desconsiderando a presença de aminoácidos na urina, como glicina, que poderia interferir na análise.

Diltemiz e Uslu (2015) utilizaram nanossensores interferométricos baseados em reflectometria para a detecção de sarcosina em amostras de urina. As nanopartículas impressas de sarcosina (MIP) foram preparadas através da polimerização por emulsão em duas fases e anexadas a substratos de vidro por revestimento de rotação. A fase orgânica continha 1,72 mmol de ácido metacrílico, 6,9 mmol de etileno glicol dimetacrilato, 80,0 µL de hexadecano e 30,0 mg de AIBN, e, a fase aquosa foi preparada pela dissolução de 0,5 mmol de sarcosina com 38,5 mg de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 18,0 mL de água. As partículas obtidas apresentaram tamanho de 190 nm e as medições foram realizadas à temperatura constante utilizando tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4 em 0,5% de SDS a uma vazão de 5,0 µL min⁻¹, controlada por uma bomba peristáltica.

O método desenvolvido apresentou limite de detecção de 0,05 µmol L⁻¹ e foi aplicado em amostras de urina de pacientes saudáveis e de pacientes com CaP. Os autores concluíram que quando aplicado em amostras de pacientes com a doença, um sinal considerável foi obtido quando comparado com amostras de pacientes saudáveis (DILTEMIZ; USLU, 2015), porém, no trabalho não foi informado a concentração de sarcosina encontrada. Ainda, foi avaliado apenas alanina como interferente de sarcosina, sem considerar os demais possíveis interferentes presentes na urina, como ureia, ácido úrico e creatinina, os quais poderiam interferir em uma análise de rotina.

Em 2016, Özkütük e colaboradores desenvolveram um sensor potenciométrico baseado em polímero molecularmente impresso para a determinação de sarcosina. O MIP foi sintetizado por polimerização em emulsão utilizando sarcosina como molécula molde, metacriloil amino histidina (MAH) como monômero funcional, EGDMA como agente de reticulação e AIBN como iniciador radicalar. O eletrodo foi preparado por meio de uma pasta composta de grafite, dibutilftalato (DBP) e MIP, sendo a mistura homogeneizada durante 10 minutos. O tempo de resposta do sensor foi de 2 minutos e sua estabilidade de 5,5 meses. O método proposto forneceu limite de detecção de $1,4 \times 10^{-4}$ µmol L⁻¹ (ÖZKÜTÜK *et al.*, 2016).

Apesar do baixo limite de detecção obtido, eletrodos de pasta utilizando MIP, podem gerar um sensor com seletividade reduzida, devido à baixa quantidade de

MIP utilizado na pasta em comparação com o material carbonáceo (TARLEY *et al.*, 2017). Ainda, o método proposto não foi aplicado em amostras de urina e os autores avaliaram apenas glicina como possível interferente.

Um sensor biomimético para detecção de sarcosina utilizando Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) foi desenvolvido por Nguy e colaboradores (2017). O método consiste na utilização de um eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas de ouro por meio de eletrodeposição empregando voltametria cíclica, e, o polímero molecularmente impresso foi sintetizado *in situ* na superfície do eletrodo. Foi utilizado 4-aminotiofenol como elemento de reconhecimento depositado por eletropolimerização, a fim de gerar membranas biomiméticas com morfologia em microescala e alta condutividade. A molécula molde (sarcosina) foi eluída através do processo de eletro-eluição. Empregando o sensor desenvolvido neste trabalho (MIP/AuNPs/SPCE), foi obtido limite de quantificação de $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ (NGUY *et al.*, 2017). Apesar do baixo limite de quantificação obtido, o método não foi aplicado em amostras de urina. Além disso, os autores avaliaram apenas alanina e lisina como possíveis interferentes.

Ainda em 2017, Xue e colaboradores utilizaram um Ensaio de Deslocamento de Indicador Amperométrico (A-IDA, do inglês *Amperometric Indicator Displacement Assay*) para a detecção de sarcosina. Neste trabalho, foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno, sal de sódio do ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS) e hexaaminorutênio (III) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}]$ como eletrodo de trabalho. O método foi baseado no princípio de deslocamento de indicadores, no qual o NQS foi proposto como receptor e o $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ foi utilizado como indicador, devido a maior afinidade da sarcosina se ligar ao NQS comparada com $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. O limite de detecção obtido com o método desenvolvido foi de $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ (XUE *et al.*, 2017). Apesar do baixo limite de detecção obtido com o método desenvolvido, o estudo não avaliou a interferência de creatinina, glicina e ureia, comumente encontrados em amostras de urina.

2.2 ELETRODOS MODIFICADOS COM $\text{Ni}(\text{OH})_2$ PARA DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

O desenvolvimento de sensores que possibilitem a determinação de aminoácidos tem sido relatado na literatura com o objetivo de desenvolver um

método que apresente rapidez, instrumentação de baixo custo e a eliminação do uso de reagentes de derivatização. No entanto, os aminoácidos em geral não apresentam grupos eletroquimicamente ativos em sua estrutura química, o que dificulta o desenvolvimento de métodos eletroquímicos para sua determinação. Uma alternativa interessante para resolver esse problema seria produzir reações químicas *in situ* sob a superfície dos eletrodos, gerando produtos eletroquimicamente ativos e possibilitando assim a detecção eletroquímica (FUNG; MO, 1995; MAJID *et al.*, 2007).

Eletrodos modificados com os metais cobre, níquel e cobalto tem chamado atenção devido ao bom desempenho apresentado para determinação de aminoácidos inativos na janela de trabalho de eletrodos à base de carbono. Zen e colaboradores (2004) propuseram o emprego de um eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas de cobre obtidas por deposição fotoeletroquímica para a quantificação de 20 aminoácidos. Inicialmente os aminoácidos foram separados por HPLC e em seguida os autores utilizaram sistema FIA com detecção eletroquímica aplicando um potencial de 0,0 V e empregando uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) como solução carregadora. Com o método desenvolvido foram obtidos limites de detecção na faixa de 0,02 µmol L⁻¹ a 2,7 µmol L⁻¹ (ZEN *et al.*, 2004).

Em outro trabalho, Luque, Ferreyra e Rivas (2007) desenvolveram um sensor para quantificação de aminoácidos baseado na incorporação de micropartículas de cobre em um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (CNTPE-Cu). O potencial aplicado foi de 0,0 V e tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4) foi utilizado como eletrólito suporte. O melhor desempenho do sensor foi obtido empregando 6% (m/m) de cobre com resposta de 7 segundos, no entanto, a sensibilidade foi dependente da natureza de cada aminoácido analisado. Os autores determinaram 17 aminoácidos obtendo limites de quantificação na faixa de 7,0 µmol L⁻¹ a 1,0 mmol L⁻¹ (LUQUE; FERREYRA; RIVAS, 2007).

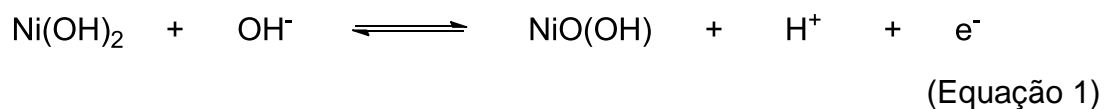
Majid e colaboradores (2007) empregaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com o complexo Ni²⁺-curcumina para a oxidação catalítica dos aminoácidos alanina, glicina, lisina, fenilalanina e arginina. O potencial aplicado foi de 0,4 V e NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi utilizado como eletrólito suporte. Com o sensor desenvolvido, os autores mostraram um aumento na corrente anódica no potencial de oxidação do níquel devido a eletrooxidação dos aminoácidos através de um

mecanismo electrocatalítico, possibilitando a detecção de alanina, fenilalanina, glicina, lisina e arginina (MAJID *et al.*, 2007).

Em 2008, Vidotti, Torresi e Kubota utilizaram um eletrodo de platina modificado com um filme de hidróxido de níquel dopado com os metais cobalto e cádmio na proporção 77:20:03 (% mol) depositados electroquimicamente sobre a superfície do eletrodo para determinação de glicina. O potencial aplicado neste trabalho foi de 0,45 V e hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹ foi utilizado como eletrólito suporte. O limite de quantificação obtido foi de 110,0 µmol L⁻¹ (VIDOTTI; TORRESI; KUBOTA, 2008).

Ainda, em 2008 Vidotti e colaboradores desenvolveram um sensor para determinação de ureia baseado em hidróxido de níquel/cobalto. Os autores utilizaram ITO (óxido de estanho dopado com índio) como substrato depositando sobre sua superfície um filme de hidróxido de níquel/cobalto. As medidas electroquímicas foram realizadas aplicando um potencial de 0,5 V e uma solução de hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹ foi utilizada como eletrólito suporte. O sensor desenvolvido mostrou propriedades electrocatalíticas para a oxidação de ureia, mostrando um comportamento linear na faixa de 0,1 a 20,0 mmol L⁻¹. Ainda, a modificação com o hidróxido proporcionou um aumento da área superficial do eletrodo (VIDOTTI *et al.*, 2008).

O uso de hidróxido de níquel em modificações de eletrodos tem chamado a atenção por este apresentar alta atividade electrocatalítica, principalmente em sua forma oxidada NiO(OH) (óxido hidróxido de níquel), em relação à electrooxidação de compostos orgânicos que apresentam grupos OH e NH₂ em sua estrutura, como por exemplo, os aminoácidos (CATALDI; CENTONZE; RICCIARDI, 1995; CISZEWSKI *et al.*, 2003; DEO; LAWRENCE; WANG, 2004; VIDOTTI; TORRESI; KUBOTA, 2008; ZHENG; SONG, 2009). A presença de orbitais *d* incompletos permite a oxidação de moléculas orgânicas quando em contato com o NiO(OH). A Equação 1, apresenta a formação da espécie NiO(OH) à partir de Ni(OH)₂ depositado sobre a superfície do eletrodo.



A utilização de Ni(OH)_2 para a construção de sensores também tem se mostrado atraente devido à facilidade de modificação, como a formação de filmes finos sobre a superfície dos eletrodos empregando eletrodeposição, no entanto, seu uso torna-se limitado para algumas moléculas devido ao pH elevado (pH maior que 10), o qual é necessário para que apresente atividade catalítica (VIDOTTI; TORRESI; CÓRDOBA DE TORRESI, 2010).

Dessa forma, o emprego de eletrodos modificados com hidróxido de níquel para detecção de aminoácidos torna-se interessante como uma alternativa para seu uso no desenvolvimento de novos métodos para detecção de sarcosina frente ao uso de métodos que envolvam processos de derivatização.

Ainda, como abordado por Zen e colaboradores (2004), eletrodos impressos (SPe) quimicamente modificados com metais podem ser utilizados na determinação de aminoácidos como uma alternativa ao uso de eletrodos convencionais. Os eletrodos impressos são fabricados utilizando a tecnologia “*screen-printing*”, que possibilita a produção em massa de eletrodos com baixo custo. Os SPe são elaborados pelo depósito de uma fina camada de carbono, prata, ouro ou platina sobre um suporte inerte, comumente policloreto de vinila (PVC) ou cerâmica de alumina e, em seguida, uma camada parcial de um isolante é empregada para definir o contato elétrico em uma extremidade e em outra para ser a superfície do eletrodo (NASCIMENTO; ANGNES, 1998; BARTON *et al.*, 2016).

Além disso, no mesmo suporte, são impressos os três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência) (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016). Os eletrodos de trabalho são comumente fabricados utilizando carbono por este ser quimicamente inerte (LI *et al.*, 2012). Ainda, os eletrodos impressos podem ser facilmente modificados (NASCIMENTO; ANGNES, 1998; RENEDO; ALONSO-LOMILLO; MARTÍNEZ, 2007), com o intuito de melhorar a seletividade e/ou sensibilidade (SOUZA, 1997). E, em função de sua portabilidade, podem ser acoplados em células de fluxo em sistema de análise por injeção em fluxo.

A análise por injeção em fluxo, conhecida como sistema FIA, foi proposta por Jaromir Ruzicka em 1975 e baseia-se em um processo de mecanização de procedimentos analíticos, em que a solução (amostra) é introduzida em um fluido transportador (solução carregadora) sendo levada até o sistema de detecção. Durante o processo de transporte, a amostra ainda pode receber reagentes, assim

como sofrer reações químicas e ser submetida à etapa de separação, concentração, entre outros.

A configuração mais simples do sistema por análise em injeção em fluxo é o sistema FIA em linha única, em que a mistura da amostra com a solução carregadora ocorre por meio do processo de dispersão, à medida que esta é transportada para o detector, podendo afetar a intensidade do sinal analítico (REIS, 1996; CATARINO *et al.*, 2003).

A associação de eletrodos impressos com análise por injeção em fluxo possibilita análises precisas, permitindo melhorias na frequência analítica do método. Além disso, o sistema FIA com detecção eletroquímica proporciona maior estabilidade na resposta do detector devido ao menor tempo de contato entre a amostra e o eletrodo de trabalho (CATARINO *et al.*, 2003; STEFANO *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a utilização de um eletrodo impresso modificado com hidróxido de níquel torna-se atraente quando associado ao sistema FIA com detecção eletroquímica para determinação de sarcosina, mostrando-se como uma alternativa aos métodos normalmente utilizados, por apresentar rapidez, baixo custo e menor geração de resíduos.

Porém, tendo em mente que a sarcosina usualmente é detectada em baixas concentrações em amostras de urina e visando aumentar a detectabilidade do método e eliminar possíveis efeitos de matriz, técnicas de extração/pré-concentração podem ser utilizadas empregando materiais sorventes que apresentem seletividade à molécula alvo.

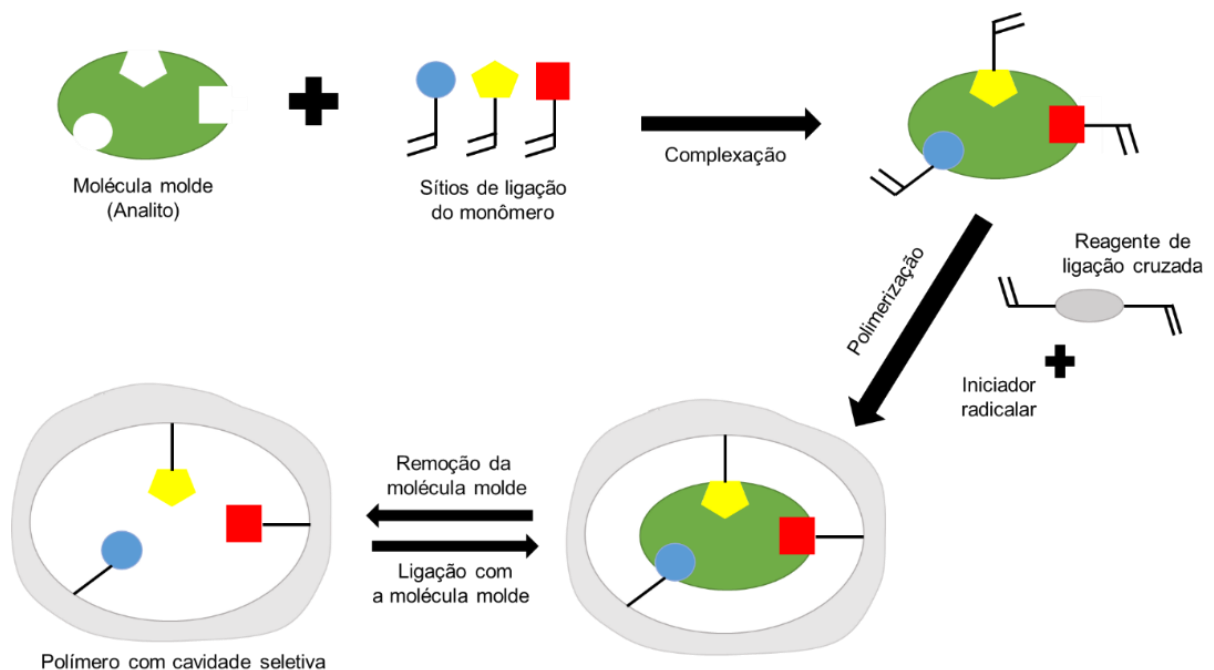
2.3 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

A interação biomolecular do tipo antígeno-anticorpo despertou o interesse dos pesquisadores devido à seletividade que apresentam. A teoria da formação dos anticorpos de Pauling (1940) indicava que o antígeno se comportava como uma molécula molde e os anticorpos se moldavam ao redor desta molécula apresentando uma configuração seletiva (PAULING, 1940). A partir das ideias de Pauling, em 1949 Dickey sintetizou um sorvente seletivo para uma molécula específica (DICKEY, 1949). Desde então, observa-se uma busca por materiais sintéticos com sítios seletivos de reconhecimento a fim de melhorar a seletividade para analitos de interesse.

Polímeros sintéticos com impressão molecular, conhecidos como MIP, tem chamado atenção por apresentarem vantagens como seletividade, simplicidade de preparo, estabilidade e armazenamento, robustez e baixo custo (YAN; ROW, 2006; CHEN *et al.*, 2016).

Normalmente, o MIP é preparado pela interação entre uma molécula molde (analito) com um monômero funcional em um solvente adequado, com posterior adição de um agente reticulante e um iniciador radicalar. Em seguida, para iniciar a reação de polimerização, esta mistura é irradiada com luz UV ou submetida à calor (YAN; ROW, 2006). Por fim, a molécula molde é removida da matriz polimérica por meio de um solvente adequado. A representação do processo de síntese dos MIP é mostrada na Figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática do processo de síntese dos MIP.



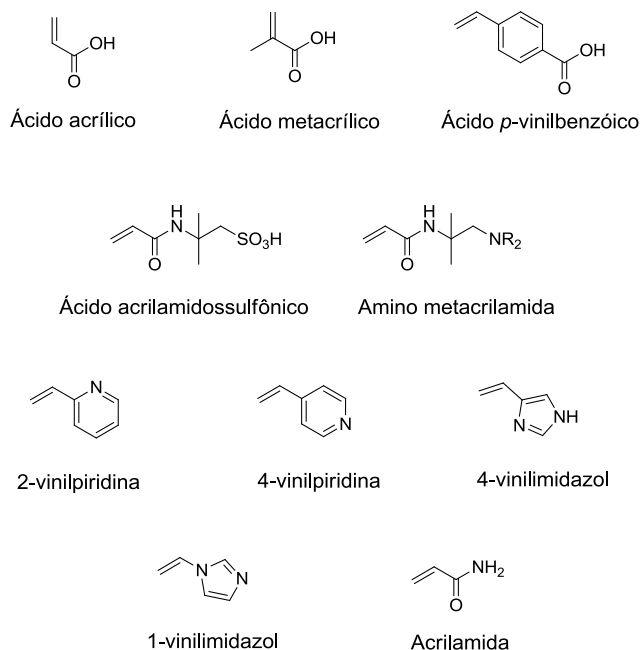
Fonte: Adaptado de Chen *et al.*, 2016.

A reação de polimerização pode ser afetada por fatores como tipo e quantidade de monômero funcional, reticulante, iniciador radicalar, solvente, temperatura e tempo de reação (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

A molécula utilizada como molde (template) deve apresentar grupos funcionais capazes de formar um complexo com o monômero funcional antes da reação de polimerização e não conter grupos funcionais que acelerem ou retardem a reação, como o grupo tiol (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN; XU; LI, 2011).

O monômero funcional comumente é composto pela unidade de reconhecimento e pela unidade polimerizável, sendo a escolha do monômero funcional uma etapa importante na síntese de MIP, pois este deve interagir fortemente com o template, formando um complexo específico por meio de diferentes tipos de interação com a molécula molde. Na Figura 5 são apresentados os monômeros mais comuns utilizados para obtenção de MIP.

Figura 5 – Estrutura química dos monômeros funcionais mais utilizados na síntese de MIP.



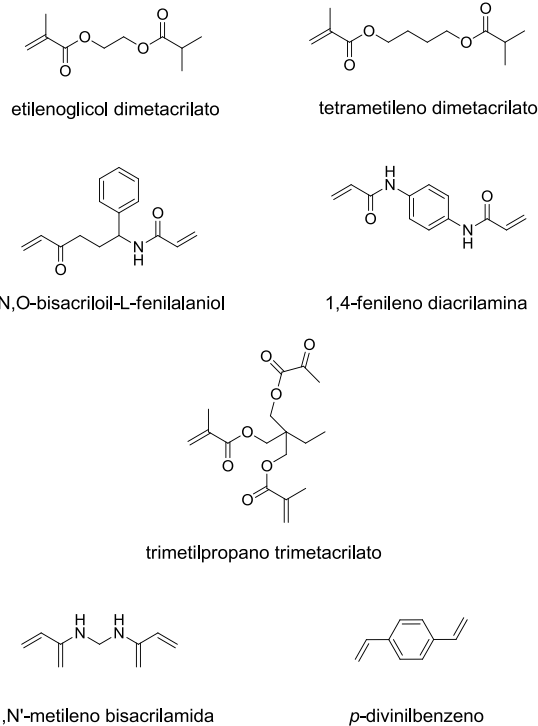
Fonte: o próprio autor.

Recomenda-se que a quantidade de monômero funcional na síntese seja superior à molécula molde (fração molar 4:1), garantindo que o equilíbrio da reação seja deslocado para a formação de um maior número de sítios seletivos no material (ANDERSSON; SELLERGREN; MOSBACH, 1984; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN *et al.*, 2016).

O papel do agente de ligação cruzada é fixar os monômeros funcionais em torno da molécula molde, proporcionando a formação de uma matriz polimérica rígida e reticulada. A quantidade de reticulante deve ser alta a fim de manter a estabilidade dos sítios de reconhecimento formados (YAN; ROW, 2006; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN *et al.*, 2016).

A estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada normalmente empregados na síntese de MIP estão apresentados na Figura 6. Dentre os reticulantes utilizados, a ênfase é dada ao emprego de etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) devido à sua capacidade térmica e mecânica altamente estável e por possibilitar uma transferência de massa rápida durante o processo de síntese. No entanto, MIP preparados utilizando agentes reticulantes trifuncionais, como o TRIM por exemplo, tem se mostrado superiores quando comparados com os preparados com EGDMA, podendo conferir maior capacidade de sorção ao polímero formado (KEMPE, 1996; YAN; ROW, 2006; RENKECZ *et al.*, 2013).

Figura 6 – Estrutura química dos agentes de ligação cruzada normalmente empregados na síntese de MIP.

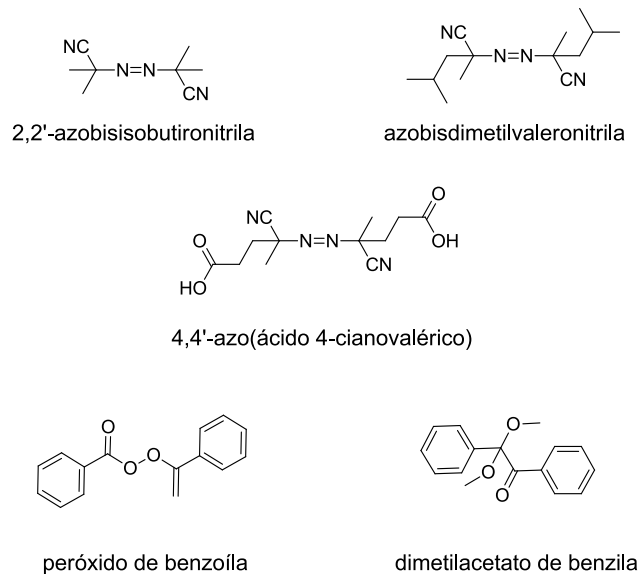


Fonte: o próprio autor.

Os iniciadores radiculares são responsáveis por iniciar a reação de polimerização, no entanto, torna-se necessário um estímulo para a iniciação como incidência de luz UV ou temperatura. Dentre os iniciadores, os mais comuns são os compostos peróxidos e os compostos azo, apresentados na Figura 7, sendo o AIBN (2,2'-azobisisobutironitrila) o mais comum.

A escolha do iniciador radicalar deve ser cuidadosa, pois os demais reagentes da síntese, como molécula molde, monômero funcional e agente de ligação cruzada podem ser termossensíveis ou fotossensíveis. Ainda, para garantir que a polimerização ocorra, há a necessidade de eliminar o oxigênio do ambiente da síntese por meio do borbulhamento de um gás inerte, como nitrogênio ou argônio, visto que o oxigênio pode retardar a formação de radicais (CORMACK; ELORZA, 2004; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a; YAN; ROW, 2006).

Figura 7 – Estrutura química dos iniciadores radiculares usualmente utilizados na síntese de MIP.



Fonte: o próprio autor.

Os solventes desempenham um papel fundamental no processo de síntese dos polímeros molecularmente impressos. Sua função é dissolver os reagentes utilizados na síntese e atuar como agente formador de poros durante a polimerização. No entanto, o solvente não deve interferir durante a formação do complexo molécula molde-monômero funcional, a fim de não prejudicar a obtenção de sítios de ligação seletivos (YAN; ROW, 2006; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN *et al.*, 2016). Dessa forma, o solvente mais adequado deve ser apolar, aprótico e apresentar baixa constante dielétrica (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005a), como clorofórmio, por exemplo.

Ainda, é importante destacar que o volume de solvente empregado está relacionado com a estabilidade mecânica e com a quantidade de poros no MIP. Assim, quando o solvente apresenta baixa afinidade com o monômero funcional, a polimerização resultará na formação de poros e partículas maiores, facilitando a transferência de massa do analito aos sítios seletivos. Porém, quando o solvente possui maior afinidade com o monômero funcional, haverá a formação de poucos poros e partículas pequenas, dificultando a interação entre a molécula molde e o monômero funcional (CORMACK; ELORZA, 2004; YU *et al.*, 2013).

Os dois principais tipos de interação para obtenção de MIP se dão por interações covalentes e interações não-covalentes. Wulff e Sarhan (1972) desenvolveram um MIP para ácido glicérico baseado em interações covalentes entre o monômero funcional e a molécula molde. O material sintetizado apresentou elevada seletividade, resultado da forte ligação formada entre monômero funcional e molécula molde (WULFF; SARHAN, 1972). No entanto, este tipo de abordagem dificulta o processo de eluição da molécula da matriz polimérica, sendo necessário em alguns casos, procedimentos drásticos de hidrólise para clivar as ligações covalentes formadas (YAN; ROW, 2006; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

Em 1981, Arshady e Mosbach sintetizaram um MIP que interagiu com a molécula molde por meio de ligações não-covalentes (ARSHADY; MOSBACH, 1981). Esse tipo de abordagem tem sido mais utilizado devido à fatores como simplicidade de síntese e facilidade de remoção do template do polímero, pois esta abordagem baseia-se na formação de interações relativamente fracas, como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre o molde e o monômero (CHEN *et al.*, 2016). Porém, resultam em um polímero menos seletivo quando comparado com os obtidos por interações covalentes, pois as interações entre o monômero e o template são mais fracas (YAN; ROW, 2006).

As metodologias mais amplamente utilizadas para síntese de MIP são polimerização em *bulk*, polimerização por suspensão e polimerização por precipitação. Na polimerização em *bulk* a reação é realizada em sistema homogêneo, em que num frasco são dissolvidos, em um solvente adequado, a molécula molde e o monômero funcional, com posterior adição do agente de ligação cruzada e do iniciador radicalar, a fim de promover a reação de polimerização. Esse tipo de síntese resulta em um polímero de consistência rígida, que deve ser moído, peneirado e lavado para a remoção do template. Devido ao emprego do processo de moagem e peneiramento, os materiais obtidos por meio deste tipo de polimerização apresentam partículas com forma e tamanhos irregulares. Ressalta-se que essa metodologia é simples e não requer instrumentação sofisticada (YAN; ROW, 2006; CHEN *et al.*, 2016).

Na polimerização por suspensão, há a formação de uma emulsão, em que primeiramente, molécula molde, monômero funcional, agente de ligação cruzada e iniciador radicalar são dissolvidos em um solvente orgânico para em seguida ser adicionada uma fase dispersiva. Normalmente um tensoativo é utilizado para

prevenir a coalescência e a tensão entre as fases. Por conseguinte, a emulsão é agitada e submetida à banho-maria, a fim de promover a polimerização. Nessa metodologia, as partículas MIP ficam em suspensão com a fase dispersiva (normalmente água), resultando em um polímero com partículas uniformes (YAN; ROW, 2006; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN *et al.*, 2016). Entretanto, esse procedimento torna-se demorado, devido às várias etapas necessárias e as soluções aquosas utilizadas como fase dispersiva podem interferir no processo de impressão, diminuindo a seletividade do material (WANG *et al.*, 2011; HAGINAKA; TABO; MATSUNAGA, 2012; HIRATSUKA *et al.*, 2013).

A polimerização por precipitação assemelha-se à polimerização em *bulk*, mas faz uso de um maior volume de solvente porogênico. A mistura entre reagentes (molécula molde, monômero funcional, agente de ligação cruzada e iniciador radicalar) e solvente é desgaseificada e deixada em banho-maria por 24 horas à 60 °C. A reação de polimerização resulta da captura de oligômeros da solução, e a precipitação ocorre quando a microesfera formada adquire uma densidade maior que a solução. Dessa forma, há a formação de partículas uniformes e maiores rendimentos, no entanto, devido ao alto fator de diluição utilizado, uma maior quantidade de molécula molde é necessária (YAN; ROW, 2006; CHEN *et al.*, 2016).

Devido às características apresentadas pelos MIP, seu uso como material sorvente empregado em etapas de preparo de amostras tem sido relatado na literatura com o intuito de pré-concentrar e/ou extrair o analito da amostra visando aumentar a seletividade e a detectabilidade do método (CALDAS *et al.*, 2011).

2.4 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E SARCOSSINA

A determinação de aminoácidos foi introduzida por Moore e Stein (1951) envolvendo a separação em uma resina de troca iônica usando diferentes tampões como eluentes. A detecção dos aminoácidos era realizada por meio de colorimetria pós-coluna utilizando ninidrina para derivatização (MOORE; STEIN, 1951).

Em busca de novos materiais para separação de aminoácidos, a literatura tem relatado o uso de polímeros impressos como fase estacionária para separação de seus enantiômeros, pois estes materiais apresentam capacidade de prever a

ordem de eluição do enantiômero quando comparados às fases comerciais tradicionais (KHAN; KHAN; PARK, 2008).

Em 1989, O'Shannessy e colaboradores sintetizaram um MIP para L-fenilalanina empregando ácido metacrílico como monômero funcional, EGDMA como agente de ligação cruzada, AIBN como iniciador radicalar e clorofórmio como solvente porogênico. O material foi usado como fase estacionária em HPLC para separar os enantiômeros da molécula impressa. Os autores utilizaram acetonitrila:ácido acético (ACN:HAc 9:1, v/v) como eluente e demonstraram a versatilidade do MIP para separar misturas racêmicas de moléculas diferentes da molécula molde (O'SHANNESY *et al.*, 1989).

Em outro trabalho, Kempe e Mosbach (1995) sintetizaram polímeros utilizando polimerização em *bulk* a fim de utilizá-los como fase estacionária seletiva de HPLC para derivados dos aminoácidos fenilalanina, asparagina, alanina e glutamina. Os autores utilizaram ácido metacrílico ou 4-vinilpiridina (4-VP) como monômero funcional, EGDMA ou TRIM como agente de ligação cruzada e AIBN como iniciador radicalar. A reação de polimerização foi iniciada por irradiação durante 24 horas em 366 nm. Os polímeros foram triturados e peneirados e o molde foi extraído com uma mistura de MeOH:HAc (9:1, v/v), MeOH:ácido tetrahydrofurano acético (7:3, v/v) ou MeOH:ácido metanolacético (7:3, v/v). A melhor separação foi obtida com o polímero sintetizado com ácido metacrílico como monômero funcional, EGDMA como agente de ligação cruzada, clorofórmio como solvente porogênico, MeOH:HAc (9:1, v/v) para extrair o template e L-fenilalanina como molécula molde. Os polímeros sintetizados foram facilmente preparados, de baixo custo e apresentaram estabilidade química e mecânica (KEMPE; MOSBACH, 1995).

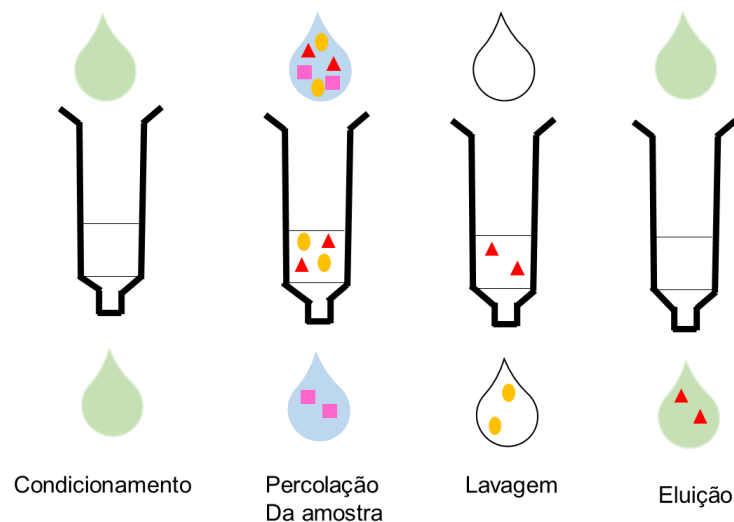
Em 2008, Khan, H.; Khan, T. e Park também sintetizaram um MIP para ser utilizado como fase estacionária em HPLC com o objetivo de separar enantiômeros. O MIP foi preparado por polimerização por suspensão utilizando D-fenilalanina como molécula molde, ácido metacrílico como monômero funcional, EGDMA como agente de ligação cruzada, AIBN como iniciador radicalar e tolueno como solvente porogênico. O template foi extraído com uma mistura de ácido acético e água. Ácido trifluoroacético foi utilizado como fase dispersiva e, SDS e poli(álcool vinílico) (PVA) foram empregados como tensoativos. O material foi empacotado em uma coluna de aço inoxidável vazia a qual foi utilizada para separação dos enantiômeros da fenilalanina.

A principal vantagem de se utilizar um MIP como fase estacionária é que o molde utilizado para síntese do material determina qual enantiômero será mais fortemente retido pelo polímero (KHAN; KHAN; PARK, 2008). Neste trabalho, não foi necessário o uso de derivatização para determinação dos aminoácidos.

Neste contexto, pesquisadores tem utilizado a abordagem MIP para extração/pré-concentração de aminoácidos a fim de aumentar a seletividade e detectabilidade do método.

A Extração em Fase Sólida (SPE) foi introduzida por volta de 1970 destacando-se como uma das técnicas de extração mais comumente utilizadas. Nesta técnica, o analito de interesse contido na matriz da amostra é retido após a passagem da solução (amostra) por um cartucho contendo um sorvente, e, em seguida um solvente é utilizado para a eluição do analito. Ainda, uma etapa de lavagem pode ser adicionada no procedimento com o objetivo de eliminar possíveis interferentes presentes na matriz da amostra. Na Figura 8 é apresentado o esquema representativo do processo de extração em fase sólida.

Figura 8 – Representação do processo de SPE.



Fonte: Adaptado de Caldas *et al.*, 2011.

A SPE apresenta vantagens como praticidade e baixo custo, além de poder ser empregada em processos de pré-concentração do analito alvo com o uso de um baixo volume do solvente de eluição, possibilitando melhorias na detectabilidade do

método (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001; CALDAS *et al.*, 2011). Comercialmente, há diversos sorventes sólidos disponíveis como sílica gel, alumina, carvão ativado, Florisil® (silicato de magnésio), octadecil (C18), resina trocadora aniônica e catiônica, entre outros. Porém, estes materiais apresentam desvantagens como baixa seletividade e baixa reutilização (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005b; JARDIM, 2010; CALDAS *et al.*, 2011).

A aplicação de MIP na extração em fase sólida, denominada Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (MISPE) é uma alternativa ao método SPE para pré-concentração de moléculas alvo em matrizes complexas (BAGGIANI *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2009; LUCCI *et al.*, 2010; XU; FANG; WANG, 2010).

Em 2014, Song e colaboradores sintetizaram um MIP para glutatona por polimerização por precipitação. No processo de síntese, glutatona foi utilizada como template, 4-VP como monômero funcional, EGDMA como reticulante, ACN:água (9:1, v/v) como solvente porogênico e BDC (N,N-dietilditiocarbamato) como iniciador radicalar. O material obtido foi lavado em soxhlet durante 48 horas com uma mistura de EtOH:água:HAc (70:28:2, v/v/v) para extração da molécula molde.

O procedimento MISPE utilizado pelos autores consistiu de um cartucho SPE empacotado com 200,0 mg do MIP, ACN:água (7:3, v/v) foi utilizado para condicionar o cartucho e 50,0 mL de uma solução de glutatona 50,0 mg L⁻¹ foi percolada pelo cartucho. A lavagem foi realizada com 3,0 mL de ACN:água (7:3, v/v) e a eluição com 3,0 mL de EtOH:água:HAc (70:28:2, v/v/v). A análise foi feita por HPLC usando derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato (PITC). O pH ótimo para sorção do analito foi igual a 7,0 e o método apresentou um limite de detecção de 1,63 µmol L⁻¹ (SONG *et al.*, 2014).

Hashemi-Moghaddam; Toosi, Mojtaba e Toosi, Mahbobe (2015) sintetizaram um MIP para ser usado em SPE para extração e pré-concentração de glicina. O polímero foi sintetizado na superfície de sílica modificada empregando glicina como molécula molde, ácido metacrílico como monômero funcional, EGDMA como reticulante, AIBN como iniciador radicalar e ACN como solvente porogênico. O template foi extraído com uma mistura de MeOH:HAc (9:1, v/v). O procedimento MISPE foi realizado empacotando 200,0 mg do material em um cartucho SPE. Inicialmente, o cartucho foi condicionado com 5,0 mL de ACN e 5,0 mL de água, a percolação foi feita com 5,0 mL de uma solução de glicina 0,01 mol L⁻¹, a lavagem foi realizada com 1,0 mL de acetonitrila e a eluição com 2,0 mL de água:EtOH (1:1, v/v).

As etapas de condicionamento, percolação da amostra e eluição foram feitas com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, e o pH ótimo para sorção foi igual a 7,0.

A determinação de glicina em urina foi realizada utilizando ninidrina como agente derivatizante e Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis em 570 nm. Os autores concluíram que o MIP sintetizado sobre a superfície da sílica apresentou afinidade e seletividade para glicina (HASHEMI-MOGHADDAM; TOOSI; TOOSI, 2015).

Em 2016, Zhu e colaboradores desenvolveram um método MISPE para sorção de 18 aminoácidos em tabaco e em fumaça de tabaco. Na síntese do material impresso, teanina foi empregada como molécula molde, ácido metacrílico como monômero funcional, EGDMA como agente de ligação cruzada, AIBN como iniciador radicalar e, tolueno e água como solvente porogênico. O MIP foi suportado na superfície de sílica para aumentar a acessibilidade dos analitos às cavidades de reconhecimento. Após a síntese, a remoção do molde foi feita por soxhlet com MeOH:água (9:1, v/v). No processo MISPE, o cartucho foi empacotado com 100,0 mg do material e condicionado com 5,0 mL de MeOH e água. Em seguida, foi feita a percolação de 10,0 mL dos 18 aminoácidos ($500,0 \text{ ng mL}^{-1}$) e a eluição foi realizada com 6,0 mL de HAc:água (0,5:100). O eluato obtido foi evaporado e recuperado em 1,0 mL de HAc:água (0,5:100). A análise foi realizada utilizando derivatização com posterior separação cromatográfica (HPLC-UV) (ZHU *et al.*, 2016).

No que diz respeito à sarcosina, a literatura encontra-se escassa no uso de MIP para sua extração e/ou pré-concentração, havendo apenas um trabalho abordando a metodologia MISPE. Neste trabalho, os autores Hashemi-Moghaddam, Rahimian e Niromad (2013) sintetizaram um MIP para sarcosina utilizando ácido metacrílico como monômero funcional, EGDMA como agente reticulante, AIBN como iniciador radicalar, ACN:água (4:1, v/v) como solvente porogênico e sarcosina como molécula molde.

Para o procedimento MISPE, 200,0 mg do material foram empacotados em um cartucho SPE, seguido do condicionamento utilizando 5,0 mL de ACN e 5,0 mL de água. Foram percolados pelo cartucho 5,0 mL de uma solução de sarcosina $11,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o cartucho foi lavado com 1,0 mL de acetonitrila. Para eluição foi utilizada uma mistura de 2,0 mL de água:EtOH (1:1, v/v) com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Foi realizado o procedimento de adição e recuperação em amostras de urina e, para a determinação de sarcosina os autores utilizaram o

método de derivatização por ninidrina e as medidas foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis em 570 nm. O método apresentou recuperação de sarcosina de $87,2 \pm 1,2\%$ a partir do procedimento de adição e recuperação em amostras de urina nas concentrações de $56,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $112,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (HASHEMI-MOGHADDAM; RAHIMIAN; NIROMAND, 2013). No entanto, os autores não informam as características analíticas do método utilizado, como limite de detecção, limite de quantificação e faixa linear.

Ainda, há outros dois trabalhos que utilizam MIP para sorção de sarcosina. No trabalho de Moein; Abdel-Rehim, A. e Abdel-Rehim, M. (2015), os autores empregaram um polímero de impressão molecular em microextração por sorvente empacotado (MEPS, do Inglês *Microextraction by Packed Sorbent*) para determinação de sarcosina em fluidos biológicos utilizando HPLC-MS/MS. No preparo do MIP, glicina foi utilizada como molécula modelo, ácido metacrílico como monômero funcional, sendo AIBN o iniciador radicalar, EGDMA o agente de ligação cruzada e acetonitrila o solvente porogênico. A capacidade de sorção do MIP foi de $320,0 \text{ mg g}^{-1}$. Os autores encontraram em média $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina na urina de pacientes que apresentavam a doença e $0,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ na urina de pacientes saudáveis. (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015). Porém, apesar da alta capacidade de sorção apresentada pelo material, os autores não realizaram estudos de sorção competitiva com sarcosina e seus interferentes.

Em outro trabalho, Hashemi-Moghaddam e Hagigatgoo (2015) utilizaram uma fibra monolítica molecularmente impressa baseada na microextração em fase sólida (SPME) para determinação de sarcosina em amostras de urina utilizando Cromatografia a Gás com Detector de Ionização de Chama (GC-FID, do inglês *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*). Na elaboração da fibra, a sarcosina foi utilizada como template, ácido metacrílico como monômero funcional, EGDMA como agente de ligação cruzada e AIBN como iniciador radicalar, sendo empregado acetonitrila como solvente porogênico. O método apresentado obteve um limite de quantificação de $12,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (HASHEMI-MOGHADDAM; HAGIGATGOO, 2015). Contudo, a fibra elaborada pelos autores, pode apresentar baixa estabilidade frente à sua utilização em GC-FID, devido à alta temperatura necessária para a dessorção ($250 \text{ }^\circ\text{C}$). Além disso, o limite de quantificação obtido ($12,4 \mu\text{mol L}^{-1}$) não é suficiente para determinação de sarcosina em amostras de urina de pacientes com CaP.

Tendo em vista a escassez na síntese de MIP para sarcosina no desenvolvimento de métodos MISPE, e sabendo da importância do desenvolvimento de novos métodos para a detecção desta molécula, por esta ser um potencial biomarcador não invasivo no diagnóstico do câncer de próstata, torna-se interessante a síntese de novos materiais que proporcionem maior seletividade.

Em 2003, Zhang e colaboradores sintetizaram um MIP para o aminoácido tirosina por polimerização por suspensão. Neste trabalho, os autores utilizaram 2-vinilpiridina (2-VP) e ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPS) como monômeros funcionais, TRIM foi usado como agente de ligação cruzada e PVA como dispersante. Os autores observaram que a associação destes monômeros proporcionou melhor reconhecimento à molécula molde quando comparado com materiais impressos com apenas um monômero (ZHANG *et al.*, 2003).

Nesse contexto, sabendo que a sarcosina contém em sua estrutura um grupo amino e um grupo carboxílico, apresentando caráter anfótero, a síntese de MIP para sarcosina utilizando mais de um monômero funcional chama atenção por estes poderem interagir com a molécula via interações eletrostáticas, possibilitando melhorias na seletividade do material desenvolvido.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho do poli(ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico-co-vinilpiridina) (MIP-AMPS-VP) como material sorvente em SPE para a pré-concentração de sarcosina e posterior detecção eletroquímica em sistema de injeção em fluxo, empregando um sensor eletroquímico baseado em MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de oxidação de Ni(OH)₂ e a proporção da suspensão de MWCNT/Nafion[®] utilizada para a modificação do eletrodo em sistema FIA;
- Otimizar os parâmetros do sistema FIA como concentração e vazão da solução carregadora, e volume da alça de amostragem;
- Avaliar a reprodutibilidade do sensor;
- Investigar o desempenho analítico do sensor;
- Avaliar os interferentes;
- Caracterizar o MIP sintetizado utilizando as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura, fisissorção de gás N₂ à 77 K e análise elementar;
- Otimizar o pH para a sorção de sarcosina no MIP-AMPS-VP em meio aquoso;
- Avaliar a sorção do MIP e do respectivo polímero não impresso (NIP);
- Otimizar a massa do polímero utilizada em SPE;
- Estudar o solvente de eluição e otimizar a vazão de pré-concentração;
- Desenvolver uma metodologia analítica de pré-concentração de sarcosina utilizando MIP-AMPS-VP como sorvente de MISPE;
- Avaliar os interferentes utilizando o método MISPE;
- Aplicar o método desenvolvido em amostra de urina sintética.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os reagentes adquiridos da marca Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha) foram: sarcosina (SAR, ≥98,0%), ninidrina (C₉H₆O₄, ≥98,0%), Nafion® 5,0%, N, N – dimetilformamida (DMF, ≥99,8%), sulfato de níquel hexahidratado (NiSO₄•6H₂O, ≥98,0%), ácido nítrico (HNO₃, ≥65,0%), ácido sulfúrico (H₂SO₄, ≥98,0%), ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico (AMPS, ≥99,0%), 4-vinilpiridina (4-VP, ≥95,0%), trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN, ≥98%), acetona (C₃H₆O, ≥99,9%), brometo de potássio (KBr, ≥99,0%), ácido acético (HAc, ≥99,0%), ácido úrico (AU, ≥99,0%), cloreto de potássio (KCl, ≥99,0%) e cloreto de sódio (NaCl, ≥99,5%). Da marca J. T. Baker® foi adquirida a acetonitrila (ACN, ≥99,0%), da Panreac® o metanol (MeOH, ≥99,9%) e da Anidrol® o ácido clorídrico (HCl, ≥36,5%). Glicina (GLI, ≥99,0%) e alanina (ALA, ≥99,0%) foram adquiridas da Synth®. Da Caal foi adquirida a ureia (URE, ≥99,0%), e, prolina (PRO, ≥99,0%), creatinina (CRE, ≥98,0%), creatina (C₄H₉N₃O₂•H₂O, ≥99,0%) e cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂•6H₂O, ≥99,0%) foram adquiridas da Merck®. Cloreto de cálcio (CaCl₂, ≥99,0%) e fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄, ≥98,0%) foram adquiridos da Nuclear. Citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇, ≥99,0%) foi adquirido da Chemco®.

Hidróxido de sódio (NaOH, ≥99,0%), acetato de sódio anidro (CH₃COONa, ≥99,0%) e sulfato de sódio (Na₂SO₄, ≥99,0%), foram obtidos da Vetec® e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram adquiridos da empresa CNT Co. Ltda. Yeonsu-Gu, Incheon, Korea 93,0%, diâmetro de 10-40 nm e comprimento de 5-20 µm. Seiscentos miligramas dos MWCNT foram oxidados utilizando 60,0 mL de uma mistura de HNO₃/H₂SO₄ (3:1, v/v) em refluxo à 65 °C durante 2 horas. Posteriormente, o material foi lavado exaustivamente com água até pH aproximadamente igual à 7,0 e seco à 60 °C em estufa.

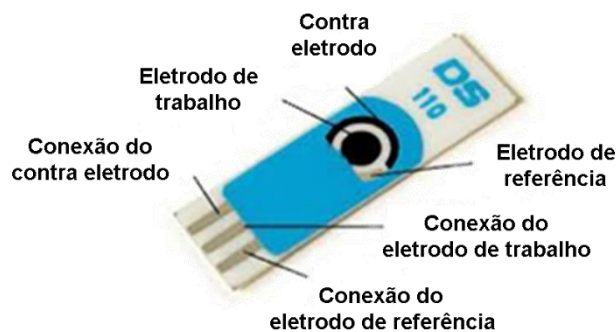
A solução estoque de sarcosina foi preparada utilizando água ultrapura e a solução tampão acetato de sódio foi feita a partir da dissolução de seu sal em água ultrapura. Todas as soluções empregadas neste estudo foram preparadas utilizando água ultrapura obtida pelo sistema de purificação Elga® (Bedford, USA) com resistividade de 18,2 MΩ cm.

4.2 EQUIPAMENTOS

As medidas eletroanalíticas foram realizadas em um Potenciostato/galvanostato modelo PGSTAT 101 da Autolab interfaciado a um microcomputador e gerenciado pelo programa computacional GPES 4.9, utilizando a técnica cronoamperométrica para a determinação de sarcosina.

O eletrodo impresso de carbono utilizado neste trabalho para as medidas eletroquímicas foi adquirido da Metrohm® e é constituído por três eletrodos em um único sistema: o eletrodo de trabalho (tinta de carbono, 4 mm de diâmetro), o eletrodo de referência (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar (tinta de carbono) impressos no mesmo suporte (Figura 9).

Figura 9 – Eletrodo impresso de carbono.



O eletrodo impresso de carbono foi modificado com MWCNT/Nafion®/Ni(OH)₂ conforme a Seção 4.3. A dispersão de MWCNT na presença de Nafion® foi realizada utilizando um banho ultrassônico da marca QUIMIS (Modelo Q335D2) durante 30 minutos. Cabe ressaltar que a oxidação dos MWCNT foi feita a fim de melhorar a dispersão destes no preparo da suspensão e eliminar possíveis impurezas de metais remanescentes no processo empregado para sua síntese (BEKYAROVA *et al.*, 2004; KIM; SIGMUND, 2004; JANEGITZ *et al.*, 2009).

Para as medidas de pH foi empregado um pHmetro Metrohm modelo 827 e uma estufa da marca SPLabor modelo SP-100/A foi utilizada para a secagem dos materiais.

As caracterizações morfológicas da superfície dos eletrodos foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Philips® FEI Quanta 200 (FEI Company, Scientific and Technical Instruments, Oregon, USA) equipado com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS, do inglês *Dispersive Energy Spectroscopy*) nas ampliações de 45, 400, 6000 e 50000 vezes. Para análise de MEV, a superfície dos eletrodos foram metalizadas com uma fina camada de ouro de 30 nm empregando o equipamento Sputtern Coatter Leica® Bal-Tec Med 020 (Wetzlar, Alemanha). As análises foram realizadas pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina. Vale salientar, que a análise de EDS foi empregada para obtenção de informações qualitativas em relação à composição elementar dos átomos de carbono e níquel na superfície dos eletrodos.

Um banho-maria modelo MA 127 da marca Marconi e um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis modelo UV mini 1240 da Shimadzu® foram utilizados para o método de derivatização por ninidrina para monitoramento da remoção da molécula molde no processo de síntese do polímero.

4.3 MODIFICAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO

A modificação do eletrodo foi realizada segundo Deo e colaboradores (DEO; LAWRENCE; WANG, 2004) com algumas adaptações. O eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion®/Ni(OH)₂ foi preparado, inicialmente, pela suspensão de MWCNT oxidado com Nafion® e DMF. Neste trabalho, DMF foi escolhido como solvente para o preparo da suspensão por possibilitar uma melhor dispersão dos MWCNT quando comparado à outros solventes, como clorofórmio, etanol e THF (INAM *et al.*, 2008; ASTURIAS-ARRIBAS *et al.*, 2014), e Nafion® foi utilizado a fim de fixar os MWCNT na superfície do eletrodo.

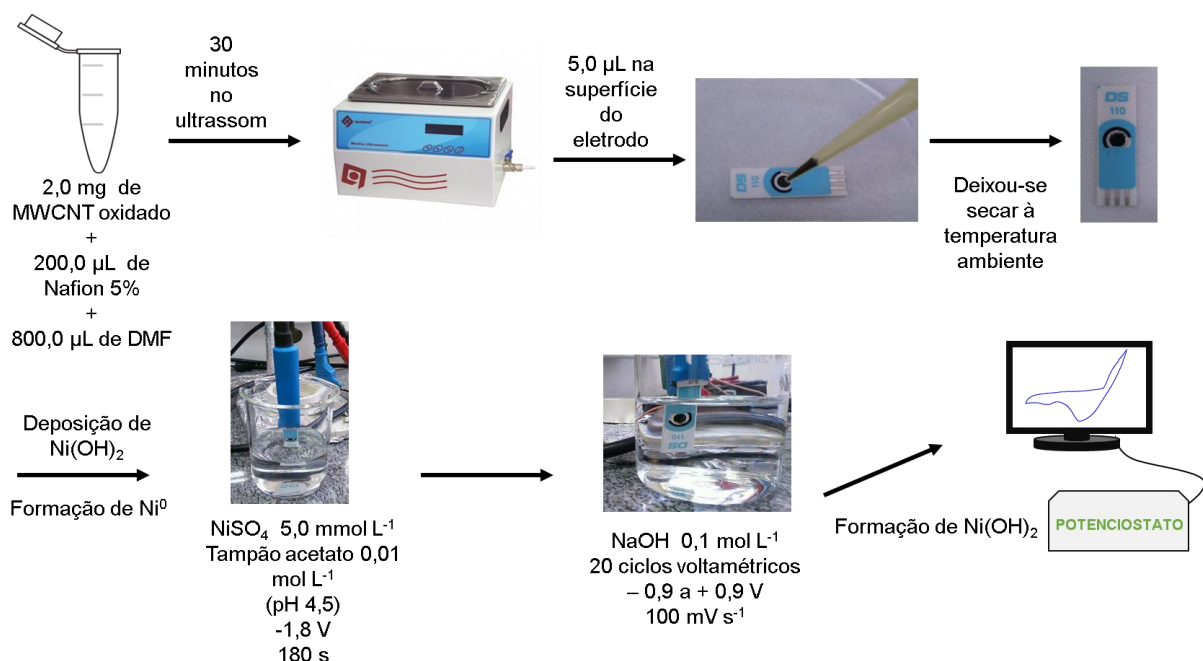
Assim, em um microtubo foram adicionados 2,0 mg de MWCNT oxidado, 200,0 µL de Nafion® 5,0% e 800,0 µL de DMF. A mistura foi mantida em banho ultrassônico durante 30 minutos e, em seguida, 5,0 µL da suspensão foram depositados com o auxílio de uma micropipeta na superfície do eletrodo de trabalho.

Deixou-se secar à temperatura ambiente e realizou-se a eletrodeposição de hidróxido de níquel [Ni(OH)₂]. Esta deposição foi efetuada imergindo o eletrodo em uma solução de NiSO₄•6H₂O 5,0 mmol L⁻¹ em tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ (pH 4,5) e

aplicando potencial de $-1,8\text{ V}$ por 180 segundos para a formação de níquel reduzido (Ni^0). Posteriormente, o eletrodo foi imerso em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,10\text{ mol L}^{-1}$ e 20 ciclos voltamétricos foram realizados em uma janela de potencial de $-0,9$ a $+0,9\text{ V}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} formando $\text{Ni}(\text{OH})_2$ na superfície do eletrodo.

O esquema geral e representativo do preparo do sensor é apresentado na Figura 10. Para os estudos de comparação foram utilizados eletrodos nas seguintes condições: eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion®, modificado apenas com Nafion® ou $\text{Ni}(\text{OH})_2$ e não modificado. Cabe ressaltar, que a modificação do eletrodo apenas com $\text{Ni}(\text{OH})_2$ foi realizada a partir da etapa de formação de Ni^0 na superfície do eletrodo.

Figura 10 – Esquema representativo do preparo do sensor.



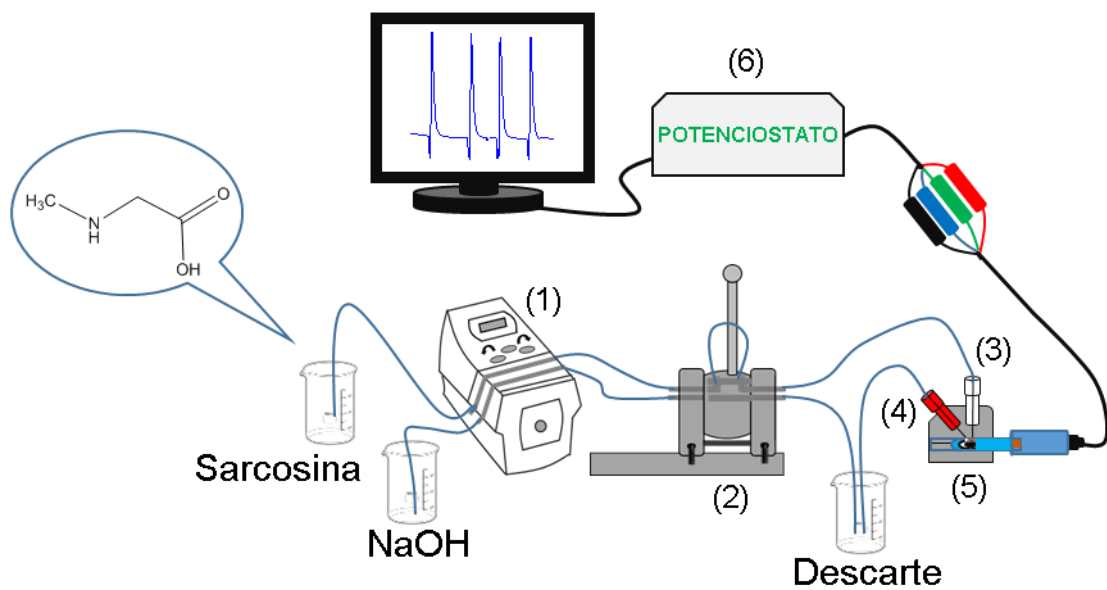
Fonte: o próprio autor.

4.4 SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

O sistema FIA baseado em linha única foi constituído de uma bomba peristáltica da marca GILSON Minipuls Evolution (Middleton, Wi, EUA), tubos de propulsão de Tygon®, um injetor comutador manual e uma célula eletroquímica de

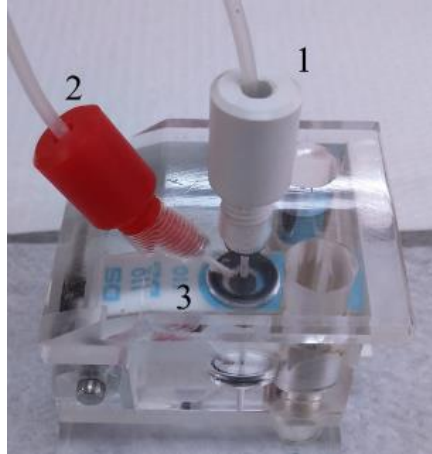
fluxo confeccionada em acrílico contendo um compartimento para o posicionamento do eletrodo impresso de carbono (Figura 11). Todas as conexões foram feitas com tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno. Na Figura 12 é apresentada a célula eletroquímica utilizada para as análises em fluxo.

Figura 11 – Representação da detecção eletroquímica em sistema FIA. (1) Bomba peristáltica, (2) injetor, (3) entrada de soluções, (4) saída de soluções, (5) célula eletroquímica de fluxo e eletrodo, (6) detector.



Fonte: o próprio autor.

Figura 12 – Fotografia da célula eletroquímica de fluxo: (1) entrada da solução carregadora (NaOH)/amostra, (2) saída da solução carregadora/amostra e (3) eletrodo impresso de carbono.

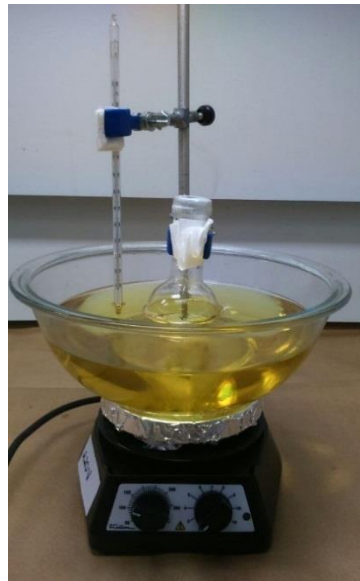


4.5 SÍNTESE DOS POLÍMEROS MIP E NIP

Para a síntese do polímero impresso molecularmente (MIP) foi empregada a polimerização em *bulk*, em que 2,0 mmol de sarcosina (molécula molde) e 8,0 mmol de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico (AMPS) (monômero funcional 1) foram dissolvidos em 20,0 mL de uma mistura de acetonitrila:metanol (1:1, v/v) em um balão de fundo redondo de 100,0 mL. Em seguida, foram adicionados 8,0 mmol de 4-vinilpiridina (4-VP) (monômero funcional 2) e mantido em banho de gelo sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 14,0 mmol do agente de ligação cruzada trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), 100,0 mg do iniciador radicalar 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) e 10,0 mL de acetonitrila:metanol (1:1, v/v).

A solução foi agitada manualmente e gás nitrogênio foi borbulhado na solução por 10 minutos. O frasco foi selado e mantido em banho de óleo por 24 horas à 60 °C sob agitação. A Figura 13 apresenta o sistema de banho de óleo contendo o frasco reacional.

Figura 13 – Fotografia do sistema de banho de óleo contendo o frasco reacional.

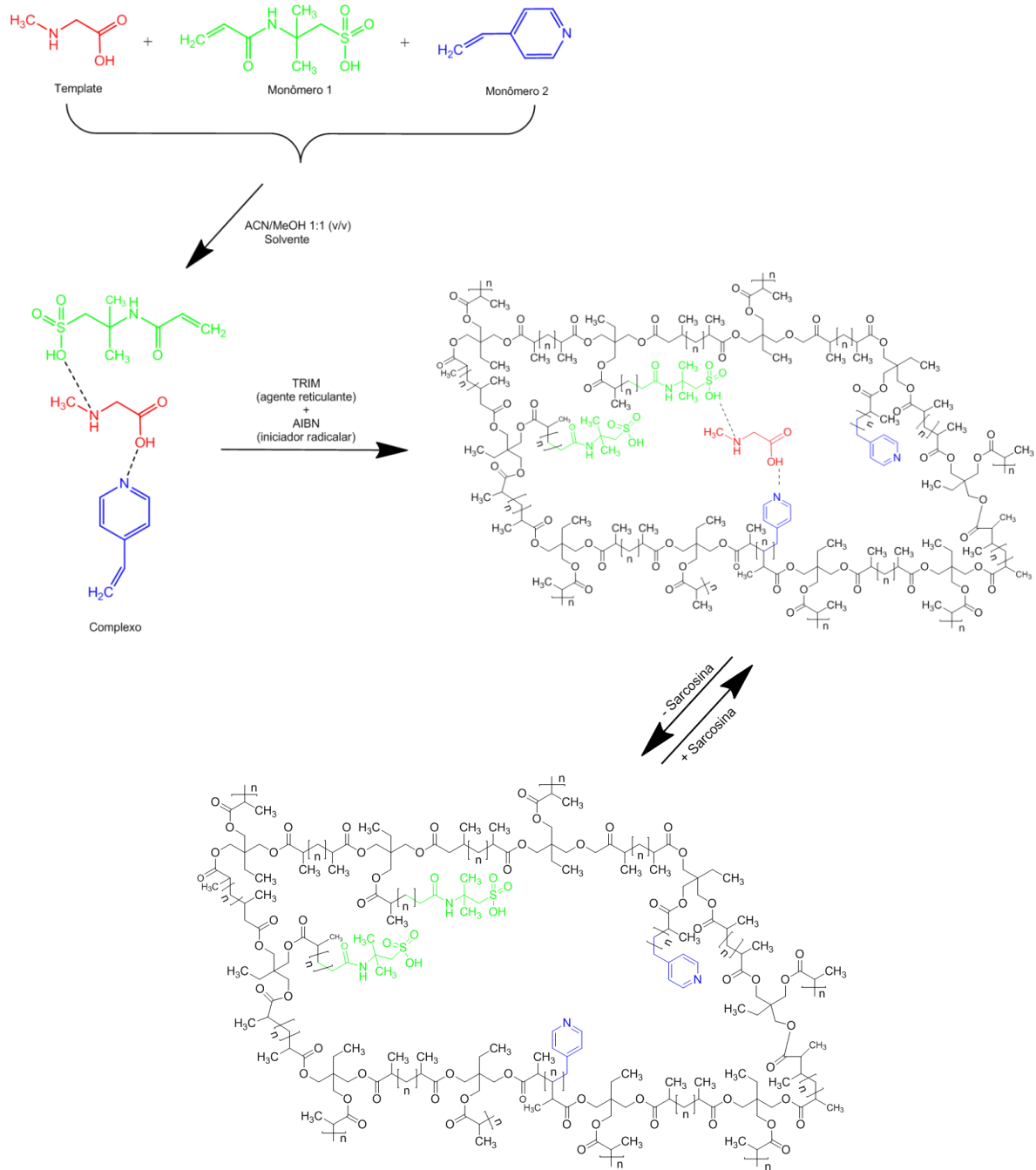


O material polimérico obtido foi filtrado sob vácuo e seco em estufa à 60 °C durante 24 horas, este material foi denominado SAR-MIP-AMPS-VP. O polímero foi macerado, peneirado e as partículas obtidas entre 106-150 μm foram lavadas com 100,0 mL de acetona, 50,0 mL de acetonitrila e 300,0 mL de uma solução de ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹ para remoção da molécula molde. Para monitorar a remoção do template, foi utilizado o método de derivatização por ninidrina, em que 5,0 mL do eluato foi adicionado em um tubo de vidro e acrescentou-se 2,0 mL de uma solução de ninidrina 2,0% (m/v) em acetona. O tudo foi vedado e deixado em banho-maria na temperatura de 90° C durante 10 minutos. A leitura foi realizada por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis em 570 nm.

Por fim, as partículas foram lavadas três vezes com água ultrapura e secas em estufa à 60 °C durante 24 horas. Após a remoção do template do polímero impresso, o polímero foi chamado MIP-AMPS-VP. O polímero não impresso (NIP, do inglês *Non-Imprinted Polymer*), denominado NIP-AMPS-VP, foi sintetizado utilizando o mesmo procedimento, porém sem a adição do template.

A representação esquemática para a síntese do MIP-AMPS-VP está apresentada na Figura 14.

Figura 14 – Representação esquemática da síntese do polímero MIP-AMPS-VP.



Fonte: o próprio autor.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

A caracterização foi realizada para o polímero impresso SAR-MIP-AMPS-VP e não impresso NIP-AMPS-VP a fim de avaliar a presença da sarcosina no processo

de polimerização e seu efeito nas propriedades morfológicas, texturais e térmicas dos polímeros. De igual forma foi caracterizado o polímero MIP após a remoção de sarcosina (MIP-AMPS-VP).

4.6.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada em Fourier (FT-IR)

A identificação dos grupos funcionais presentes nos polímeros foi realizada empregando um espectrofotômetro da Shimadzu® 8300 operando entre 4000 e 400 cm^{-1} . Uma massa de 5,0 mg de cada material foi homogeneizada com brometo de potássio (KBr), previamente seco em mufla à 600 °C durante 24 horas, para evitar a absorção de água devido às propriedades higroscópicas do KBr. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.6.2 Análise Termogravimétrica (TG)

A estabilidade térmica do material impresso foi avaliada por meio de análise termogravimétrica empregando o equipamento PerkinElmer® TGA 4000 (Massachusetts, USA), realizada pelo Laboratório de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina. Nesta técnica 10,0 mg do material foram aquecidos de 30 a 900 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 20,0 mL min^{-1} .

4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características morfológicas dos materiais foram avaliadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura da marca Philips® FEI Quanta 200 (FEI Company, Scientific and Technical Instruments, Oregon, USA) nas ampliações de 200, 10000 e 50000 vezes. Para a análise, os polímeros foram dispersos em uma fita dupla face de carbono e revestidos com uma fina camada de ouro de 30 nm empregando o equipamento Sputtern Coatter Leica® Bal-Tec Med 020 (Wetzlar, Alemanha). As análises de MEV foram realizadas pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina.

4.6.4 Fisissorção de Gás N₂ à 77 K

A área específica, volume e tamanho de poros dos materiais poliméricos foram determinadas utilizando o equipamento Quantachrome[®] Nova 1200e do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina. Para estas análises 300,0 mg das amostras foram previamente aquecidas a 120 °C por 4 horas sob vácuo. Posteriormente, foram submetidas à adsorção de nitrogênio na temperatura de 77 K. Aos dados obtidos foram aplicados o modelo de BET (Brunauer, Emmett, Teller) para determinação da área específica, e o modelo de BJH (Barrett, Joyner, Halenda) para determinação do volume e tamanho de poros dos polímeros.

4.6.5 Análise Elementar (CHN)

A porcentagem molar de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente nos polímeros foi determinada usando um Analisador Elementar Perkin Elmer[®] 2400 (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). As análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

4.7 SISTEMA DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO

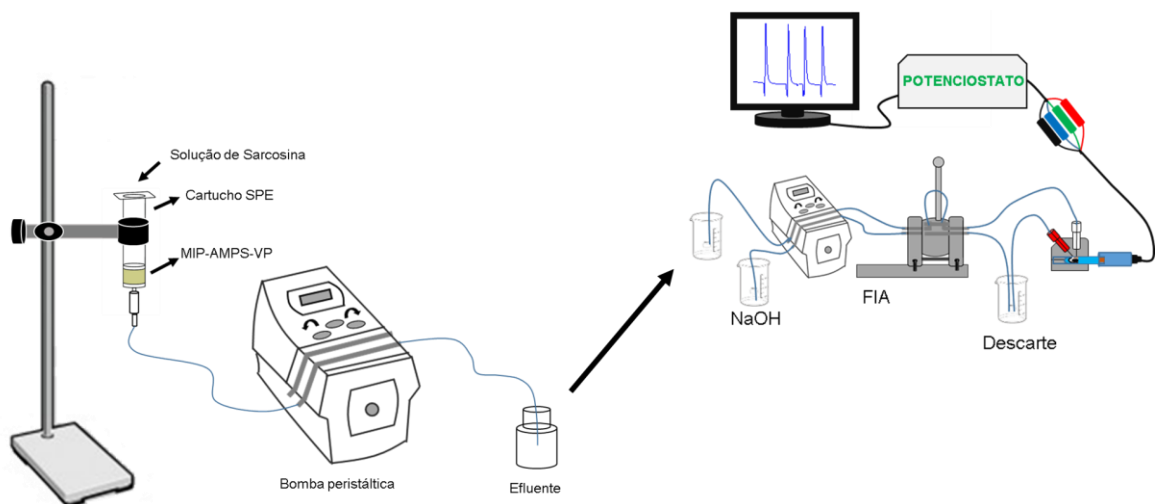
A extração em fase sólida utilizando polímero molecularmente impresso foi utilizada para avaliar a sorção, e neste estudo foram avaliados o efeito do pH e a massa de polímero na sorção de sarcosina no material. O procedimento foi realizado empregando um cartucho de SPE de 20,0 mL da Allcrom[®] recheado com 200,0 mg de MIP-AMPS-VP com dois frits de polipropileno, da Allcrom[®] de 20 um cada, em cada extremidade. O cartucho foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura e 10,0 mL de solução de sarcosina na concentração de 250,0 μmol L⁻¹ em pH 5,0 foram percoladas a vazão de 1,0 mL min⁻¹. O efluente foi recolhido para posterior análise utilizando sistema FIA com detecção eletroquímica.

Para remover a sarcosina retida no MIP-AMPS-VP com intuito de utilizar novamente este material em processos de sorção, foram utilizados 50,0 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹.

Para a propulsão das soluções foi utilizada uma bomba peristáltica com tubos Tygon®. Todas as conexões foram realizadas com tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno. Na Figura 15 é apresentado o esquema da extração *off-line* com posterior detecção eletroquímica em sistema FIA.

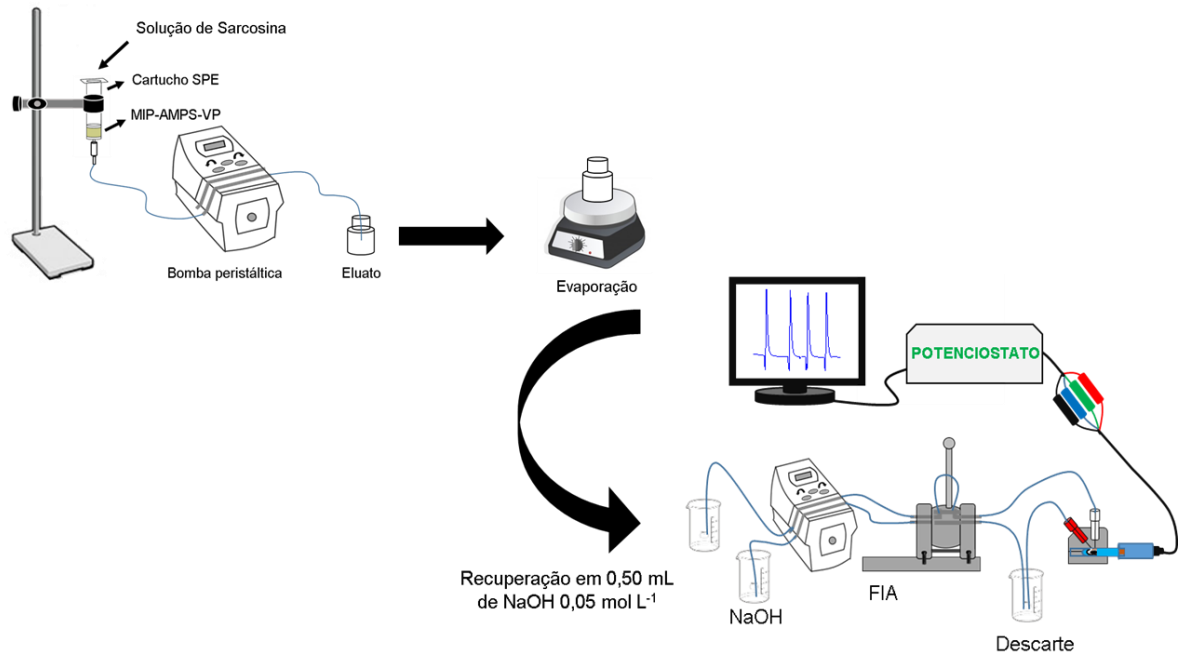
O procedimento de pré-concentração foi utilizado para o estudo do solvente de eluição e da vazão na pré-concentração de sarcosina. Inicialmente o cartucho SPE recheado com 300,0 mg do MIP-AMPS-VP foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura com vazão de 1,0 mL min⁻¹, seguido da percolação de 100,0 mL de solução de sarcosina na concentração de 25,0 µmol L⁻¹ em pH 5,0 à vazão de 5,0 mL min⁻¹. Os eluatos foram eluídos com 2,0 mL de uma mistura de MeOH:HAc (90:10, v/v) com vazão de 0,3 mL min⁻¹, evaporados em chapa aquecedora à 50 °C, recuperados em 0,5 mL de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e analisados e sistema FIA com detecção eletroquímica. Na Figura 16 está apresentado o esquema da pré-concentração *off-line* com posterior detecção eletroquímica em sistema FIA.

Figura 15 – Representação do sistema de extração *off-line* para sarcosina com posterior detecção eletroquímica empregando sistema FIA.



Fonte: o próprio autor.

Figura 16 – Representação do sistema de pré-concentração *off-line* para sarcosina com posterior detecção eletroquímica empregando sistema FIA.



Fonte: o próprio autor.

4.8 ESTUDO DO PH NA SORÇÃO DE SARCOSINA

O efeito do pH na sorção de sarcosina no polímero MIP-AMPS-VP foi realizado na faixa de 2,0 a 11,0. Após a identificação do melhor pH para a sorção de sarcosina, foi avaliada nesse pH a sorção para o polímero NIP-AMPS-VP.

Dez mililitros de solução de sarcosina $250,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($22,3 \text{ mg L}^{-1}$) foram percoladas pelo cartucho SPE recheado com $200,0 \text{ mg}$ de MIP-AMPS-VP à vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Para a realização das medidas eletroquímicas, os efluentes do cartucho foram recolhidos e o pH foi ajustado para 6,0 com soluções de HNO_3 ($0,1$ ou $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) ou NaOH ($0,1$ ou $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) para posterior análise utilizando sistema FIA com detecção eletroquímica. Cabe salientar, que o valor de pH dos efluentes foram ajustados para 6,0 antes de sua análise utilizando o sistema FIA-ED, pelo fato de que soluções de caráter ácido e/ou básico alteram a linha de base do diagrama, podendo interferir na resposta eletroquímica, fato não verificado para pH igual a 6,0.

A quantidade de sarcosina (mg g^{-1}) sorvida pelo polímero foi calculada segundo a Equação 2, em que Q_e representa a sorção (mg g^{-1}), C_i é a concentração inicial de sarcosina (mg L^{-1}), C_f é a concentração final de sarcosina no efluente (mg L^{-1}), m é a massa do sorvente (g) e V é o volume da solução de sarcosina utilizada (L).

$$Q_e = \frac{C_i - C_f}{m} \times V$$

(Equação 2)

4.9 AVALIAÇÃO DA MASSA DO SORVENTE MIP-AMPS-VP NA SORÇÃO DE SARCOSINA

O cartucho SPE foi empacotado com diferentes massas do MIP-AMPS-VP, a saber: 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0 mg. Inicialmente o cartucho foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura, e, em seguida, foram percoladas 10,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina em pH 5,0. O efluente foi recolhido e o pH foi ajustado para 6,0 com soluções de HNO_3 (0,1 ou 0,01 mol L^{-1}) ou NaOH (0,1 ou 0,01 mol L^{-1}), e analisado por sistema FIA com detecção eletroquímica. A quantidade de sarcosina sorvida empregando as diferentes massas do polímero foi calculada de acordo com a Equação 2.

4.10 ESTUDO DO SOLVENTE DE ELUIÇÃO NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA

O cartucho SPE foi empacotado com 300,0 mg do MIP-AMPS-VP e primeiramente, 5,0 mL de água ultrapura foram utilizadas para o condicionamento, seguido da percolação de 100,0 mL de uma solução de sarcosina na concentração de 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 5,0 com vazão de 1,0 mL min^{-1} . Foram avaliados como solvente de eluição uma solução de NaOH 0,5 mol L^{-1} e uma mistura de metanol:ácido acético (MeOH:HAc , 90:10, v/v) utilizando uma alíquota de 2,0 mL. Cabe salientar, que para análise do eluato da coluna empregando a mistura MeOH:HAc , este foi evaporado à 50 °C em chapa com aquecimento, recuperado em 0,5 mL da solução carregadora NaOH 0,05 mol L^{-1} e injetado no sistema FIA com detecção eletroquímica. O eluente, solução de NaOH 0,5 mol L^{-1} , foi injetado diretamente no sistema FIA com detecção eletroquímica.

4.11 OTIMIZAÇÃO DA VAZÃO NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA

O cartucho SPE foi empacotado com 300,0 mg do MIP-AMPS-VP e após condicionamento com 5,0 mL de água ultrapura foram pré-concentrados 100,0 mL de uma solução de sarcosina 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 5,0 nas vazões de 1,0; 3,0; 5,0 e 7,0 mL min^{-1} . Foram utilizados 2,0 mL da mistura de MeOH:HAc (90:10, v/v) para eluição de sarcosina com vazão de 0,3 mL min^{-1} . O eluato do cartucho foi evaporado em chapa aquecedora a 50 °C, recuperado em 0,5 mL da solução carregadora NaOH 0,05 mol L^{-1} e injetado no sistema FIA com detecção eletroquímica.

4.12 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO

As características analíticas do método, como limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e fator de enriquecimento foram avaliadas por meio da construção de curvas analíticas empregando o material sintetizado MIP-AMPS-VP como sorvente MISPE e sob condições otimizadas conforme mencionado na Seção 4.7.

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos de acordo com a IUPAC. O limite de detecção (LD, do inglês *Limit of Detection*) é definido como sendo a menor concentração de um analito que pode ser detectada com confiança em um procedimento analítico, e, o limite de quantificação (LQ, do *Limit of Quantification*) é a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (LONG; WINEFORDNER, 1983). O LD e o LQ do método foram calculados utilizando as Equações 3 e 4 abaixo, em que S_b é o desvio padrão de dez medidas do branco e m o coeficiente angular da curva analítica.

$$LD = \frac{3S_b}{m}$$

(Equação 3)

$$LQ = \frac{10S_b}{m}$$

(Equação 4)

O fator de enriquecimento do método foi calculado por meio da razão da inclinação (m) da curva analítica com etapa de pré-concentração pela inclinação da curva analítica sem etapa de pré-concentração.

A precisão intradia ($n = 6$) e interdia ($n = 2$) foram determinadas pelo cálculo do desvio padrão relativo (%DPR). Para a precisão intradia foram realizadas seis medidas das soluções de sarcosina nas concentrações de 10,0; 15,0 e 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada e calculou-se a média e o desvio padrão para cada concentração. Para a precisão interdia foram realizadas seis medidas das soluções de sarcosina nas concentrações de 10,0; 15,0 e 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada, em dois dias diferentes, e calculou-se a média e o desvio padrão para cada concentração. Por fim, foi calculado o desvio padrão relativo para cada concentração por meio das doze réplicas obtidas.

4.13 AVALIAÇÃO DO PERFIL SORTIVO DE MOLÉCULAS ESTRUTURALMENTE SIMILARES À SARCOSINA UTILIZANDO MIP-AMPS-VP E NIP-AMPS-VP

A pré-concentração de possíveis interferentes como glicina, prolina, alanina e ureia pelo método MISPE foi avaliada. Para o procedimento, inicialmente o cartucho SPE recheado com 300,0 mg do MIP-AMPS-VP foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura, seguido da percolação de 100,0 mL de solução individual de cada interferente na concentração de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 5,0 com vazão de 5,0 mL min^{-1} . A eluição foi realizada utilizando 2,0 mL de MeOH:HAc (90:10, v/v) com vazão de 0,3 mL min^{-1} e o eluato foi evaporado em chapa aquecedora à 50 °C, recuperado em 0,5 mL de NaOH 0,05 mol L^{-1} e analisado em sistema FIA com detecção eletroquímica. O mesmo estudo foi realizado com o material controle NIP-AMPS-VP.

4.14 APLICAÇÃO DO MÉTODO MISPE EM AMOSTRAS DE URINA SINTÉTICA

A urina sintética foi preparada de acordo com Lee e colaboradores (LEE *et al.*, 2015) com algumas adaptações. Foram dissolvidos 5,36 g de ureia; 1,61 g de KH_2PO_4 ; 2,2 g de NaCl; 1,19 g de Na_2SO_4 ; 0,5 g de creatina; 0,33 g de citrato de

sódio; 0,25 g de CaCl_2 ; 0,24 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,15 g de KCl em 500,0 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 5,0 com uma solução de HNO_3 0,01 mol L^{-1} .

Para as medidas, inicialmente o cartucho SPE foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura, seguido da percolação de 100,0 mL da solução de urina sintética, com vazão de 5,0 mL min^{-1} . Devido ao fato da matriz da amostra apresentar uma alta concentração de sais, foi necessário incluir uma etapa de lavagem do cartucho utilizando 10,0 mL de água ultrapura. A eluição foi feita com 2,0 mL de uma mistura de MeOH:HAc (90:10, v/v) a uma vazão de 0,3 mL min^{-1} , e os eluatos foram evaporados em chapa aquecedora à 50 °C, recuperados em 0,5 mL de NaOH 0,05 mol L^{-1} e analisados em sistema FIA com detecção eletroquímica.

4.15 INFLUÊNCIA DE GLICINA NA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE SARCOSINA

A glicina é uma molécula estruturalmente muito similar à sarcosina e presente em concentração substancialmente maior que a sarcosina em urina. Assim, visando simular a elevada concentração de glicina na urina, foi realizada a pré-concentração de sarcosina na presença de altas concentrações de glicina em amostras de urina sintética. A urina foi preparada de acordo com a Seção 4.14 com a adição de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina com concentrações distintas de glicina (280,0; 1330,0 e 2990,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (GOODWIN; STAMPWALA, 1973; HARPER; RODWELL; MAYES, 1977; LIN; WANG, 1980; MORTENSEN; KPLVRAA; CHRISTENSEN, 1980).

Inicialmente o cartucho SPE contendo MIP-AMPS-VP (300,0 mg) foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura seguido da percolação de 100,0 mL de cada solução avaliada com vazão de 5,0 mL min^{-1} . Em seguida, o cartucho foi lavado com 10,0 mL de água ultrapura e a eluição foi realizada com 2,0 mL de MeOH:HAc (90:10, v/v) com vazão de 0,3 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado em chapa aquecedora à 50 °C e recuperado em 0,05 mol L^{-1} de NaOH. A análise foi realizada no sistema FIA com detecção eletroquímica.

Ainda neste estudo, a concentração de glicina foi fixada (1330,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e a de sarcosina foi variada (5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para verificar a resposta analítica no sistema MISPE e a influência deste interferente nas análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM MWCNT/NAFION[®]/Ni(OH)₂ PARA DETECÇÃO DE SARCOSINA

A fim de investigar e aumentar as potencialidades do sensor desenvolvido para a determinação de sarcosina, as variáveis do sistema eletroquímico e do sensor foram estudadas, as quais foram: influência da modificação do eletrodo impresso de carbono no perfil voltamétrico de Ni(OH)₂, potencial de oxidação do Ni(OH)₂, avaliação da modificação do eletrodo impresso de carbono modificado com Nafion[®], MWCNT/Nafion[®] e MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂, e estudo da quantidade de MWCNT utilizada para a modificação do eletrodo impresso de carbono. As variáveis do sistema FIA incluindo concentração e vazão da solução carregadora, e volume da alça de amostragem também foram estudadas. Além disso, foi realizada a caracterização morfológica dos eletrodos e avaliada a concentração de NiSO₄•6H₂O utilizada na modificação do sensor.

5.1.1 Caracterização Morfológica e Superficial dos Eletrodos

A caracterização da superfície do eletrodo impresso de carbono não modificado e do eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura com aproximações de 45, 400, 6000 e 50000 vezes. As micrografias estão apresentadas nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 17, as imagens obtidas para o eletrodo impresso de carbono não modificado mostram uma superfície rugosa, característica de partículas de carbono (SILVA *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2012). Já, para o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ (Figura 18), além de uma superfície rugosa, com a aproximação de 50000 vezes (Figura 18 (D)) verifica-se a presença dos filamentos dos MWCNT agregados, característico dos MWCNT oxidados, pois, a oxidação dos nanotubos de carbono gera ligações de hidrogênio decorrentes dos grupos hidroxila, responsáveis pelo grau de agregação deste material (CORAZZA, 2014).

Figura 17 – Micrografias eletrônicas de varredura do eletrodo impresso de carbono não modificado com ampliações de (A) 45, (B) 400, (C) 6000 e (D) 50000 vezes.

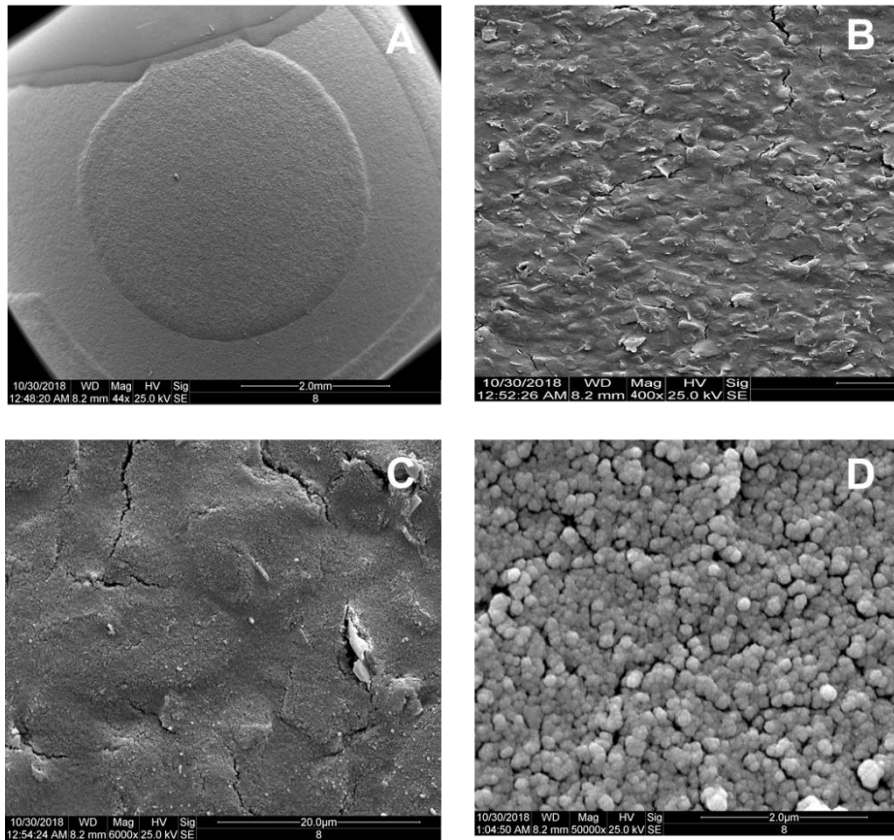
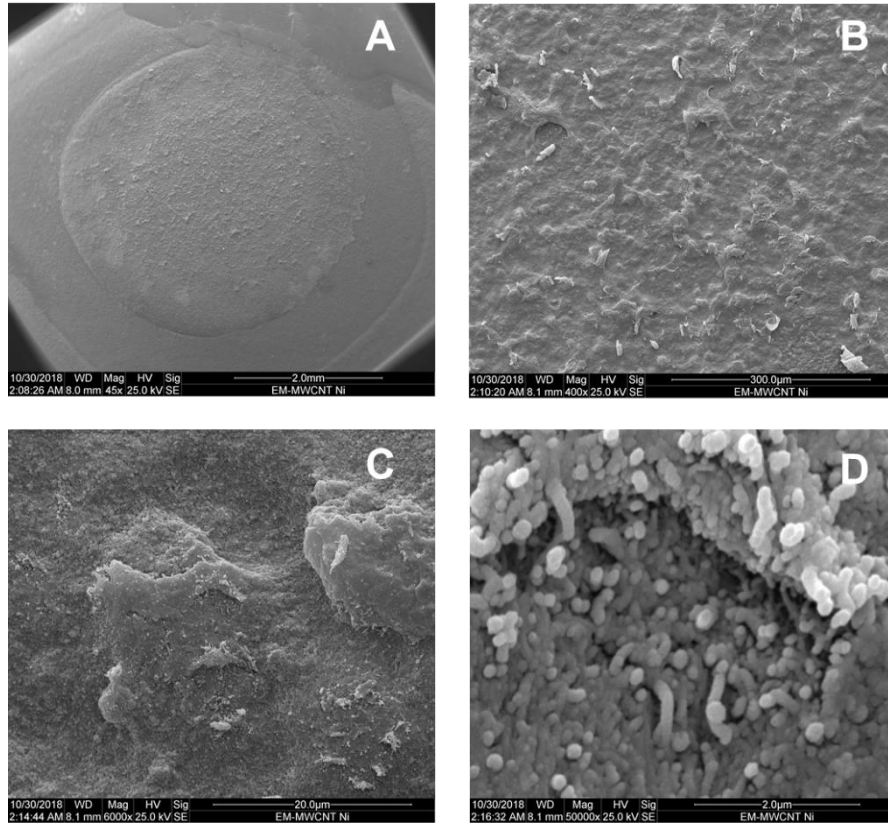


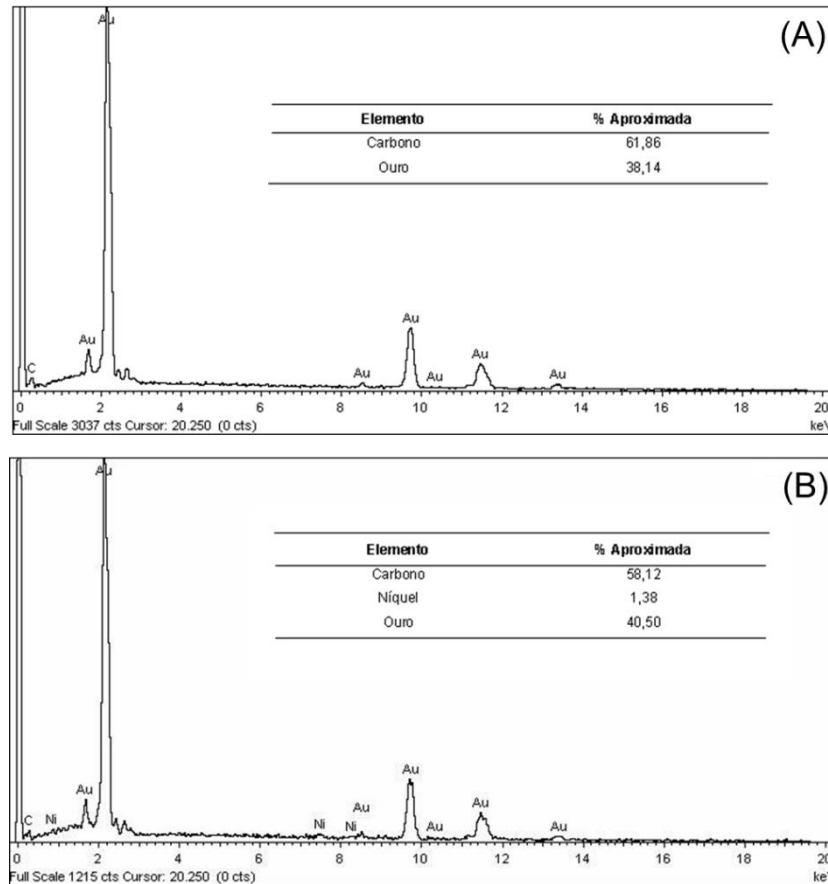
Figura 18 – Micrografias eletrônicas de varredura do eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ com ampliações de (A) 45, (B) 400, (C) 6000 e (D) 50000 vezes.



O espectro de energia dispersiva (EDS) foi realizado a fim de obter informações sobre a composição química da superfície dos eletrodos. Na Figura 19, são apresentados os espectros de EDS para o eletrodo impresso de carbono não modificado (A) e para o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ (B), bem como as composições percentuais dos elementos encontrados. Vale salientar que a presença de ouro nos espectros é referente à sua utilização como uma fina camada de 30 nm sobre a superfície dos eletrodos, com a finalidade de melhorar as imagens de MEV.

A partir dos espectros obtidos, observa-se que para o eletrodo impresso de carbono não modificado são encontrados apenas átomos de carbono (Figura 19 (A)), como o esperado. Para o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ (Figura 19 (B)), além dos átomos de carbono, foram encontrados átomos de níquel, o que indica a eletrodeposição do Ni(OH)₂ sobre a camada de MWCNT.

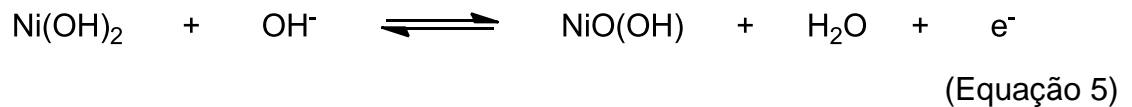
Figura 19 – Espectro de EDS para o eletrodo impresso de carbono não modificado (A) e para o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ (B).



5.1.2 Influência da Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono no Perfil Voltamétrico de Ni(OH)₂

Inicialmente, foi avaliado o perfil voltamétrico de Ni(OH)₂ nos eletrodos em meio de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (Figura 20). Como observado, o eletrodo não modificado e o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®] não apresentaram picos de oxidação e/ou picos de redução durante a voltametria cíclica realizada. Isso pode ser explicado pelo fato da ausência de hidróxido de níquel na superfície dos eletrodos. No entanto, quando utilizado o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ e o eletrodo modificado com Ni(OH)₂ foi possível observar picos de oxidação e redução no voltamograma cíclico.

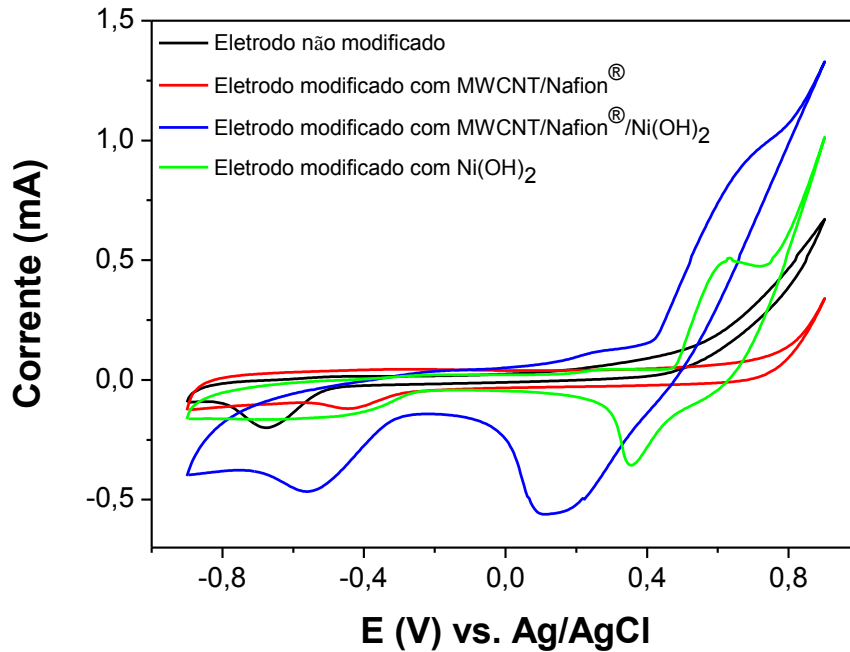
Para o eletrodo modificado com Ni(OH)₂ verifica-se um pico de oxidação em +0,60 V, indicando a oxidação da camada de hidróxido de níquel (DEO; LAWRENCE; WANG, 2004), na presença de íons OH⁻ presentes na solução de eletrólito suporte (NaOH), como mostrado pela Equação 5. O pico de redução correspondente em +0,34 V representa a redução de óxido hidróxido de níquel (NiO(OH)) gerando Ni(OH)₂ (par redox Ni²⁺/Ni³⁺) (DEO; LAWRENCE; WANG, 2004).



Para o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ verificou-se um leve deslocamento do pico de oxidação para potenciais mais positivos (+0,68 V), bem como um ganho de corrente quando comparado ao eletrodo modificado apenas com Ni(OH)₂. Esse comportamento indica a existência de uma maior quantidade de hidróxido de níquel depositado sobre a superfície de MWCNT (DEO; LAWRENCE; WANG, 2004; VIDOTTI; TORRESI; KUBOTA, 2008).

No entanto, na varredura catódica o eletrodo modificado com Ni(OH)₂ apresentou um pico no potencial de +0,34 V, enquanto que o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ apresentou deslocamento para região mais catódica em +0,11 V. Este resultado pode ser explicado muito provavelmente pelo maior confinamento do NiO(OH) nas paredes de MWCNT, fazendo com que a redução ocorra em regiões mais catódicas (DEO; LAWRENCE; WANG, 2004). Os picos em regiões mais catódicas, -0,68 V para o eletrodo não modificado, -0,46 V para o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂, -0,44 V para o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®] e -0,43 V para o eletrodo modificado com Ni(OH)₂, são atribuídos à redução de O₂ no meio (VAN BENSCHOTEN *et al.*, 1983; WANG, 2006).

Figura 20 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo impresso de carbono não modificado, modificado com MWCNT/Nafion[®], modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ e modificado apenas com Ni(OH)₂, na ausência de sarcosina. Condições: Eletrólito NaOH 0,1 mol L⁻¹, 100 mV s⁻¹, 20° ciclo. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion[®] foi de 2,0 mg mL⁻¹.



Conforme observado na Figura 21, a corrente de oxidação do Ni(OH)₂ é aumentada na presença de sarcosina, indicando que o aminoácido, de fato, atua na regeneração do hidróxido de níquel. Como reportado por Deo, Lawrence e Wang (2004) a sarcosina atua reduzindo as espécies NiO(OH) geradas eletroquimicamente para Ni(OH)₂, de acordo com a Equação 6, favorecendo a formação de Ni(OH)₂ na superfície do eletrodo e, portanto, um aumento de sinal é observado no voltamograma.

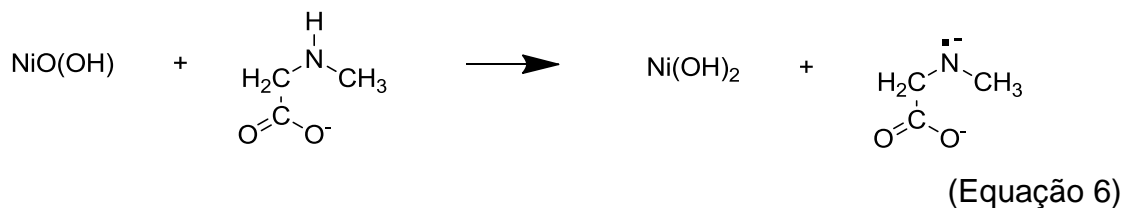
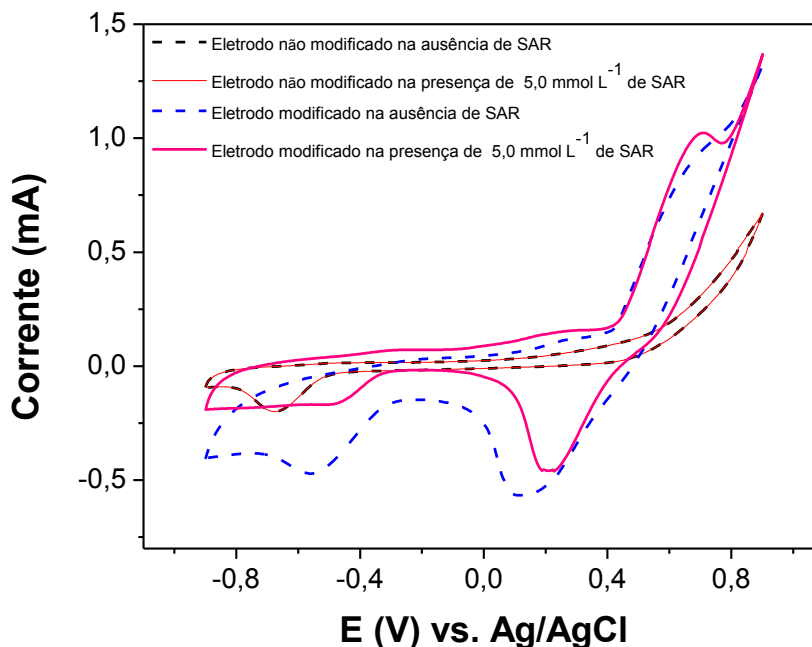


Figura 21 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo impresso de carbono não modificado e modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ na ausência e na presença de sarcosina. Condições: Eletrólito NaOH 0,1 mol L⁻¹, 100 mV s⁻¹, 3^o ciclo. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion[®] foi de 2,0 mg mL⁻¹.



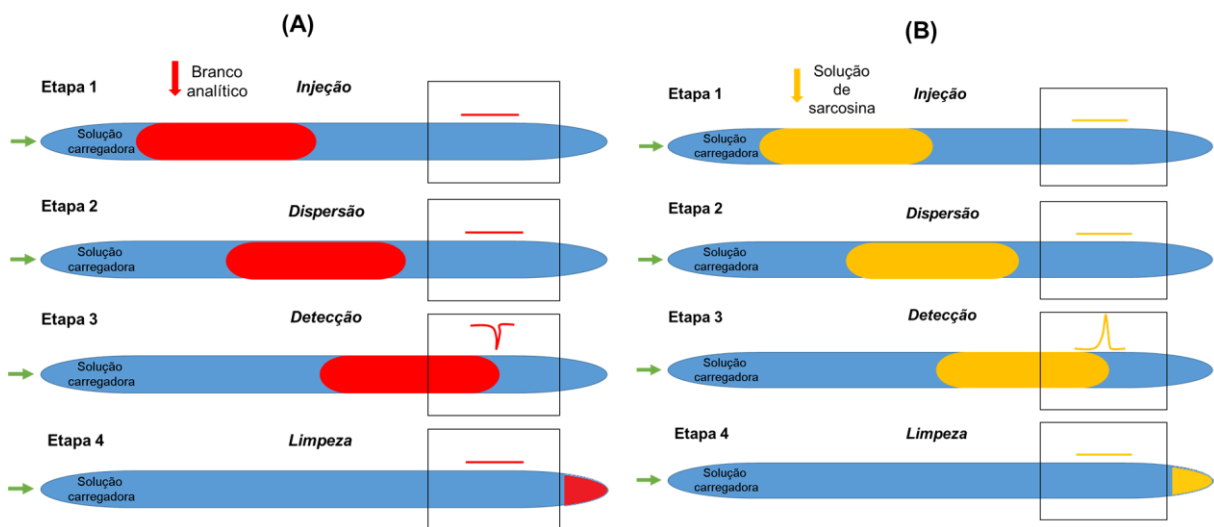
Com base nos resultados apresentados, pode-se inferir que a utilização do Ni(OH)₂ associado à presença de MWCNT na modificação do eletrodo mostra-se uma excelente alternativa para a detecção eletroquímica de sarcosina. O uso de nanotubos de carbono na primeira etapa da modificação permite uma maior eletrodeposição de Ni(OH)₂, melhorando a definição do perfil eletroquímico. Cabe salientar que a sarcosina é eletroinativa no eletrodo impresso não modificado, justificando a modificação do eletrodo com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂.

5.1.3 Avaliação do Potencial de Oxidação de Ni(OH)₂ Utilizando o Eletrodo Impresso de Carbono Modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ em Sistema FIA

Após a realização dos estudos prévios empregando voltametria cíclica, o sistema FIA foi empregado para determinar o potencial de oxidação de Ni(OH)₂ regenerado por sarcosina. Primeiramente foi estudado o potencial de oxidação, na faixa de 0,3 a 1,2 V usando o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂.

Considerando que o sistema FIA é composto por 4 etapas: injeção, dispersão, detecção e limpeza, no diagrama do branco analítico, observa-se o efeito da diluição da solução carregadora (NaOH) pelo sistema FIA. Após o branco ser injetado no sistema (utilizando um injetor comutador manual contendo uma alça de amostragem), ocorre uma diluição da concentração da solução carregadora (etapa de dispersão), gerada pelo gradiente de concentração, o que ocasiona uma alteração na linha de base do diagrama durante a etapa de detecção. Posteriormente, as condições iniciais são retomadas na etapa de limpeza, onde a concentração da solução carregadora retorna para sua concentração inicial (RŮŽIČKA; HANSEN, 1975; ZAGATTO *et al.*, 1999). Esse comportamento se repete para os demais potenciais estudados (omitido). Na Figura 22 podem ser observadas as etapas que constituem o sistema FIA.

Figura 22 – Representação das etapas do sistema FIA e registro do sinal analítico para o (A) branco analítico e para a (B) solução de sarcosina.



Fonte: Adaptado de RŮŽIČKA; HANSEN, 1975.

A Figura 23 apresenta o diagrama obtido para o branco em +0,7 V e os diagramas para 1,12 mmol L⁻¹ de sarcosina em +0,3; +0,6 e +0,7 V, respectivamente, utilizando NaOH 0,1 mol L⁻¹ como solução carregadora com uma vazão de 1,2 mL min⁻¹ e um volume de injeção de 121,0 µL.

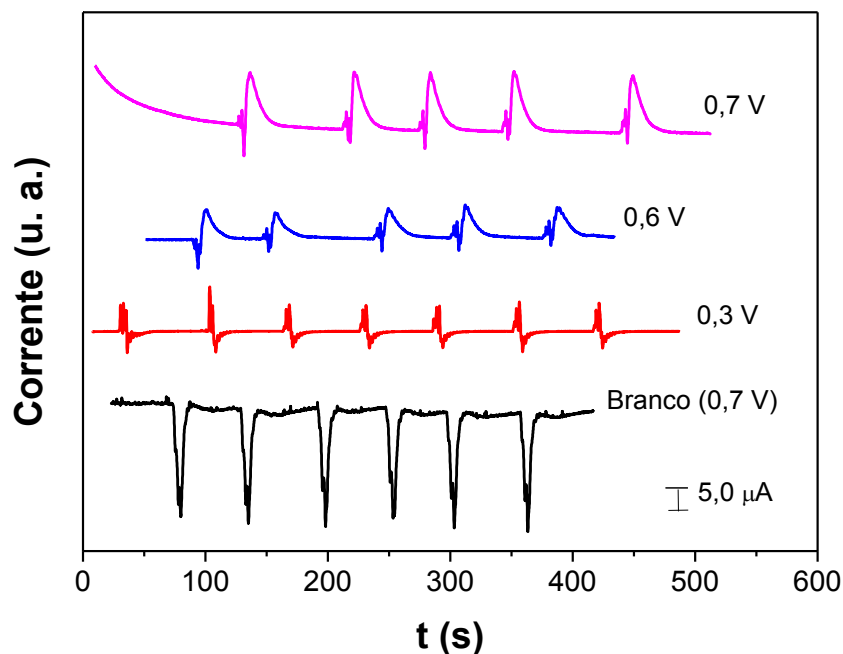
Como mostrado na Figura 23, no potencial de +0,3 V não foi possível observar sinal de oxidação de Ni(OH)₂. Este resultado repete-se nos potenciais de

+0,4 e +0,5 V (dados não apresentados). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que nesses potenciais não ocorre a oxidação de Ni(OH)_2 , como apresentado no voltamograma da Figura 20.

No entanto, em potenciais de +0,6 e +0,7 V, pode-se observar um sinal analítico referente à oxidação de Ni(OH)_2 bem definido, sendo que em +0,7 V obteve-se uma maior intensidade de corrente comparada com a apresentada em +0,6 V. Esse resultado infere que nessa faixa de potencial ocorre a oxidação de Ni(OH)_2 que é regenerado pela sarcosina, justificando assim o aumento de sinal analítico.

Nos potenciais de +0,8 a +1,2 V (dados não apresentados) não verifica-se pico, o que pode ser explicado muito provavelmente pela descarga no eletrodo, conforme se observa na Figura 20, ocorrendo a oxidação da água com desprendimento de O_2 (VAN BENSCHOTEN *et al.*, 1983).

Figura 23 – Diagramas em solução carregadora NaOH 0,1 mol L⁻¹ com vazão de 1,2 mL min⁻¹ utilizando o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ para o branco no potencial de 0,7 V e para sarcosina 1,12 mmol L⁻¹ nos potenciais de 0,3; 0,6 e 0,7. Volume de injeção: 121,0 μL. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion[®] foi de 2,0 mg mL⁻¹.



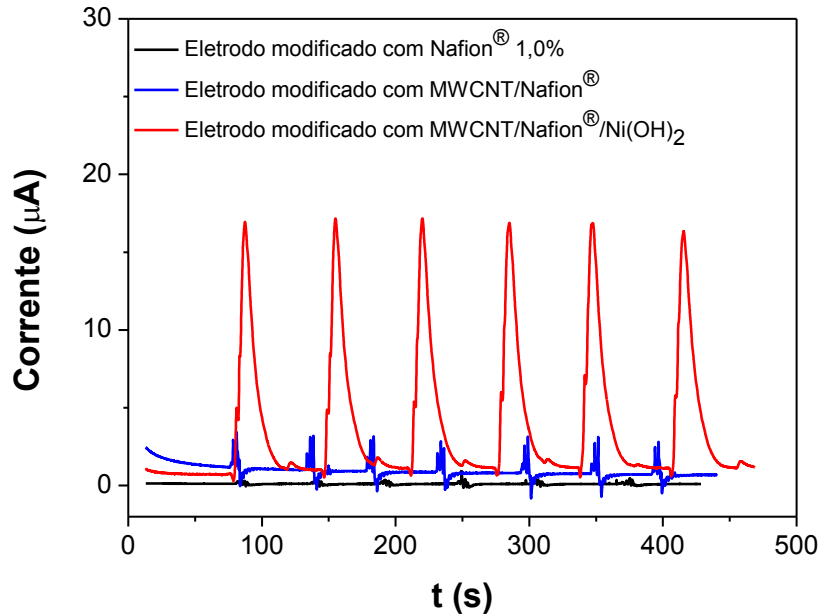
De acordo com os resultados apresentados, o potencial de 0,7 V foi selecionado para os estudos posteriores.

5.1.4 Avaliação da Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono com Nafion[®], MWCNT/Nafion[®] e MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ no Sistema FIA

Com o intuito de verificar o efeito da modificação utilizada no preparo do sensor na presença de sarcosina, foram avaliados três eletrodos modificados a saber: eletrodo modificado com Nafion[®] 1,0%, eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®] e eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂. Esse estudo foi realizado empregando o sistema FIA utilizando uma solução de sarcosina 1,12 mmol L⁻¹, solução carregadora NaOH 0,1 mol L⁻¹ com vazão de 1,2 mL min⁻¹, potencial de 0,7 V e volume de injeção de 121,0 µL. Foram realizadas seis medidas utilizando cada sensor.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 24, o eletrodo modificado com Nafion[®] 1,0% e o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®] não apresentaram sinais de corrente. Contudo, o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ apresentou sinal bem definido e com precisão, apresentando corrente de 12,28 (± 0,16) µA.

Figura 24 – Diagramas utilizando o eletrodo impresso de carbono modificado com Nafion[®] 1,0%, MWCNT/Nafion[®] e MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ para sarcosina 1,12 mmol L⁻¹ no potencial de 0,7 V. Solução carregadora NaOH 0,1 mol L⁻¹ com vazão de 1,2 mL min⁻¹. Volume de injeção: 121,0 µL. A concentração da suspensão MWCNT/Nafion[®] foi de 2,0 mg mL⁻¹.



Assim, o eletrodo modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ foi utilizado para os estudos posteriores no sistema FIA por apresentar desempenho satisfatório em termos de precisão das medidas.

5.1.5 Estudo da Quantidade de MWCNT Utilizada para a Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono

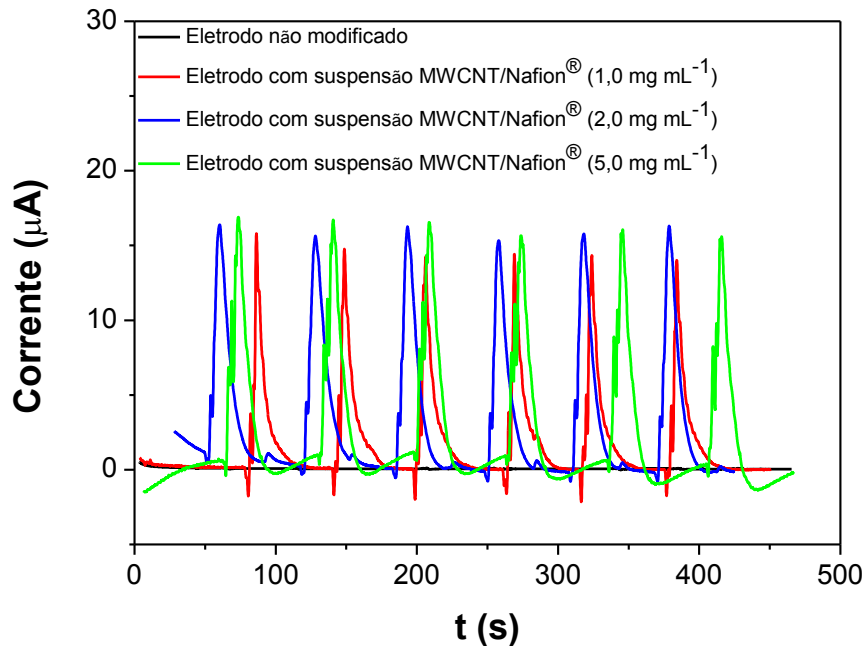
A fim de investigar a influência da quantidade de MWCNT na modificação do eletrodo de MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ três suspensões foram preparadas na concentração de 1,0; 2,0 e 5,0 mg mL⁻¹ de MWCNT. O preparo das suspensões, assim como o preparo dos eletrodos foram realizados como descrito na Seção 4.3 e as medidas eletroquímicas no sistema FIA foram realizadas empregando uma solução de sarcosina na concentração de 1,12 mmol L⁻¹, potencial de 0,7 V, solução carregadora NaOH 0,1 mol L⁻¹ com vazão de 1,2 mL min⁻¹ e volume de injeção de 121,0 µL. Foram realizadas seis medidas utilizando cada sensor.

Como apresentado pela Figura 25, quando utiliza-se o eletrodo impresso de carbono não modificado, não há sinal de corrente mensurável. Contudo, quando

utiliza-se a suspensão de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNT na modificação do eletrodo, é possível verificar um leve decréscimo na corrente de pico ($10,8 \pm 0,49 \text{ } \mu\text{A}$) quando comparado com os eletrodos utilizando as suspensões de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNT ($12,5 \pm 0,52 \text{ } \mu\text{A}$) e de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNT ($13,1 \pm 0,20 \text{ } \mu\text{A}$). Apesar das composições de $2,0$ e de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNT apresentarem correntes de pico semelhantes, a suspensão de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNT foi escolhida para os próximos estudos por apresentar perfil de pico mais definido e menor ruído.

Cabe ressaltar que os eletrodos utilizados neste estudo foram modificados com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂, sendo variada apenas a quantidade de MWCNT nas suspensões.

Figura 25 – Diagramas utilizando o eletrodo impresso de carbono não modificado e eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ utilizando a suspensão MWCNT/Nafion[®] de 1,0 mg mL⁻¹; 2,0 mg mL⁻¹ e 5,0 mg mL⁻¹ de MWCNT para sarcosina 1,12 mmol L⁻¹ no potencial de 0,7 V. Solução carregadora NaOH 0,1 mol L⁻¹ com vazão de 1,2 mL min⁻¹. Volume de injeção: 121,0 µL.



5.1.6 Efeito da Concentração da Solução Carregadora (NaOH) no Sistema FIA

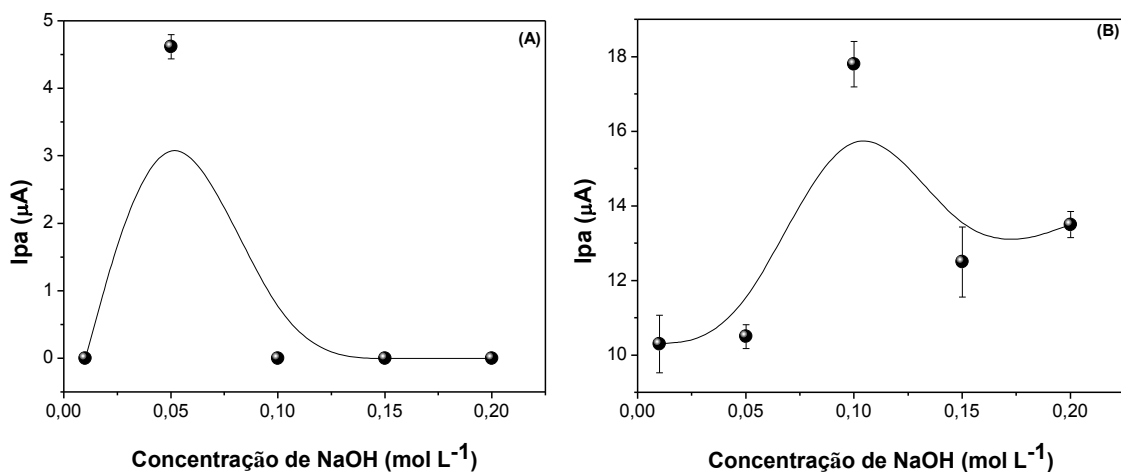
Com o objetivo de verificar o efeito da concentração do eletrólito suporte/solução carregadora NaOH no sinal analítico, foram analisadas soluções de NaOH nas concentrações de 0,01 (pH 11,97); 0,05 (pH 12,44); 0,1 (pH 12,68); 0,15 (pH 12,75) e 0,2 mol L⁻¹ (pH 12,86) empregando concentrações de sarcosina de 100,0 µmol L⁻¹ e 1,12 mmol L⁻¹. A vazão da solução carregadora para este estudo foi de 1,2 mL min⁻¹, o volume de injeção de 121,0 µL e potencial de 0,7 V.

Como pode ser observado na Figura 26 (A), correntes mensuráveis para sarcosina na concentração de 100,0 µmol L⁻¹ foram obtidas quando se utilizou a solução carregadora na concentração de 0,05 mol L⁻¹, obtendo-se um sinal de corrente de 4,62 (±0,18) µA. Ao se avaliar a concentração de sarcosina 1,12 mmol L⁻¹ obteve-se maiores correntes de pico utilizando a solução carregadora NaOH na concentração de 0,1 mol L⁻¹, conforme apresentado na Figura 26 (B). Este resultado já era esperado, uma vez que a sarcosina regenera Ni(OH)₂ e, portanto, quanto

maior a quantidade de OH^- na solução carregadora, maior a quantidade de NiO(OH) formado e maior a concentração de sarcosina necessária para regenerar Ni(OH)_2 .

Considerando que a atividade eletroquímica do Ni(OH)_2 é favorável em valores de pH acima de 12, a diminuição na sensibilidade em valores de pH acima de 12,44 (Figura 26 (A)) e acima de 12,68 (Figura 26 (B)) não é um comportamento esperado. Esse fenômeno pode ser explicado pelo excesso de cargas negativas na superfície do sensor, visto que em valores de pH acima de 12,0 pode ocorrer a formação de complexos metálicos carregados negativamente, como Ni(OH)_4^{2-} e Ni(OH)_3^- (PARKS, 1965), gerando uma repulsão eletrostática com as moléculas de sarcosina, carregadas negativamente (R-COO^-) (TORRESI *et al.*, 2001; VIDOTTI; TORRESI; KUBOTA, 2008), diminuindo assim o sinal analítico.

Figura 26 – Variação da corrente anódica em relação à concentração da solução carregadora NaOH. (A) Concentração de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) concentração de $1,12 \text{ mmol L}^{-1}$ de sarcosina no potencial de $0,7 \text{ V}$. Vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção: $121,0 \mu\text{L}$.



Assim, com o interesse de detectar baixas concentrações de sarcosina, para os estudos seguintes fixou-se a concentração da solução carregadora NaOH em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

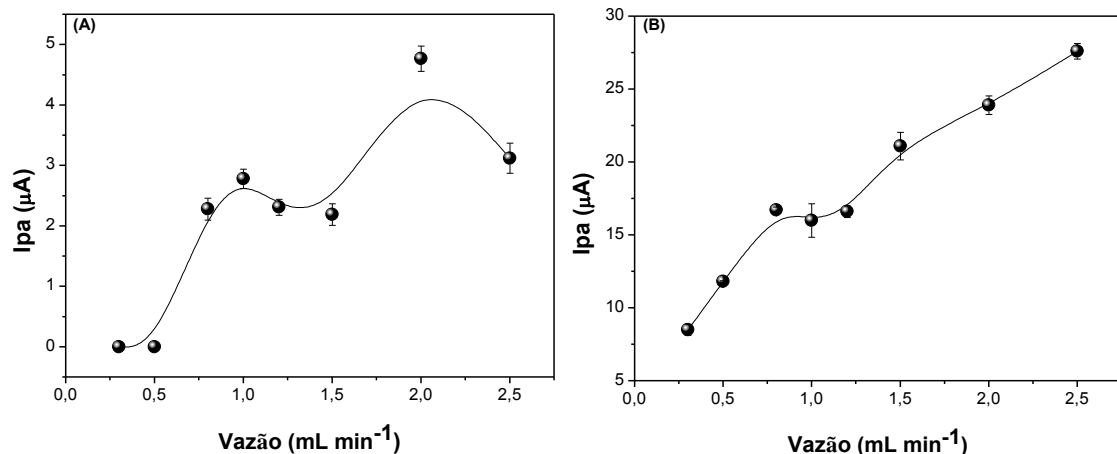
5.1.7 Estudo de Vazão da Solução Carregadora no Sistema FIA

A fim de avaliar o efeito da vazão da solução carregadora, diferentes valores foram avaliados na faixa de 0,3 à 2,5 mL min⁻¹ utilizando soluções de 100,0 µmol L⁻¹ e 1,12 mmol L⁻¹ de sarcosina. As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando a solução carregadora de NaOH 0,05 mol L⁻¹, volume de injeção de 121,0 µL e potencial de 0,7 V.

Por meio da Figura 27 (B) é possível observar um aumento no sinal de corrente para maiores valores de vazão. Este resultado pode ser explicado porque quanto menor vazão, maior é a dispersão da zona da amostra e, como a resposta obtida é dada por altura de pico, é esperado menores sinais para vazões menores. Outro aspecto que deve ser observado é a concentração de sarcosina e a cinética do processo de eletrooxidação.

Para concentração menor de sarcosina (Figura 27 (A)), constata-se que para vazões de 0,8 a 1,5 mL min⁻¹ o sinal é praticamente constante, porém quando a vazão é elevada para 2,0 mL min⁻¹ observa-se a maior resposta analítica. Este resultado indica que, nesta condição, há melhor relação entre cinética de transferência eletrônica e a dispersão da amostra associada à concentração de 100,0 µmol L⁻¹. Para vazão de 2,5 mL min⁻¹ a resposta analítica decresce, como resultado da menor dispersão da amostra e limitação cinética de transferência eletrônica.

Figura 27 – Variação da corrente anódica em relação à vazão. (A) Concentração de 100,0 µmol L⁻¹ e (B) concentração de 1,12 mmol L⁻¹ de sarcosina no potencial de 0,7 V. Solução carregadora NaOH 0,05 mol L⁻¹. Volume de injeção: 121,0 µL.



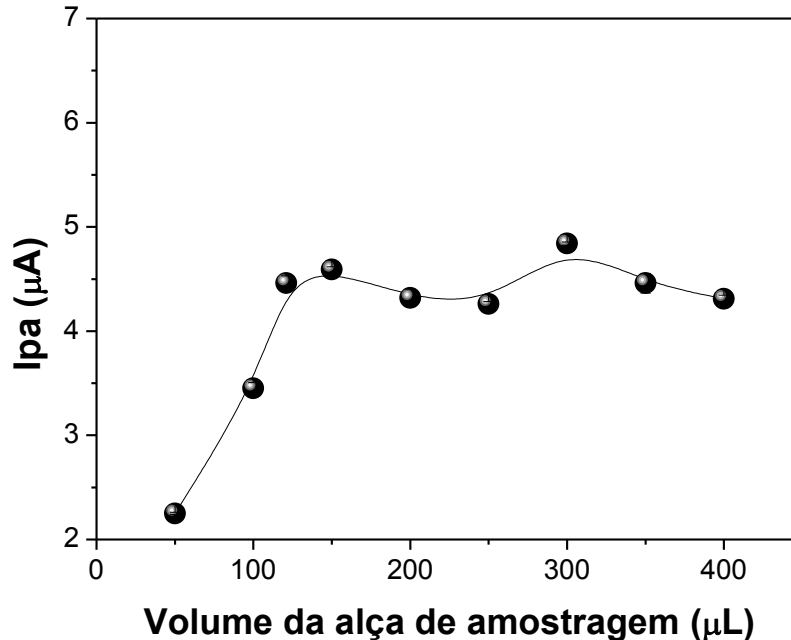
Assim, com o objetivo de detectar baixas concentrações de sarcosina, para os estudos seguintes a vazão da solução carregadora foi fixada em $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, pois como pode ser observado na Figura 27 (A), essa vazão foi a que apresentou um maior sinal de corrente ($4,77 \pm 0,21 \text{ } \mu\text{A}$) para a concentração de $100,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina.

5.1.8 Estudo do Volume da Alça de Amostragem no Sistema FIA

Com o objetivo de avaliar a influência do volume da alça de amostragem na intensidade do sinal analítico, foram injetados diferentes volumes variando de $50,0$ a $400,0 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de $100,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina. Na Figura 28 é apresentada a variação da corrente em relação ao volume da alça de amostragem utilizada.

De acordo com os dados obtidos, quando há um aumento do volume de injeção de $50,0 \text{ } \mu\text{L}$ para $121,0 \text{ } \mu\text{L}$, o sinal de corrente anódica aumenta. No entanto, observa-se, de maneira geral, que após o volume de $121,0 \text{ } \mu\text{L}$, o sinal analítico praticamente estabiliza, indicando que a dispersão da zona da amostra não é alterada após $121,0 \text{ } \mu\text{L}$. Assim sendo, o volume de $121,0 \text{ } \mu\text{L}$ ($4,46 (\pm 0,06) \text{ } \mu\text{A}$) foi escolhido como o volume ideal de injeção.

Figura 28 – Variação da corrente anódica em relação ao volume da alça de amostragem para $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina no potencial de $0,7 \text{ V}$. Solução carregadora $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Volume de injeção: $50,0$ a $400,0 \mu\text{L}$

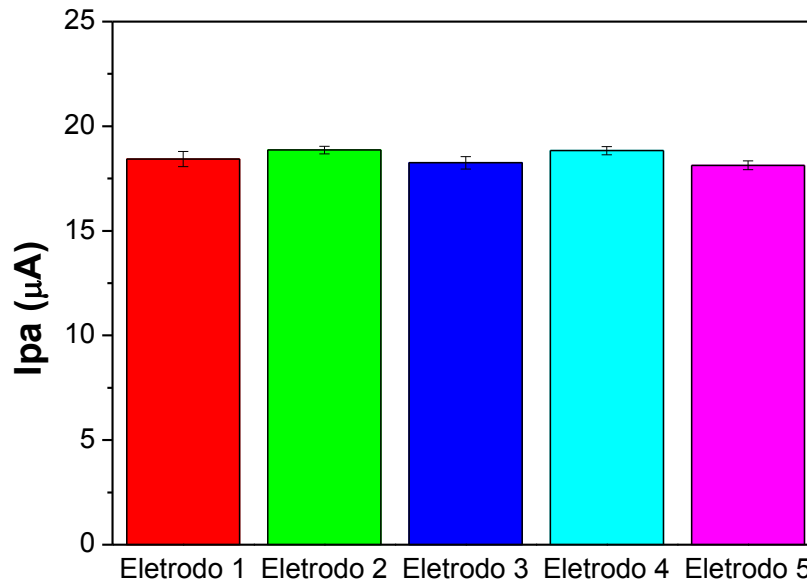


5.1.9 Estudo da Reprodutibilidade do Preparo do Sensor

Com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade do preparo do sensor, cinco eletrodos modificados com $\text{MWCNT/Nafion}^{\text{®}}/\text{Ni}(\text{OH})_2$ foram preparados de acordo com a Seção 4.3. As medidas sucessivas ($n=3$) para cada eletrodo foram realizadas utilizando cronoamperometria para sarcosina $1,12 \text{ mmol L}^{-1}$ no potencial de $0,7 \text{ V}$, solução carregadora de $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $121,0 \mu\text{L}$.

Para a resposta de corrente anódica dos cinco eletrodos estudados obteve-se uma média de $18,5 \mu\text{A}$ e um desvio padrão relativo (%DPR) de $1,8\%$, indicando uma reprodutibilidade satisfatória no preparo do sensor. Na Figura 29 é possível observar a média de corrente anódica obtida empregando cada eletrodo.

Figura 29 – Corrente de pico anódica em relação aos eletrodos estudados. Condições: Sarcosina $1,12 \text{ mmol L}^{-1}$; potencial de $0,7 \text{ V}$; solução carregadora NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e volume de injeção de $121,0 \text{ }\mu\text{L}$.



5.1.10 Estudo da Concentração de Sulfato de Níquel Utilizado na Modificação do Eletrodo Impresso de Carbono

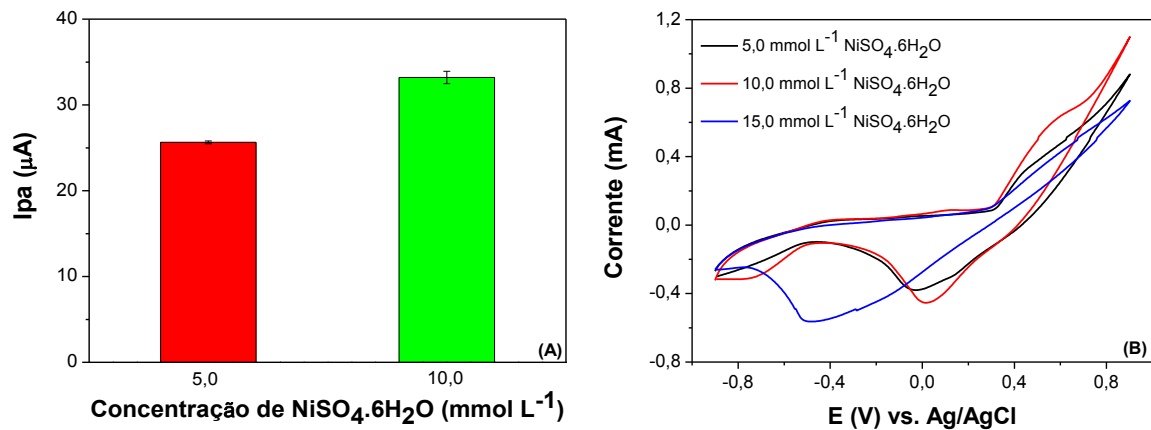
A concentração de sulfato de níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) depositada durante a modificação do eletrodo impresso de carbono foi avaliada com o objetivo de obter melhor sinal analítico na detecção de sarcosina. Assim, foram modificados três eletrodos conforme a Seção 4.3 utilizando as concentrações de sulfato de níquel de $5,0$; $10,0$ e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente.

Na Figura 30 (A) é apresentada a relação da corrente anódica com a concentração de sulfato de níquel empregada durante a modificação do eletrodo. Quando utilizado o sensor modificado com $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ não foi observada resposta para sarcosina, fato que pode ser explicado pela ausência do pico correspondente à oxidação do níquel, como observado na Figura 30 (B), pois, com o aumento da espessura do filme de Ni(OH)_2 , pode ocorrer o bloqueio da superfície do eletrodo.

Contudo, utilizando os sensores preparados com concentração de $5,0$ e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi observada resposta analítica, sendo que o sensor com $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($33,2 \pm 0,71 \text{ }\mu\text{A}$) apresentou maior sinal de corrente quando comparado com o

sensor com $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($25,64 \pm 0,17 \text{ } \mu\text{A}$). No entanto, os dois eletrodos foram avaliados em estudos posteriores para a determinação de sarcosina.

Figura 30 – (A) Variação da corrente anódica para sarcosina $1,12 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ com NiSO₄•6H₂O $5,0$ e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Condições: Solução carregadora NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; potencial de $0,7 \text{ V}$; vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $121,0 \text{ } \mu\text{L}$. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ empregando $5,0$; $10,0$ e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NiSO₄•6H₂O. Condições: Eletrólito NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 100 mV s^{-1} , 20° ciclo.



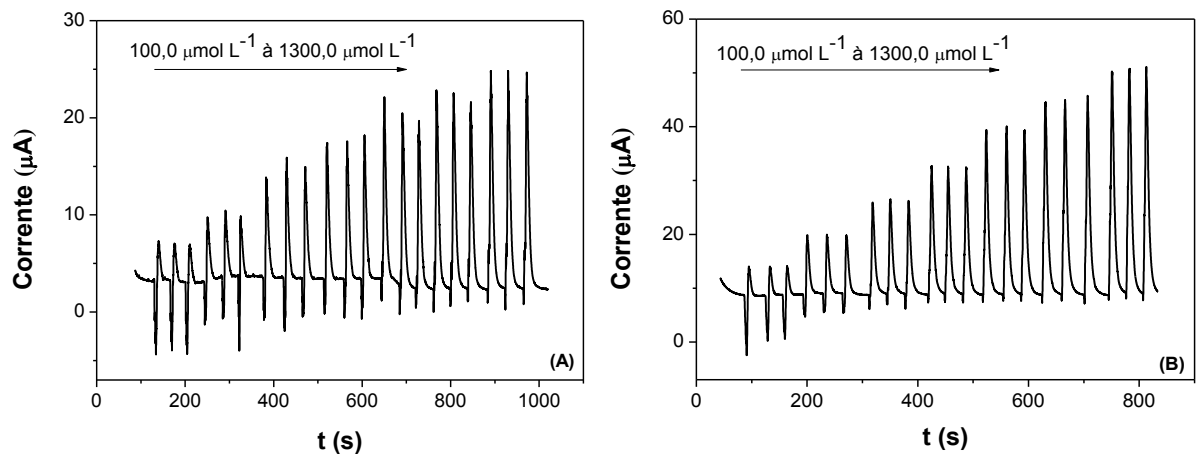
O tempo de deposição para formação de níquel reduzido (Ni^0) na superfície do eletrodo também foi avaliado em 180, 270 e 320 segundos, de acordo com a Seção 4.3. Porém, não foi observado alteração no valor de corrente aumentando o tempo de deposição, mantendo-se dessa forma o tempo de deposição em 180 segundos.

5.1.11 Desempenho Analítico do Sensor na Determinação de Sarcosina

Os parâmetros do desempenho analítico do eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ foram obtidos sob as condições eletroquímicas e do sistema FIA otimizados. A fim de avaliar a sensibilidade do método e obter menor limite de detecção e quantificação, foram construídas duas curvas analíticas: uma curva utilizando o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ empregando $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NiSO₄•6H₂O, e uma

curva utilizando o eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ empregando 10,0 mmol L⁻¹ de NiSO₄•6H₂O. Na Figura 31 são apresentados os fiagramas para as concentrações de sarcosina de 100,0 a 1300,0 μmol L⁻¹, em triplicata, para ambas as curvas.

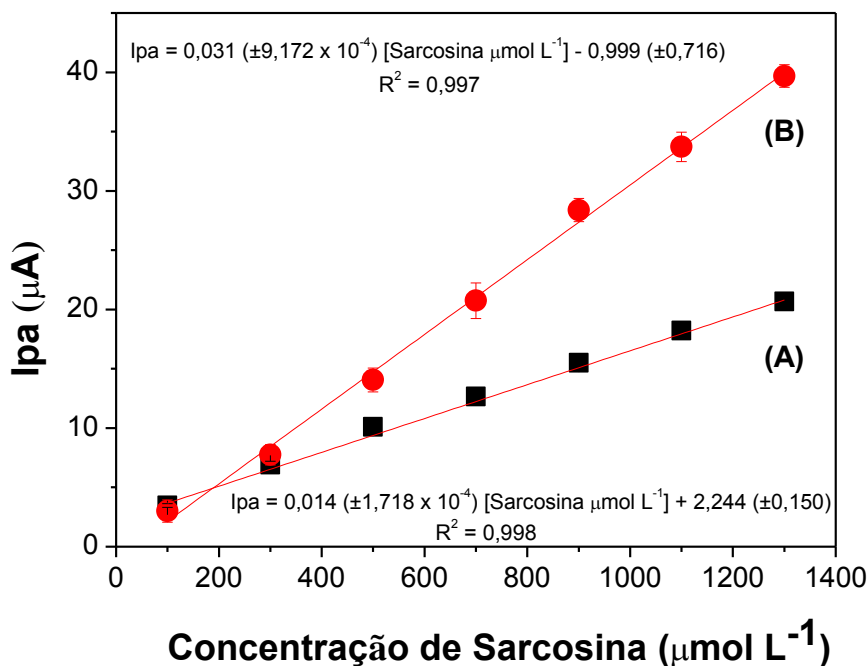
Figura 31 – Fiagramas para concentrações crescentes de sarcosina (100,0 a 1300,0 μmol L⁻¹) utilizando o eletrodo modificado com (A) 5,0 mmol L⁻¹ e (B) 10,0 mmol L⁻¹ de NiSO₄•6H₂O. Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L⁻¹, potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 121,0 μL.



Utilizando o eletrodo modificado com 5,0 mmol L⁻¹ de NiSO₄•6H₂O obteve-se a curva analítica com equação linear $I_{pa} = 0,014(\pm 1,718 \times 10^{-4})[\text{Sarcosina } \mu\text{mol L}^{-1}] + 2,244(\pm 0,150)$, apresentando coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,998. Utilizando o eletrodo modificado com 10,0 mmol L⁻¹ de NiSO₄•6H₂O obteve-se a curva analítica com equação linear $I_{pa} = 0,031(\pm 9,172 \times 10^{-4})[\text{Sarcosina } \mu\text{mol L}^{-1}] - 0,999(\pm 0,716)$, com R^2 igual a 0,997.

Na Figura 32 são apresentadas ambas as curvas, em que se observa que a sensibilidade (0,031 μALμmol⁻¹) obtida com o eletrodo modificado com 10,0 mmol L⁻¹ de NiSO₄•6H₂O é superior (0,014 μALμmol⁻¹) àquela modificado com 5,0 mmol L⁻¹ de NiSO₄•6H₂O.

Figura 32 – Curva analítica de sarcosina utilizando o eletrodo modificado com (A) 5,0 mmol L⁻¹ e (B) 10,0 mmol L⁻¹ de NiSO₄·6H₂O. Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L⁻¹, potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 121,0 μL.



Após a construção das curvas analíticas, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983), sendo $LD = 3S_b/m$ e $LQ = 10S_b/m$, onde S_b é o desvio padrão para medidas do branco e m o coeficiente angular da curva analítica. Para a curva (A) foram obtidos LD de 27,0 μmol L⁻¹ e LQ de 90,0 μmol L⁻¹, e para a curva (B) foram obtidos LD de 19,0 μmol L⁻¹ e LQ de 62,0 μmol L⁻¹.

A linearidade da curva (B) foi verificada por análise de variância (ANOVA), tendo-se como hipótese nula $H_0: \beta=0$, em que não há relação linear entre as variáveis. Assim, aplicou-se o teste F com intervalo de confiança de 95%, em que a relação entre $MS_{regressão}/MS_{resíduo}$ foi de 2813,68, sendo este valor muito maior que o valor tabelado ($F_{14,1} = 245,35$), podendo desta forma descartar a hipótese nula, considerando-se que existe relação linear entre as variáveis. Ainda, a relação entre $MS_{falta\ de\ ajuste}/MS_{erro\ puro}$ foi de 1,48, sendo menor que o valor tabelado ($F_{5,14} = 2,96$), o que confirma o bom ajuste ao modelo linear (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

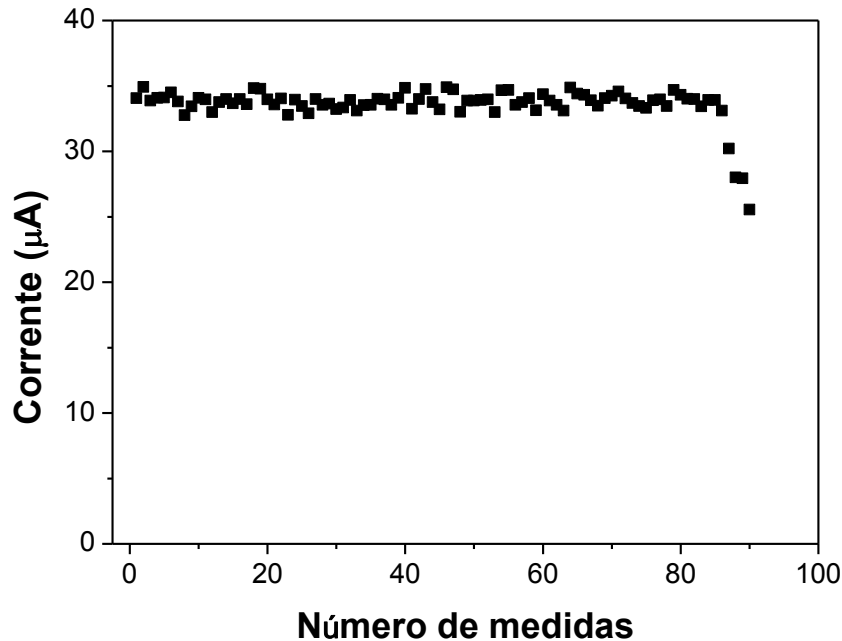
A precisão intradia (n=6) e interdia (n=2) foi avaliada por meio de repetições de análises (n=6), em solução de sarcosina de três concentrações diferentes (300,0; 700,0 e 1100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). O desvio padrão relativo (%DPR) para medidas intradia variou de 1,7 a 6,8%, enquanto que a precisão interdia variou de 3,8 a 7,4%.

5.1.12 Estudo para Avaliar a Reusabilidade do Sensor

A reusabilidade do sensor foi avaliada por meio de injeções no mesmo dia de uma solução de sarcosina 1,12 mmol L^{-1} no sistema FIA com detecção eletroquímica em condições otimizadas. Na Figura 33 está apresentado a corrente anódica obtida em relação ao número de medidas realizadas.

Como pode ser observado, o sensor apresentou estabilidade elevada com 86 medidas e depois a resposta analítica começou a diminuir. Este resultado é considerado satisfatório para o uso em análises de rotina, visto que o sensor não necessita de lavagem entre as medidas.

Figura 33 – Corrente anódica para sarcosina $1,12 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando eletrodo impresso de carbono modificado com MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂ em relação ao número de medidas. Condições analíticas: Solução carregadora NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, potencial de $0,7 \text{ V}$, vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $121,0 \text{ } \mu\text{L}$.



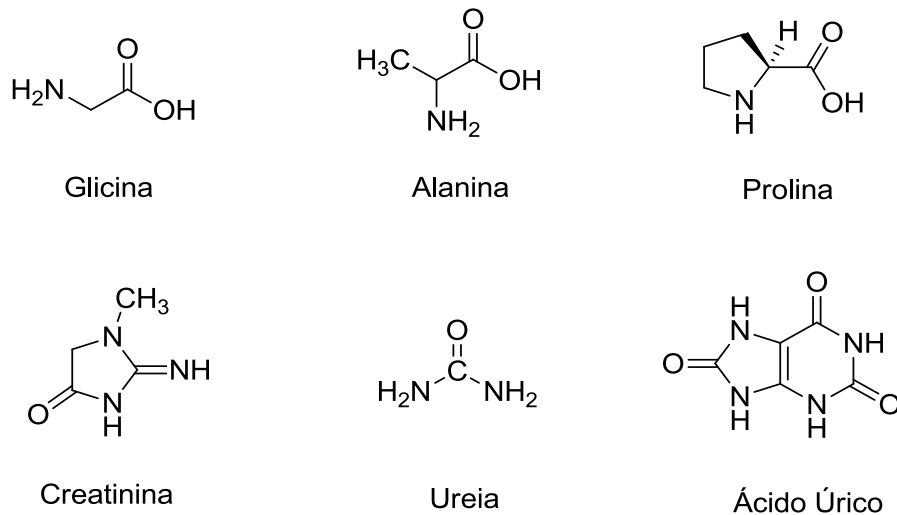
5.1.13 Avaliação de Possíveis Interferentes na Detecção de Sarcosina Utilizando o Método Eletroanalítico Desenvolvido

Com as condições otimizadas do método, foram analisados possíveis interferentes presentes em amostras de urina, dentre eles glicina (GLI), alanina (ALA), prolina (PRO), creatinina (CRE), ureia (URE) e ácido úrico (AUR) na concentração de $100,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, a fim de avaliar a seletividade do sensor. Na figura 34 pode-se observar as estruturas químicas dos interferentes utilizados e na Figura 35 as correntes obtidas para sarcosina e os interferentes estudados.

Com base nos resultados apresentados pela Figura 35, foi possível constatar que o método permite detectar glicina, alanina, prolina e ureia além de sarcosina. Isso pode ser explicado com base nas estruturas dessas moléculas, que como apresentado na Figura 34, apresentam estruturas semelhantes. Contudo, o sensor não apresentou resposta para creatinina e ácido úrico, esse resultado pode ser

justificado com base nas estruturas mais complexas que estas moléculas apresentam quando comparadas com sarcosina, glicina, alanina, prolina e ureia.

Figura 34 – Estruturas dos interferentes.



Fonte: o próprio autor.

Figura 35 – Correntes obtidas para sarcosina, glicina, alanina, prolina, creatinina, ureia e ácido úrico na concentração de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução carregadora de $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, no potencial de $0,7 \text{ V}$ com vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume injetado de $121,0 \mu\text{L}$.



Assim, apesar do método eletroanalítico desenvolvido ter apresentado resultados satisfatórios para a determinação de sarcosina, observa-se ausência de seletividade. Pode-se observar também, que o limite de quantificação (LQ = 62,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) ainda não é suficiente para detectar sarcosina em amostras de urina, pois, de acordo com a literatura, esta é encontrada em baixas concentrações em urina (na faixa de 0,11 a 5,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (SREEKUMAR *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2010; SHAMSIPUR; NASERI; BABRI, 2013).

Desta forma, como relatado inicialmente, a utilização da técnica de extração em fase sólida empregando polímero molecularmente impresso como sorvente para extração/pré-concentração de sarcosina torna-se indispensável para reduzir o limite de quantificação e melhorar a seletividade do método eletroanalítico proposto, pois, a pré-concentração e o *clean-up* de amostras proporcionados pela técnica de SPE são essenciais para possibilitar a análise.

Assim, o material polimérico contendo impressão para sarcosina (MIP) foi sintetizado, caracterizado e comparado com o seu respectivo polímero sem impressão química (NIP). Além disso, o método de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) foi otimizado e aplicado em amostra de urina sintética, a fim de avaliar a eficiência do material para extração/pré-concentração de sarcosina em uma matriz complexa.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP E NIP-AMPS-VP

Os materiais SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP sintetizados foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada em Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), fisissorção de gás nitrogênio à 77 K e análise elementar.

5.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Com o intuito de verificar a presença de grupos funcionais e a influência da molécula molde na síntese dos materiais, foi realizada a caracterização por espectroscopia de infravermelho dos polímeros MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP,

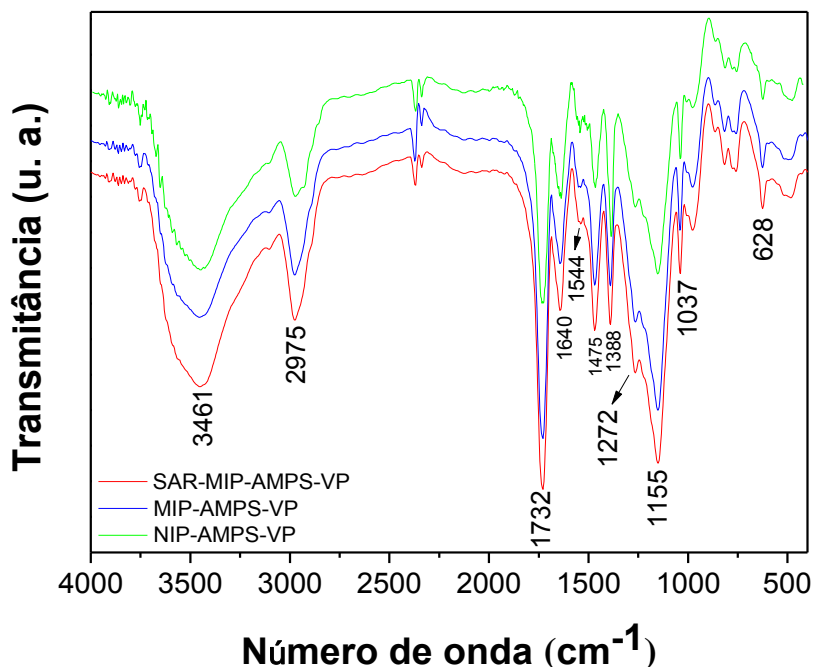
bem como do polímero contendo a molécula molde denominado SAR-MIP-AMPS-VP.

Na Figura 36 são apresentados os espectros do SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP. Uma banda ampla em 3461 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações O-H das moléculas de água adsorvidas fisicamente na superfície dos materiais, bem como ao estiramento N-H presente no AMPS (ÇAVUŞ; GÜRDAĞ, 2008; GREESH *et al.*, 2008; CASARIN *et al.*, 2018). A banda em 2975 cm^{-1} é atribuída ao estiramento simétrico e assimétrico de carbono sp^3 das ligações $-\text{CH}_3-$ e $-\text{CH}_2-$ da cadeia polimérica (CASARIN *et al.*, 2018).

A banda em 1732 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo carbonila $\text{C}=\text{O}$ presente no éster $[\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}]$ do TRIM e na amida $[\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{R}]$ do AMPS, enquanto que a banda em 1640 cm^{-1} é atribuída aos grupos vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) residuais da cadeia polimérica e à vibração do estiramento do grupo $-\text{C}(\text{O})-\text{N}-$ presente na amida (ZHANG *et al.*, 2003; GREESH *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2008; ANIRUDHAN; SANDEEP, 2011). Foi observada uma banda pouco acentuada em 1544 cm^{-1} , a qual é característica do $\text{C}=\text{C}$ do anel da 4-VP e também do dobramento N-H do grupo amida presente no AMPS (ANIRUDHAN; SANDEEP, 2011; GROCHOWICZ, 2014).

A banda em 1475 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{N}$ presente no anel piridínico e ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{N}$ presente na amida, característica do AMPS. Em 1388 cm^{-1} foi observada a banda correspondente à deformação angular fora do plano de CH_3- presente no AMPS e no TRIM. As bandas em 1272 e 1037 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento $\text{S}=\text{O}$ do AMPS (GREESH *et al.*, 2008; PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; GROCHOWICZ, 2014). Em 1155 cm^{-1} foi observada a banda correspondente às ligações $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ do TRIM (GROCHOWICZ, 2014). Em 628 cm^{-1} pode-se observar uma banda característica do estiramento $\text{S}-\text{O}$ presente no AMPS (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009).

Figura 36 – Espectro FT-IR do SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP.



Ainda, a partir da semelhança obtida nos espectros para o SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP, pode-se inferir que os grupos funcionais presentes da molécula molde são mascarados pelos grupos funcionais dos outros reagentes, portanto, a ausência da molécula (sarcosina) nos espectros não modifica o perfil do infravermelho.

5.2.2 Análise Termogravimétrica

A fim de obter informações relacionadas à estabilidade térmica e efeito dos reagentes na organização da cadeia polimérica no MIP-AMPS-VP, foi realizada a análise termogravimétrica. A curva termogravimétrica (TG) e a curva termogravimétrica derivada (DTG) são apresentadas na Figura 37.

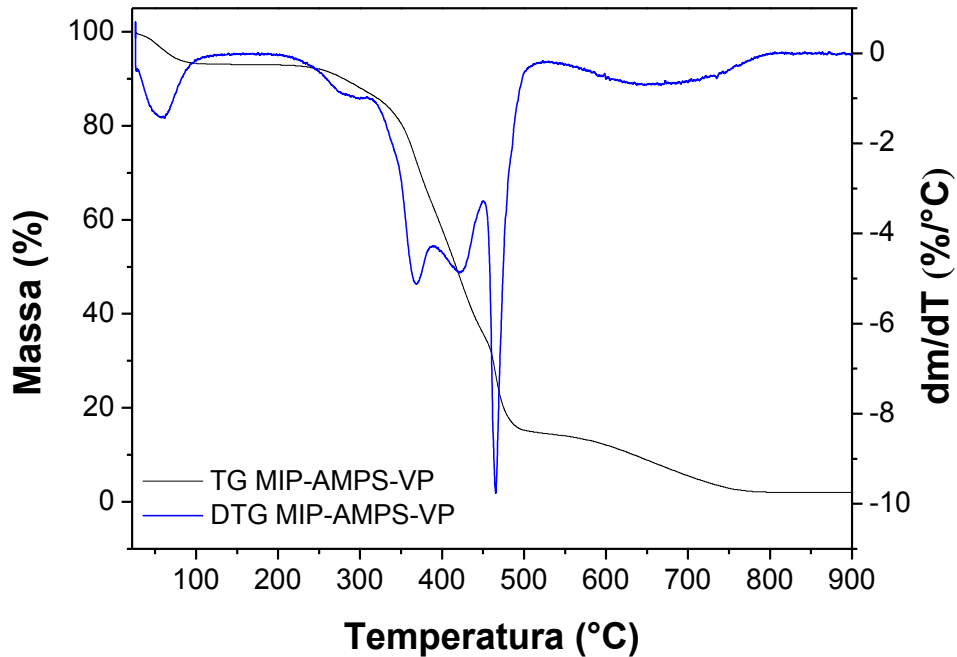
O evento observado na faixa de temperatura de 24,83 °C a 103,82 °C com uma taxa de perda máxima em 59,13 °C e 6,5% de perda de massa, corresponde à remoção de água fisicamente adsorvida no material (CASARIN *et al.*, 2018). Acima de 200,00 °C foram observados 5 eventos de degradação do MIP-AMPS-VP. O primeiro evento foi observado na faixa de temperatura de 221,28 °C a 315,17 °C

com uma perda de 6,6% na massa com degradação máxima em 280,69 °C característico da degradação da ligação -OH do ácido sulfônico (-SO₂-OH) presente no AMPS (ERKARTAL *et al.*, 2016).

Na faixa de temperatura de 326,86 °C a 389,06 °C observa-se o segundo evento com máxima degradação em 366,09 °C e perda de massa de 23,4%, o qual pode ser atribuído à degradação térmica do grupo amida do AMPS (LIMPARYOON; SEETAPAN; KIATKAMJORNWONG, 2011). O terceiro evento foi observado na faixa de temperatura de 389,06 °C a 449,41 °C com uma taxa máxima de perda de massa em 424,10 °C podendo este ser atribuído à degradação dos segmentos da 4-VP presente na cadeia polimérica (GROCHOWICZ, 2014). Este evento apresentou uma perda de massa de 27,5%. Um quarto evento foi observado na faixa de 449,41 °C a 503,14 °C com perda de massa de 20,9% e um máximo de degradação em 466,40 °C atribuído à degradação do reagente de ligação cruzada TRIM (GROCHOWICZ, 2014).

Por fim, um quinto evento na faixa de 545,18 a 800,08 °C com redução de massa de 11,8% e uma taxa máxima de perda de massa em 687,16 °C foi observado e pode indicar a eliminação da molécula de SO₂ durante a degradação (BAO; MA; LI, 2011). Uma porcentagem residual de 3,3% foi obtida para o polímero.

Figura 37 – Curva termogravimétrica e curva termogravimétrica derivada para o MIP-AMPS-VP. Vazão de N₂: 20,0 mL min⁻¹ com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ a 900 °C.



Ainda, de acordo com o perfil termogravimétrico obtido, observa-se que os eventos de perda de massa bem definidos foram atribuídos a cada unidade repetitiva presente no copolímero.

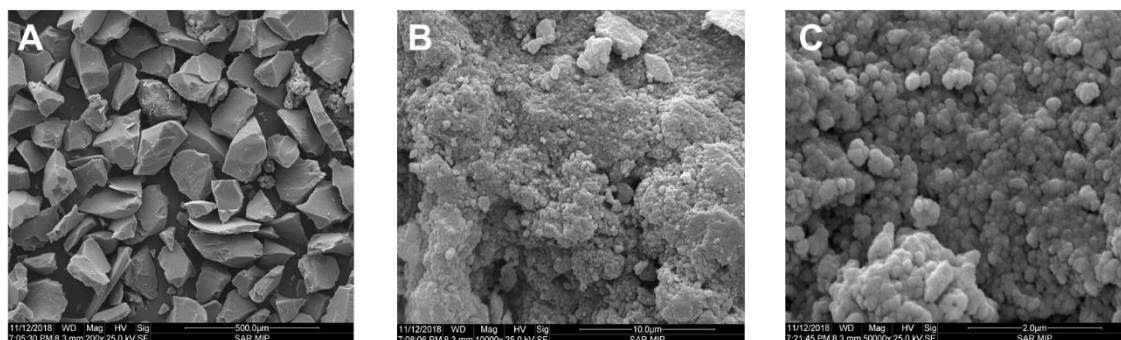
5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As características morfológicas do SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP foram determinadas a partir das micrografias obtidas com a microscopia eletrônica de varredura, apresentadas na Figura 38.

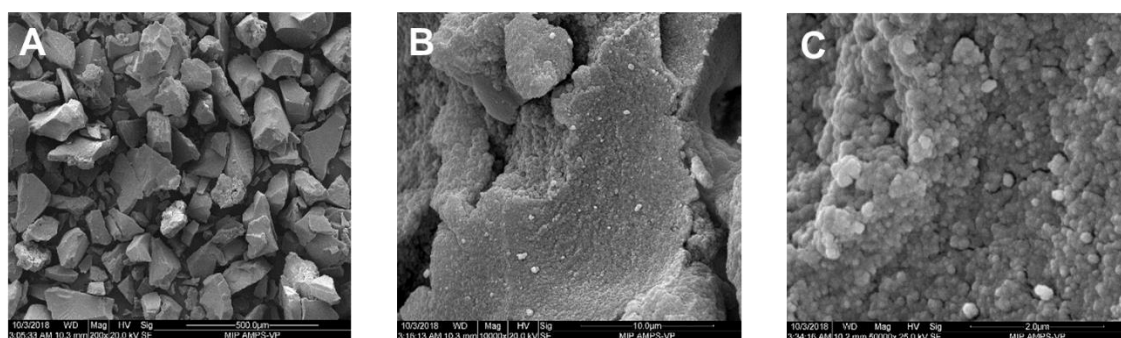
Como pode ser observado, a morfologia dos materiais é rugosa e similar, indicando que o fato do MIP ser mais seletivo em relação ao NIP para sarcosina, conforme será posteriormente mostrado, se deve à impressão química formada e não às características morfológicas do polímero. Ainda, por meio das imagens pode-se observar que a presença de sarcosina não interferiu na morfologia do material.

Figura 38 – Micrografias eletrônicas de varredura do SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP com ampliações de (A) 200, (B) 10000 e (C) 50000 vezes.

SAR-MIP-AMPS-VP

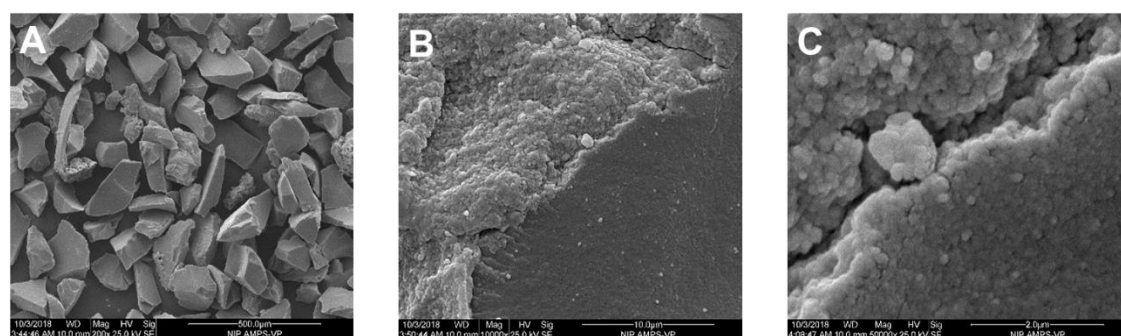


MIP-AMPS-VP



(Continuação)

NIP-AMPS-VP



5.2.4 Fisissorção de Gás Nitrogênio à 77 K

As medidas de área específica, volume de poro e diâmetro médio de poro foram determinadas empregando o método de fisissorção de gás nitrogênio à 77 K.

O modelo BET (Brunauer, Emmett, Teller) foi aplicado aos dados obtidos para determinar a área específica e o modelo BJH (Barret, Joyner, Halenda) para determinar o volume e tamanho de poros dos polímeros. Esses métodos são os mais comuns para determinar a área específica de um sólido e tem como princípio a adsorção-dessorção de nitrogênio (LEOFANTI *et al.*, 1998; THOMMES *et al.*, 2015). Na Tabela 1 são apresentados os dados texturais para o SAR-MIP-AMPS-VP, MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP.

Como visto na Tabela 1, os polímeros que não contém sarcosina (MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP) apresentam um pequeno aumento no valor de área específica em comparação com o polímero que contém a molécula molde (SAR-MIP-AMPS-VP), uma vez que a sarcosina ocupa alguns poros no material, diminuindo a área específica. No entanto, a presença da molécula não interferiu nos valores do volume total do poro e no diâmetro de poro. A partir dos valores de diâmetro de poro, os polímeros podem ser classificados como mesoporosos, por apresentarem diâmetro de poro entre 2 e 50 nm de acordo com a IUPAC (LEOFANTI *et al.*, 1998; ZDRAVKOV *et al.*, 2007; THOMMES *et al.*, 2015).

A partir dos dados obtidos, constata-se ainda que o NIP-AMPS-VP apresenta área superior ao MIP-AMPS-VP. Assim, pode-se inferir que a maior capacidade sortiva do material impresso, como será discutido posteriormente, pode ser atribuída à presença de sítios de ligação entre os monômeros e a sarcosina, formados durante a síntese do material impresso. Neste ponto, tal como observado pelas imagens de MEV, os dados texturais permitem inferir que a maior sorção e seletividade do MIP para sarcosina em relação ao NIP, conforme será demonstrado, se deve, de fato, à impressão química e sem influência dos dados texturais.

Tabela 1 – Área específica, volume de poro e tamanho de poro dos polímeros.

Material	Área específica (m ² g ⁻¹)	Volume total de poro (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro de poro (nm)
SAR-MIP-AMPS-VP	159,60	0,12	3,35
MIP-AMPS-VP	168,70	0,10	3,36
NIP-AMPS-VP	186,70	0,15	3,34

5.2.5 Análise Elementar

A composição percentual nos polímeros MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP foram investigadas utilizando análise elementar do teor de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Os resultados obtidos pela análise estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos pela análise elementar dos polímeros.

Polímero	C (%)	H (%)	N (%)
MIP-AMPS-VP	57,75 ± 0,14	7,42 ± 0,30	1,91 ± 0,07
NIP-AMPS-VP	56,64 ± 0,21	7,73 ± 0,07	1,89 ± 0,01

De acordo com os valores obtidos, os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram semelhantes entre o MIP-AMPS-VP e o NIP-AMPS-VP, esse resultado indica que a presença da molécula modelo na síntese não interferiu na taxa de conversão dos reagentes. Ainda, a seletividade do material muito provavelmente é atribuída à impressão química do material, sem influência da composição percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos materiais.

5.3 AVALIAÇÃO DE MIP-AMPS-VP COMO SORVENTE DE SPE PARA SARCOSINA

A fim de investigar a capacidade de sorção do MIP-AMPS-VP sintetizado para sarcosina avaliou-se o efeito do pH na sorção do analito e a eficácia da sorção do MIP em relação ao NIP. Para estes estudos, 200,0 mg do material foram utilizados para recheiar um cartucho convencional de SPE. O procedimento de SPE consistiu em três etapas:

1ª etapa- Condicionamento do cartucho com 5,0 mL de água ultrapura;

2ª etapa- Percolação de 10,0 mL das soluções de sarcosina na concentração de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pelo cartucho utilizando uma bomba peristáltica para a propulsão das

soluções com uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os efluentes obtidos foram analisados empregando o método eletroanalítico desenvolvido neste trabalho.

3ª etapa- Remoção da sarcosina retida no MIP-AMPS-VP com intuito de utilizar novamente este material em processos de sorção, por meio da percolação de $50,0 \text{ mL}$ de $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

5.3.1 Otimização do pH na Sorção de Sarcosina

A influência do pH na sorção de sarcosina utilizando o MIP-AMPS-VP foi avaliada na faixa de 2,0 a 11,0 e o perfil obtido é apresentado na Figura 39. Como pode ser observado, a maior sorção de sarcosina usando o MIP-AMPS-VP ocorreu em pH 5,0. Neste valor de pH a molécula de sarcosina encontra-se carregada positivamente ($\text{R-NH}_2^+\text{-R}$) e negativamente (R-COO^-) como apresentado na Figura 40, enquanto que o nitrogênio do grupo piridínico encontra-se protonado ($\text{pK}_a = 5,46$) (Figura 41) e o AMPS desprotonado (Figura 42), representado pelo grupo SO_3^- .

Assim, a sorção de sarcosina ocorre devido à interação entre o átomo O^- da sarcosina com o NH^+ da 4-VP, e por meio do grupo NH_2^+ da sarcosina com o grupo SO_3^- do AMPS (ZHANG *et al.*, 2003) (Figura 43), tornando a capacidade de reconhecimento molecular mais pronunciada. Desta forma, a sorção do MIP-AMPS-VP foi obtida em pH 5,0, com valor de $0,43 \text{ mg g}^{-1}$. Com base neste resultado, a sorção do NIP-AMPS-VP também foi realizada em pH 5,0, cuja sorção foi de $0,30 \text{ mg g}^{-1}$ (Figura 44).

Figura 39 – Sorção de sarcosina no MIP-AMPS-VP em função do pH. Foram percolados 10,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina e o efluente foi analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.

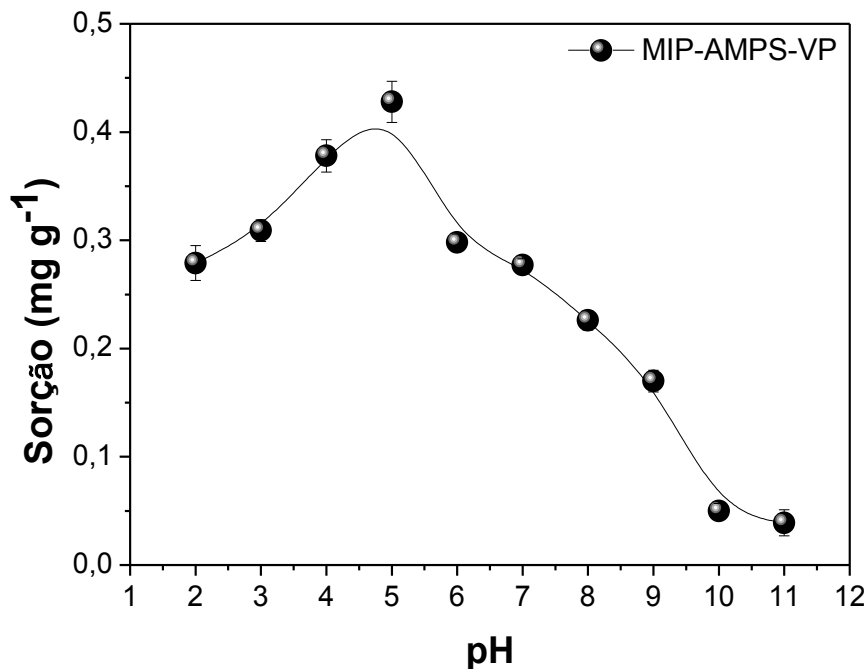
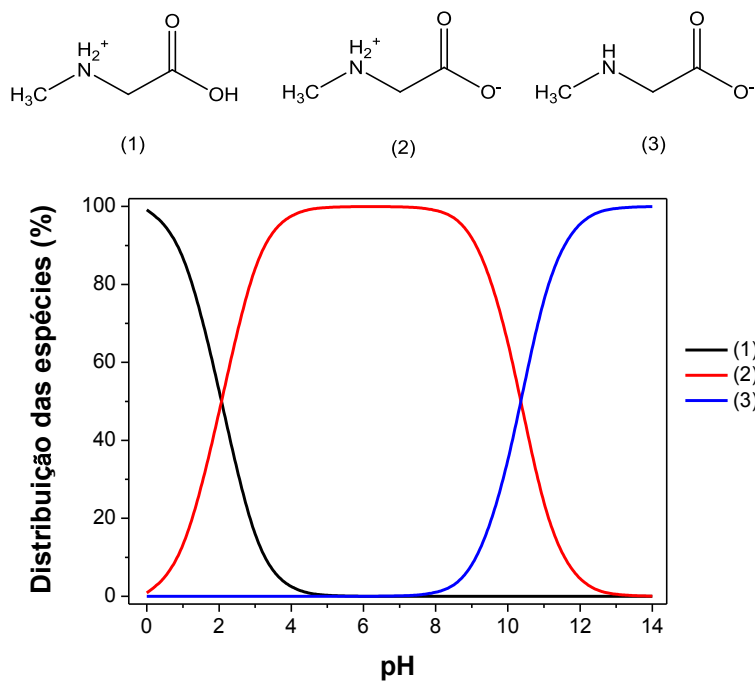
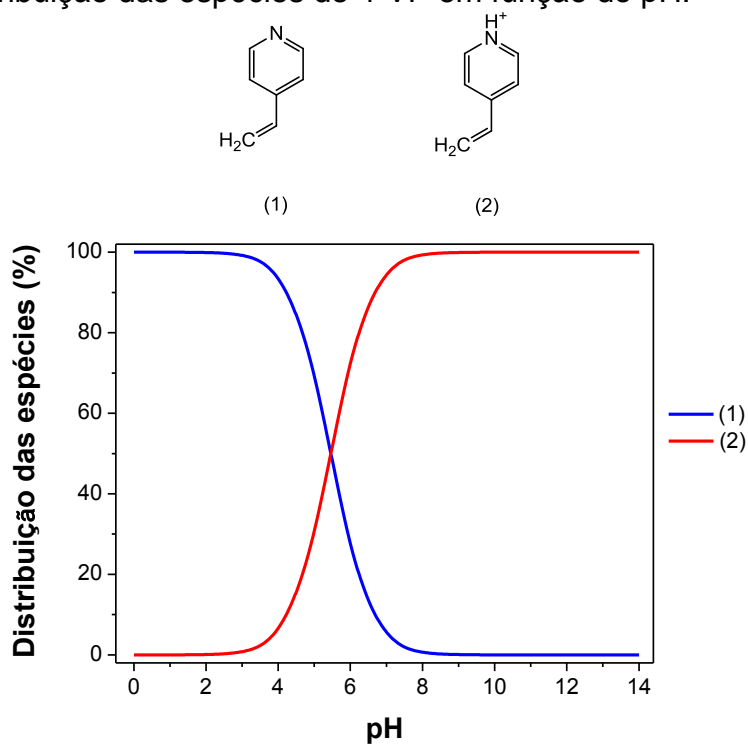


Figura 40 – Distribuição das espécies de sarcosina em função do pH.



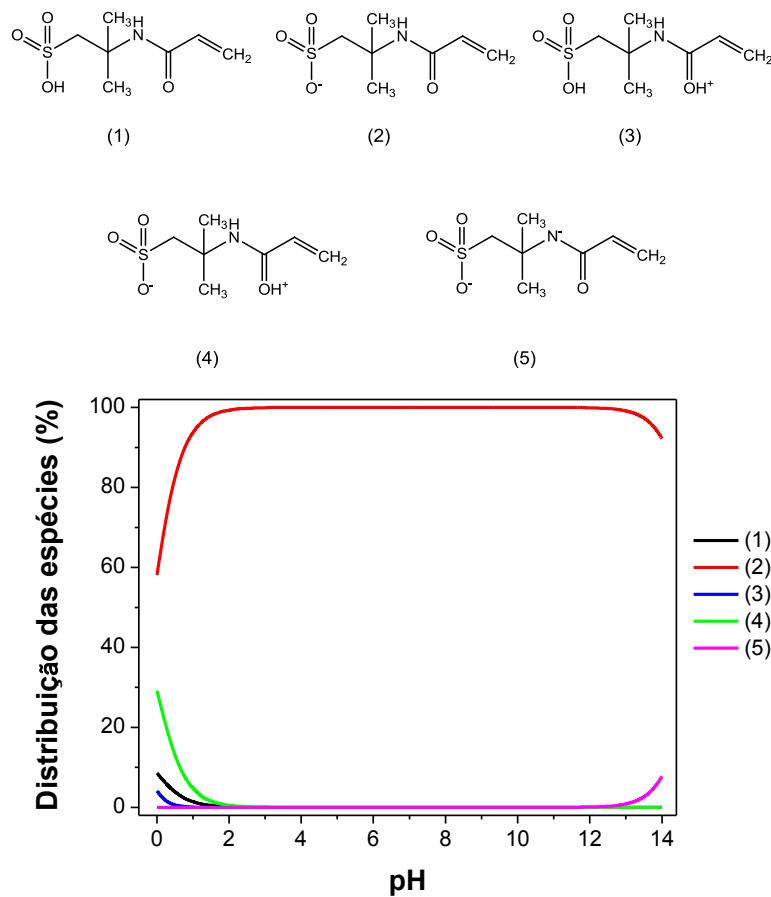
Fonte: Adaptado de CHEMICALIZE, 2018.

Figura 41 – Distribuição das espécies de 4-VP em função do pH.



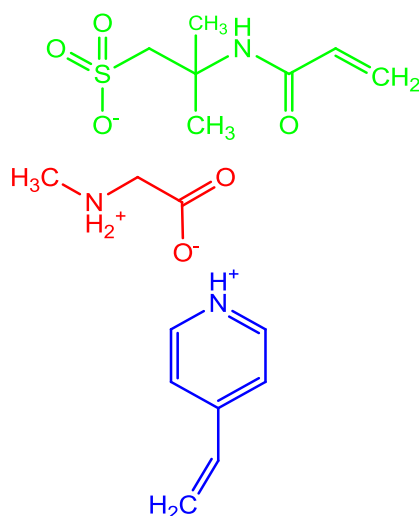
Fonte: Adaptado de CHEMICALIZE, 2018.

Figura 42 – Distribuição das espécies de AMPS em função do pH.



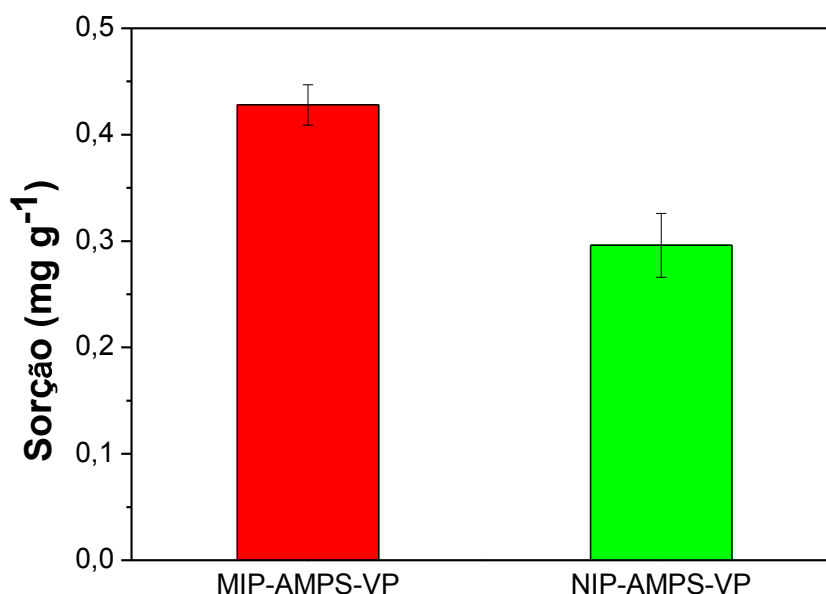
Fonte: Adaptado de CHEMICALIZE, 2018.

Figura 43 – Representação da interação entre sarcosina e os monômeros funcionais AMPS e 4-VP em pH 5,0.



Fonte: o próprio autor.

Figura 44 – Sorção de sarcosina no MIP-AMPS-VP e NIP-AMPS-VP em pH 5,0. Foram percolados 10,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina e o efluente foi analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.



Considerando a maior sorção de sarcosina no MIP-AMPS-VP comparado ao NIP-AMPS-VP, pode-se inferir que possivelmente há a presença de sítios de ligação para sarcosina no material impresso. Esse dado é reforçado, conforme já mencionado, pelos dados texturais, no qual a área específica obtida para o MIP-

AMPS-VP é inferior a área apresentada pelo NIP-AMPS-VP, indicando que a capacidade de sorção de sarcosina independe dos dados texturais obtidos.

5.3.2 Estudo da Massa do Sorvente MIP-AMPS-VP na Sorção de Sarcosina

Com o intuito de avaliar a influência da massa do sorvente empacotado no cartucho de SPE, foram estudados 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0 mg do material. Inicialmente cada cartucho foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura, e, em seguida, 10,0 mL de uma solução de sarcosina na concentração de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (pH 5,0) foram percoladas pelo cartucho com vazão de 1,0 mL min^{-1} . O efluente foi recolhido e analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica. A quantidade de sarcosina sorvida foi calculada de acordo com a Equação 2 (Página 66).

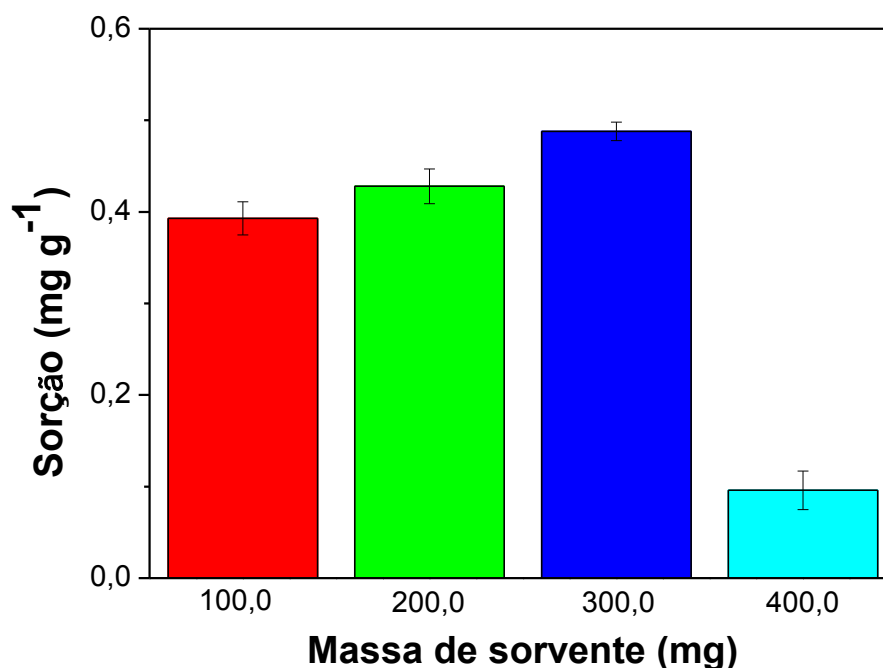
Vale salientar que, com intuito de utilizar novamente o material empacotado no cartucho em processos de sorção, foram percolados 50,0 mL de HCl 1,0 mol L^{-1} após a etapa de percolação da amostra. Na Figura 45 pode ser observada a sorção (mg g^{-1}) de sarcosina no MIP-AMPS-VP empregando as diferentes massas estudadas.

Como pode-se observar, aumentando a massa do material de 100,0 a 300,0 mg, há um aumento na sorção de sarcosina pelo polímero. Isso pode ser explicado pelo fato de que com o aumento da massa pode ocorrer um aumento no número de sítios de ligação para a molécula, e, como consequência, há maior sorção de sarcosina pelo material.

Porém, quando utilizado 400,0 mg do material, observa-se uma diminuição no valor da sorção, o que provavelmente pode ser justificado pela maior pressão gerada no cartucho quando utilizou-se uma massa superior a 300,0 mg do polímero, interferindo em sua capacidade de sorção.

Assim, a partir dos resultados obtidos, a massa de 300,0 mg de MIP-AMPS-VP foi escolhida para os estudos posteriores.

Figura 45 – Estudo de sorção em função da massa do sorvente MIP-AMPS-VP. Foram percolados 10,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina e o efluente foi analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.



5.3.3 Otimização do Solvente de Eluição na Pré-concentração de Sarcosina

Com o objetivo de avaliar o melhor solvente de eluição na SPE foi avaliada uma solução de NaOH 0,5 mol L^{-1} e uma mistura de metanol:ácido acético (MeOH: HAc, 90:10, v/v). O uso de NaOH como possível solvente de eluição foi devido ao fato de que uma eluição utilizando uma solução mais concentrada da solução carregadora/eletrólito suporte, melhoraria a frequência analítica do método, além de descartar o uso de solventes orgânicos.

No entanto, a literatura reporta o emprego de MeOH e HAc como eluente de aminoácidos, em que a combinação destes tem apresentado resultados satisfatórios (KEMPE; MOSBACH, 1995; CAI *et al.*, 2014). Adicionalmente, o uso de metanol como solvente de eluição tem sido utilizado em métodos que empregam cartuchos de SPE que apresentam grupos sulfônicos em sua estrutura (ZIARRUSTA *et al.*, 2016).

Dessa forma, inicialmente, o cartucho SPE foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura, e, em seguida, 100,0 mL de uma solução de sarcosina na

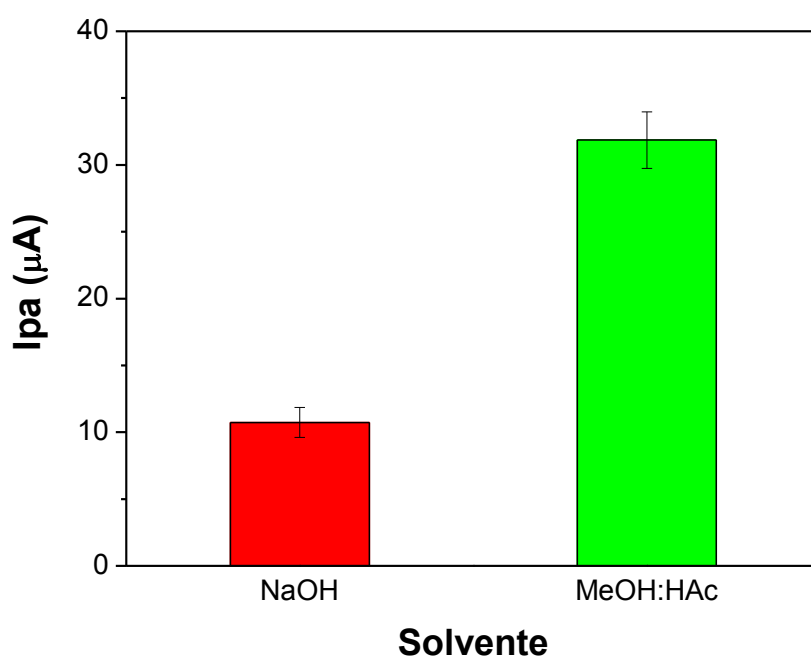
concentração de $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (pH 5,0) foram percoladas pelo cartucho com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A eluição foi realizada com $2,0 \text{ mL}$ de cada solvente estudado com vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. A eficiência de eluição de cada solvente está apresentada na Figura 46.

Vale salientar que, quando utilizado a mistura MeOH:HAc (90:10, v/v) como solvente de eluição, o eluato foi evaporado e recuperado em $0,5 \text{ mL}$ da solução carregadora/eletrólito suporte NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode-se observar, quando utilizada a mistura MeOH:HAc (90:10, v/v), o sinal de corrente anódica foi superior quando comparado com NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Assim, MeOH:HAc (90:10, v/v) foi escolhido como solvente de eluição.

Além disso, o volume do solvente de eluição foi fixado em $2,0 \text{ mL}$ por este volume compreender a quantidade de material empacotado no cartucho, bem como por ter apresentado resultados satisfatórios de eluição.

Figura 46 – Corrente de pico anódica em função do solvente de eluição. Foram percolados $100,0 \text{ mL}$ de uma solução de $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina e eluído com $2,0 \text{ mL}$ de solvente.

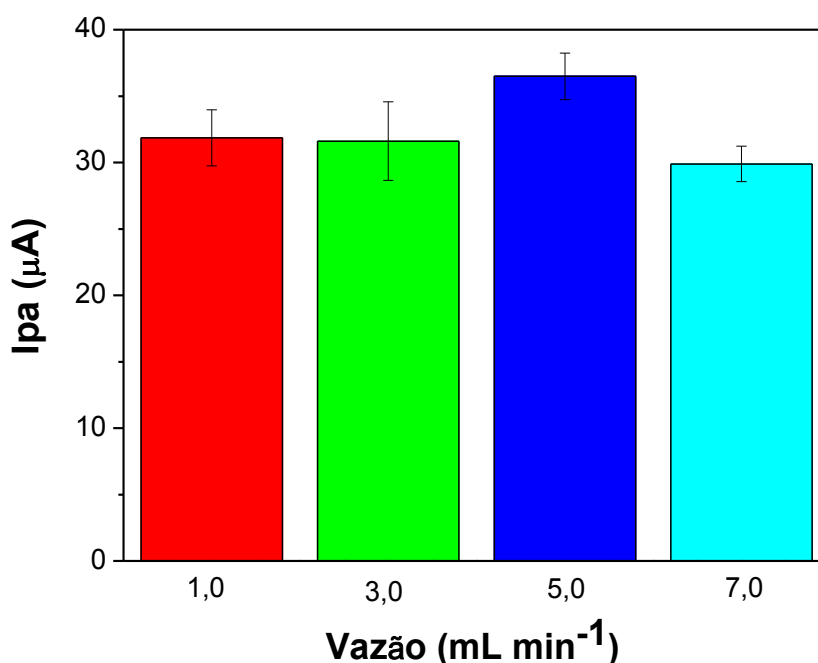


5.3.4 Avaliação da Vazão na Pré-concentração de Sarcosina

A vazão de pré-concentração foi estudada a fim de verificar sua influência na pré-concentração de sarcosina. Primeiramente, o cartucho foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura, e, em seguida, 100,0 mL de uma solução de sarcosina na concentração de $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (pH 5,0) foram percolados pelo cartucho com diferentes vazões. Em seguida, a sarcosina foi eluída com 2,0 mL de uma mistura de MeOH:HAc (90:10, v/v). O eluato foi evaporado e recuperado com 0,5 mL da solução carregadora NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica. Na Figura 47 é apresentada a variação de corrente anódica em função das vazões de 1,0; 3,0; 5,0 e 7,0 mL min^{-1} .

De acordo com os resultados obtidos, com o aumento da vazão de 1,0 para 5,0 mL min^{-1} há um pequeno aumento no sinal de corrente. No entanto, com vazão maior que 5,0 mL min^{-1} observa-se uma diminuição no sinal analítico, que pode ser atribuído à maior pressão gerada no cartucho, a qual aumenta proporcionalmente com o aumento da vazão, podendo interferir na capacidade de sorção. Dessa forma, a vazão de 5,0 mL min^{-1} foi escolhida como vazão ideal de pré-concentração.

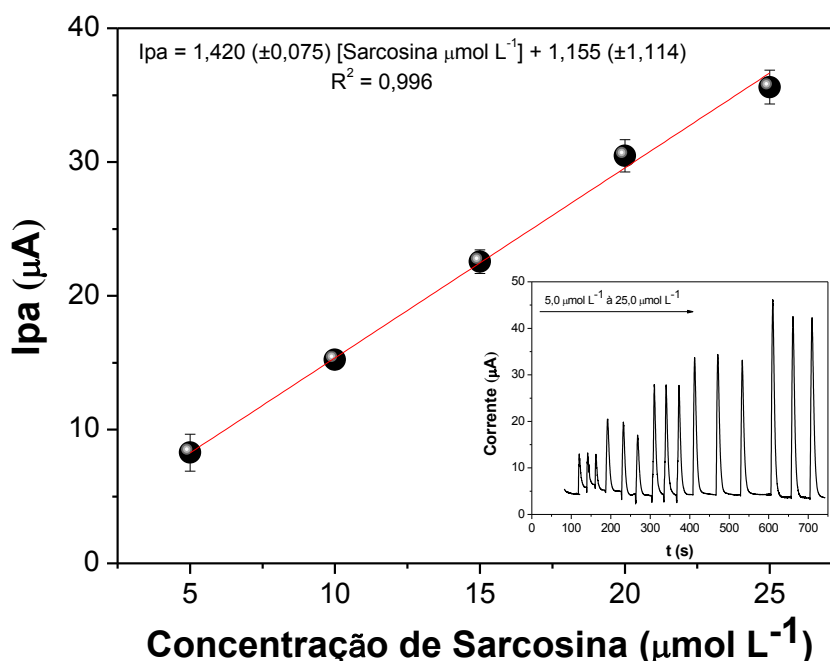
Figura 47 – Corrente de pico anódica em função da vazão de pré-concentração da amostra. Foram percolados 100,0 mL de uma solução de $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina e eluído com 2,0 mL de MeOH:HAc (90:10, v/v).



5.3.5 Características Analíticas do Método MISPE

Com a finalidade de avaliar o desempenho analítico do método de pré-concentração para sarcosina empregando MIP-AMPS-VP como sorvente, foram determinados a linearidade da curva analítica, os limites de detecção e quantificação, fator de enriquecimento e precisão. Na Figura 48 estão apresentados os diagramas para as concentrações de sarcosina de 5,0 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em triplicata, e a curva analítica com equação linear $I_{pa} = 1,420(\pm 0,075)[\text{Sarcosina } \mu\text{mol L}^{-1}] + 1,555(\pm 1,114)$, com R^2 igual a 0,996.

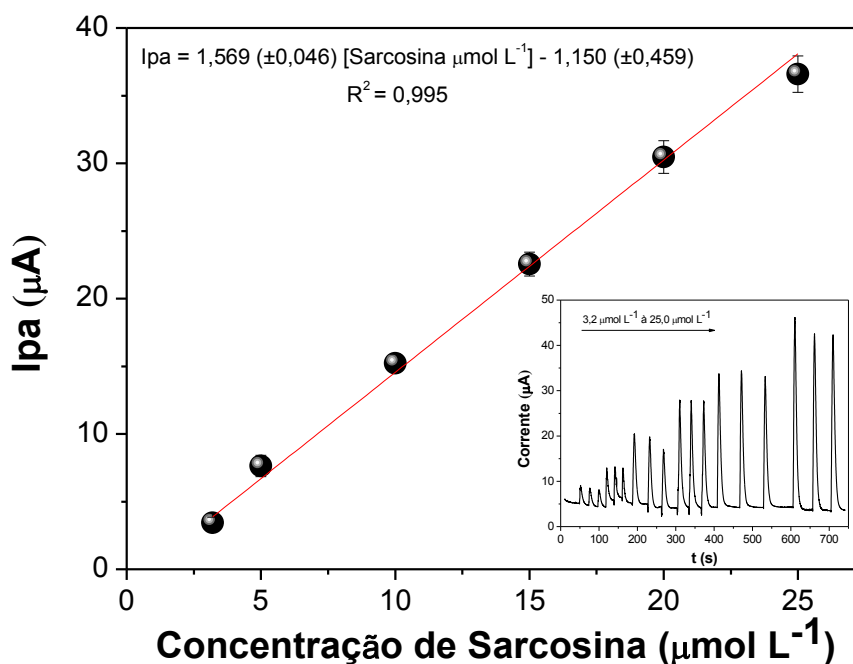
Figura 48 – Curva analítica de sarcosina com etapa de pré-concentração no cartucho de MIP-AMPS-VP. Inserido: Diagramas para concentrações crescentes de sarcosina (5,0 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L^{-1} , potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min^{-1} e volume de injeção de 121,0 μL .



Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados após a construção da curva analítica de acordo com a IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983). Desta forma, foi obtido LD de 0,96 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LQ de 3,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A concentração obtida do LQ foi preparada, pré-concentrada no cartucho MIP-AMPS-

VP, e incluída como primeiro ponto da curva analítica a fim de verificar seu efeito no coeficiente angular bem como checar se o valor teórico é mensurável com confiabilidade. Na Figura 49 são apresentados os fiagramas, em triplicata, para concentrações crescentes de sarcosina, iniciando pelo LQ, e a curva analítica com etapa de pré-concentração tendo o LQ como o primeiro ponto. Foi obtida a equação linear $I_{pa} = 1,569(\pm 0,046)[\text{Sarcosina } \mu\text{mol L}^{-1}] - 1,150(\pm 0,459)$ com R^2 igual a 0,995.

Figura 49 – Curva analítica de sarcosina com etapa de pré-concentração no cartucho de MIP-AMPS-VP incluindo o LQ. Inserido: Fiagramas para concentrações crescentes de sarcosina (3,2 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições analíticas: Solução carregadora NaOH 0,05 mol L⁻¹, potencial de 0,7 V, vazão de 2,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 121,0 μL .



Utilizando a ferramenta ANOVA (fator único), fornecida pela Microsoft® Office Excel 2013, os coeficientes angulares obtidos pelas curvas sem e com LQ foram comparados a partir do teste de hipótese para a diferença de variâncias. Foi adotada como hipótese nula (H_0), $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$, em que não há diferença entre as variáveis, assim, rejeita-se a hipótese nula se $F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$. Abaixo estão apresentados os parâmetros utilizados e na Tabela 3 encontram-se os resultados obtidos pela ANOVA fator único.

$$1) H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \quad \text{vs} \quad H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

$$2) \sigma = 0,05$$

3) F (Snedecor, com $n = 3$)

4) Região crítica: $F_{\alpha/2}$

$$5) F_{\text{cal}} = \frac{\text{MQF}}{\text{MQE}}$$

Tabela 3 – Análise de variância fator único para comparação dos coeficientes angulares obtidos pelas curvas analíticas sem e com LQ.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-p	F crítico
Entre grupos	0,00164	1	0,00164	11,21538	0,078772	18,51282
Dentro dos grupos	0,000292	2	0,000146			
Total	0,001933	3				

Assim, de acordo com os dados apresentados pela Tabela 3, F_{cal} (11,22) foi menor que $F_{\text{crít}}$ (18,51), dessa forma aceita-se a hipótese nula ao nível de 95% de significância, não havendo diferença entre os coeficientes angulares das curvas sem e com LQ.

Deste modo, posteriormente, a linearidade da curva analítica incluindo o LQ foi verificada por meio de análise de variância (ANOVA), tendo-se como hipótese nula $H_0: \beta=0$, em que não há relação linear entre as variáveis. O teste F com intervalo de confiança de 95% foi aplicado, em que a relação entre $MS_{\text{regressão}}/MS_{\text{resíduo}}$ foi de 3723,67, sendo muito maior que o valor tabelado ($F_{12,1} = 243,91$), descartando-se assim a hipótese nula e considerando-se que existe relação linear entre as variáveis. Além disso, a relação entre $MS_{\text{falta de ajuste}}/MS_{\text{erro puro}}$ foi de 2,85, menor que o valor tabelado ($F_{5,14} = 3,26$), o que comprova o bom ajuste ao modelo.

A precisão intradia ($n=6$) e interdia ($n=2$) do método foi determinada calculando o desvio padrão relativo (%DPR) para seis réplicas de análises ($n=6$) de soluções de sarcosina em três concentrações diferentes (10,0; 15,0 e 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

submetidas ao procedimento MISPE. O desvio padrão relativo para medidas intradia variou de 2,2 a 4,3%, enquanto que a precisão interdia variou de 2,6 a 4,2%.

O fator de enriquecimento foi calculado por meio da relação entre a inclinação da curva analítica com e sem a etapa de pré-concentração, sendo este igual a 50,6. Ainda, utilizando o método MISPE, foi possível obter valores menores de LD e LQ, possibilitando a detecção de sarcosina em amostras de urina, visto que, como já abordado nesta dissertação, esta é encontrada na faixa de 0,11 a 5,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em urina de pacientes com CaP (SREEKUMAR *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2010; SHAMSIPUR; NASERI; BABRI, 2013).

A comparação do método proposto com outros métodos para a determinação de sarcosina é apresentada na Tabela 4. De acordo com os dados, o método desenvolvido neste trabalho apresenta LQ inferior aos métodos ninidrina/UV-Vis e MIP/fibra SPME/GC-FID, e superior ao MIP-MEPS/HPLC-MS/MS e FIA-ED coulometria.

No entanto, o método FIA-ED coulometria fez uso de separação cromatográfica prévia utilizando cromatografia líquida de troca iônica, além de não ter sido aplicado em amostras e não realizar estudos com possíveis interferentes (CERNEI *et al.*, 2012). No método MIP-MEPS/HPLC-MS/MS, os autores fazem uso de instrumentação analítica de alto custo para determinação de sarcosina, além disso, não realizam estudos de sorção competitiva com sarcosina e seus possíveis interferentes (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015).

Apesar dos métodos desenvolvidos por Rebelo *et al.*, 2014 e Özkütük *et al.*, 2016 não apresentarem os valores de LQ, os limites de detecção reportados são inferiores ao deste trabalho. No entanto, o método sarcosina oxidase/sensor voltamétrico faz uso de enzimas para modificação do eletrodo de trabalho, elevando o custo da análise, além da enzima utilizada pelos autores poder apresentar baixa estabilidade. Ainda, os autores avaliaram apenas creatinina e ureia como interferentes, não considerando a possível interferência de aminoácidos como glicina e alanina (REBELO *et al.*, 2014).

O método MIP/sensor potenciométrico, além de não ser aplicado em amostras, o sensor desenvolvido precisa ser condicionado por três dias em uma solução de sarcosina e agitado em formaldeído durante duas horas para remover a sarcosina ligada antes de ser utilizado, fazendo com que o método não seja adequado para uso em análises de rotina (ÖZKÜTÜK *et al.*, 2016)

Tabela 4 – Comparação do método proposto com outros métodos analíticos.

Método	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Amostra	Referência
Ninidrina/UV-Vis	1,7	6,0	0,56 – 10,0	Não aplicou	Cernei <i>et al.</i> , 2012
FIA-ED ^a / coulometria	0,11	0,38	0,07 – 561,0	Não aplicou	
MIP-MEPS ^b /HPLC-MS/MS ^c	0,01	0,03	0,03 – 112,2	Plasma e urina	Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, 2015
MIP/fibra SPME ^d /GC-FID ^e	4,1	12,4	11,2 – 1122,5	Urina	Hashemi-Moghaddam e Hagigatgoo, 2015
Sarcosina oxidase/sensor voltamétrico	0,02	N. I.	0,01 – 0,1	Urina sintética	Rebelo <i>et al.</i> , 2014
MIP/sensor potenciométrico	$1,4 \times 10^{-4}$	N. I.	0,1 – 100,0	Não aplicou	Özkütük <i>et al.</i> , 2016
MIP-AMPS-VP/FIA-ED	0,96	3,2	3,2 – 25,0	Urina sintética	Este trabalho

^aFIA-ED= análise por injeção em fluxo com detecção eletroquímica.

^bMIP-MEPS = polímero molecularmente impresso em microextração por sorvente empacotado.

^cHPLC-MS/MS = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas com duplo quadrupolo.

^dFibra SPME = fibra sintetizada de microextração em fase sólida.

^eGC-FID = cromatografia à gás com detector de ionização de chama.

N.I.

=

não

informado.

5.3.6 Avaliação de Possíveis Interferentes na Determinação de Sarcosina Utilizando o Método MISPE

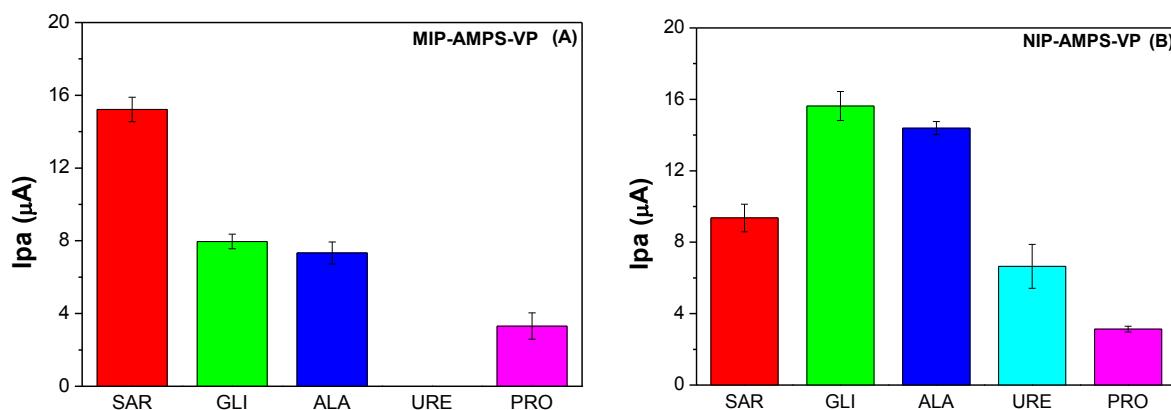
O efeito da presença dos possíveis interferentes glicina, alanina, prolina e ureia na sorção de sarcosina pelo MIP-AMPS-VP foi avaliado utilizando o método de pré-concentração desenvolvido, em que 100,0 mL de uma solução 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 5,0 de cada interferente foram percolados individualmente pelo cartucho SPE empacotado com o material impresso. A eluição foi realizada utilizando 2,0 mL da mistura MeOH:HAc (90:10, v/v) e, o eluato foi evaporado em chapa aquecedora a 50 °C, recuperado em 0,5 mL de NaOH 0,05 mol L^{-1} e analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica. Cabe salientar, que este estudo não foi realizado para creatinina e ácido úrico por estes interferentes não terem apresentado sinal de corrente utilizando o método eletroanalítico desenvolvido (Seção 5.1.13).

Na Figura 50 (A) pode ser observada a intensidade de pico anódico para sarcosina 10,0 mol L^{-1} e para cada interferente utilizando MIP-AMPS-VP como sorvente. O mesmo estudo foi realizado utilizando como sorvente o NIP-AMPS-VP (Figura 50 (B)).

Pode-se observar na Figura 50 (A) que a corrente de pico anódico para sarcosina é superior às correntes obtidas para glicina, alanina, prolina e ureia. Esse resultado pode ser explicado pela provável seletividade do MIP para sarcosina, pois mesmo o material sendo capaz de sorver os interferentes, este é mais seletivo para o analito de interesse, fato evidenciado pela maior corrente de pico obtida pelo procedimento MISPE. Ainda, pode-se observar que para ureia não foi obtido sinal de corrente. O que pode ser justificado, muito provavelmente, pelo fato de que mesmo que o MIP esteja sorvendo este interferente, a quantidade sorvida pode não ter sido eluída.

Além disso, por meio da Figura 50 (B), observa-se que o sinal de corrente para glicina e alanina no NIP-AMPS-VP foi superior ao sinal de corrente para sarcosina, sendo mais um indicativo de melhor seletividade do MIP, resultado da presença de sítios seletivos no material.

Figura 50 – Corrente de pico anódica para sarcosina $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para os interferentes glicina, alanina, prolina e ureia na concentração de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada empregando (A) MIP-AMPS-VP e (B) NIP-AMPS-VP. Foram percolados $100,0 \text{ mL}$ de cada solução e eluído com $2,0 \text{ mL}$ de MeOH:HAc (90:10, v/v).

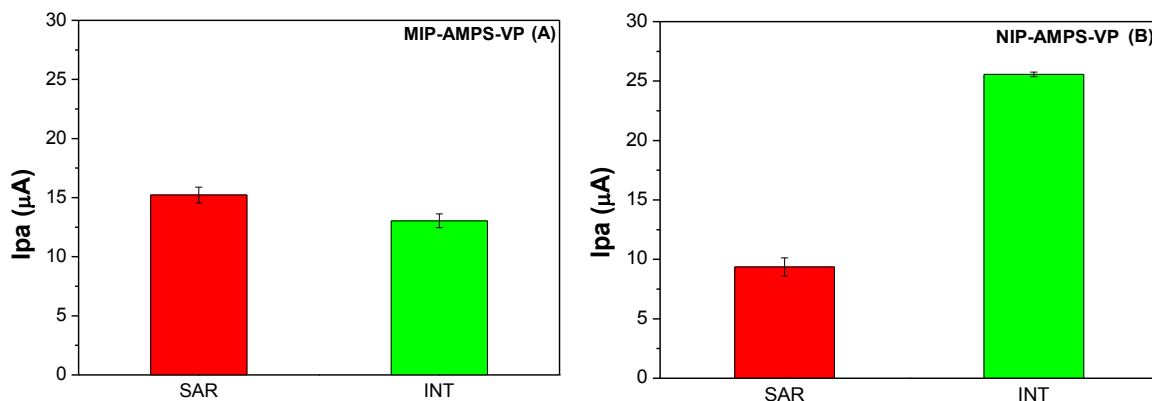


Adicionalmente, para avaliar o desempenho seletivo do MIP-AMPS-VP para sarcosina, uma solução contendo glicina, alanina, prolina e ureia foi submetida à pré-concentração e o sinal de corrente foi comparado à solução contendo apenas sarcosina. Neste estudo, inicialmente o cartucho SPE foi condicionado com $5,0 \text{ mL}$ de água ultrapura e, em seguida, foram percolados $100,0 \text{ mL}$ de uma solução contendo $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada interferente em pH 5,0, com vazão de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. A eluição foi realizada utilizando $2,0 \text{ mL}$ da mistura MeOH:HAc (90:10, v/v) à $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e, o eluato foi evaporado em chapa aquecedora a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, recuperado em $0,5 \text{ mL}$ de NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.

Na Figura 51 (A) estão apresentadas as correntes de pico anódico para sarcosina $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para a mistura dos interferentes (INT) empregando MIP-AMPS-VP como sorvente. O mesmo estudo foi realizado utilizando como sorvente o material controle (Figura 51 (B)).

A partir das Figuras 51 (A) e 51 (B), pode-se observar que o MIP apresenta menor resposta analítica para os interferentes quando comparado com o NIP, sendo um indicativo da impressão química presente no MIP para sarcosina. Além do mais, o NIP mostrou melhor resposta de corrente para os interferentes do que para sarcosina, indicando que o polímero não impresso possui menor afinidade para o analito alvo.

Figura 51 – Corrente de pico anódica para sarcosina $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para interferentes na concentração de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada empregando (A) MIP-AMPS-VP e (B) NIP-AMPS-VP. Foram percolados $100,0 \text{ mL}$ de cada solução e eluído com $2,0 \text{ mL}$ de MeOH:HAc (90:10, v/v).



5.3.7 Aplicação do Método MISPE em Amostras de Urina Sintética

A aplicabilidade do método MISPE foi realizada em amostras de urina sintética, a qual foi preparada de acordo com a Seção 4.14. O procedimento de adição e recuperação foi realizado e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Primeiramente, o cartucho SPE foi condicionado com $5,0 \text{ mL}$ de água ultrapura e, em seguida, foram percolados $100,0 \text{ mL}$ de solução de urina sintética enriquecida com sarcosina nas concentrações de $10,0$; $15,0$ e $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pH $5,0$, com vazão de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Em seguida, foram utilizados $10,0 \text{ mL}$ de água ultrapura como solvente de lavagem. A eluição foi realizada utilizando $2,0 \text{ mL}$ da mistura MeOH:HAc (90:10, v/v) à $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e, o eluato foi evaporado em chapa aquecedora a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, recuperado em $0,5 \text{ mL}$ de NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.

Como pode-se observar na Tabela 5, o método permitiu a detecção de sarcosina mesmo em uma matriz complexa como a urina, evidenciado pela recuperação satisfatória na faixa de 95-108%. Desse modo, pode-se inferir que o método proposto possibilita a detecção de sarcosina em amostras de urina sem efeito de matriz.

Tabela 5 – Porcentagem de recuperação de sarcosina em amostras de urina sintética após extração com MISPE a partir do procedimento de adição e recuperação (n = 3).

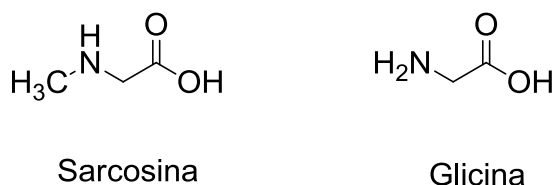
Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
0,0	ND	-
10,0	10,80 \pm 0,88	108
15,0	14,30 \pm 0,26	95
20,0	19,83 \pm 0,22	98

*ND = Não detectado.

5.3.8 Influência de Glicina na Determinação de Sarcosina Utilizando o Método MISPE

A glicina é um aminoácido presente em altas concentrações na urina, podendo interferir na detecção de sarcosina, visto que estas moléculas apresentam estruturas químicas similares, como pode ser observado na Figura 52.

Figura 52 – Estrutura química de sarcosina e glicina.



Fonte: o próprio autor.

Desse modo, o método MISPE foi aplicado em amostras de urina sintética contendo três concentrações diferentes de glicina (280,0; 1330,0 e 2990,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), na presença de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina, a fim de verificar a seletividade do método em uma amostra simulada de um paciente que apresente baixa concentração de sarcosina e alta concentração de glicina na urina.

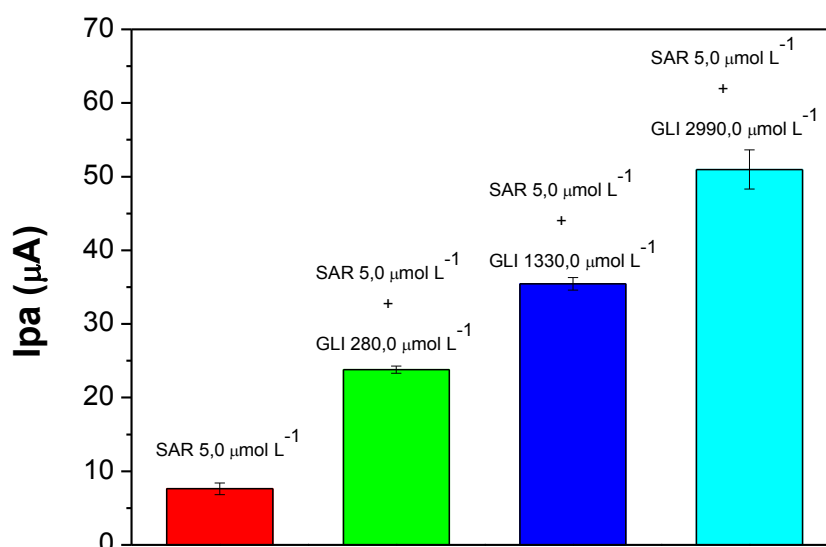
Inicialmente, o cartucho SPE foi condicionado com 5,0 mL de água ultrapura e, em seguida, foram percolados 100,0 mL de soluções de urina sintética dopadas

com sarcosina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e, com sarcosina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com concentrações elevadas de glicina ($280,0$; $1330,0$ e $2990,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em pH $5,0$, com vazão de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Por conseguinte, foram utilizados $10,0 \text{ mL}$ de água ultrapura como solvente de lavagem. A eluição foi realizada utilizando $2,0 \text{ mL}$ da mistura MeOH:HAc ($90:10$, v/v) à $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e, o eluato foi evaporado em chapa aquecedora a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, recuperado em $0,5 \text{ mL}$ de NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e analisado no sistema FIA com detecção eletroquímica.

Na Figura 53 estão apresentadas as correntes de pico anódico para sarcosina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e, glicina $280,0$; $1330,0$ e $2990,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo sarcosina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em amostras de urina sintética utilizando o método MISPE.

Pode-se observar que a resposta analítica aumenta linearmente com o aumento da concentração de glicina; no entanto, apesar do método responder para glicina, observa-se que com um aumento de 598 vezes na concentração comparado com sarcosina ($5,0$ para $2990,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), o sinal analítico aumenta apenas 6,7 vezes.

Figura 53 – Relação da corrente de pico anódico para sarcosina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e glicina $280,0$; $1330,0$ e $2990,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com sarcosina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em amostras de urina sintética utilizando o método MISPE.



De acordo com a literatura, a concentração de glicina na urina humana é cerca de $1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (GOODWIN; STAMPWALA, 1973; HARPER; RODWELL;

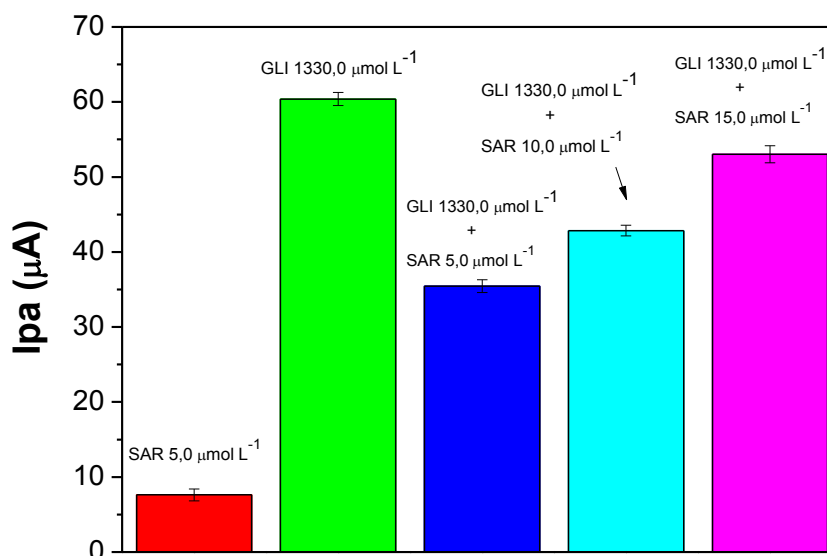
MAYES, 1977; LIN; WANG, 1980). Dessa forma, uma solução de urina sintética enriquecida com $1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicina foi submetida ao método MISPE. Ainda, esta foi enriquecida com concentrações crescentes de sarcosina ($5,0$; $10,0$ e $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Na Figura 54 estão apresentadas as correntes de pico anódico para sarcosina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, glicina $1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e, glicina $1330,0$ com $5,0$; $10,0$ e $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina.

Por meio da Figura 54, observa-se que o sinal analítico aumenta apenas 8 vezes quando há um aumento de 266 vezes na concentração ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sarcosina para $1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicina). Adicionalmente, quando uma elevada concentração de glicina ($1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) encontra-se na presença de uma baixa concentração de sarcosina ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), o sinal analítico diminui cerca de 1,7 vezes. Quando a concentração de glicina é mantida em $1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e efetua-se um aumento na concentração de sarcosina, de $5,0$ à $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, o sinal de corrente anódica aumenta linearmente. Este importante resultado revela que o MIP-AMPS-VP possui, num processo de sorção competitivo, maior afinidade à sarcosina em relação à glicina.

Esses resultados indicam que o método desenvolvido, apesar de não ser específico, é seletivo para sarcosina, dado reforçado pelo maior sinal de corrente apresentado para sarcosina quando comparado aos interferentes (Figura 50 (A)).

Figura 54 – Relação da corrente de pico anódico para sarcosina 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, glicina 1330,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; e glicina 1330,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com sarcosina 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, em amostras de urina sintética utilizando o método MISPE.

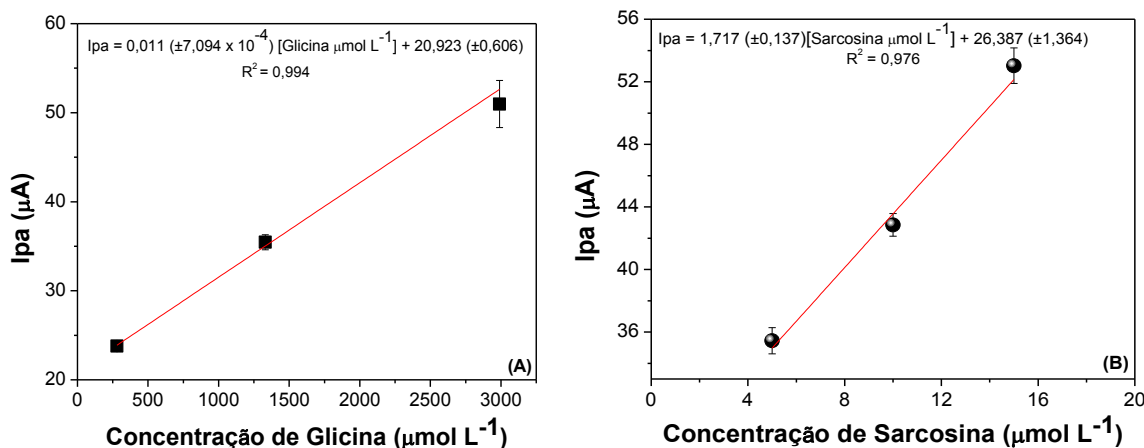


A maior afinidade do MIP para sarcosina ainda pode ser evidenciada por meio da construção de curvas analíticas (Figura 55) utilizando os dados obtidos pelas Figuras 53 e 54.

Na Figura 55 (A) é evidenciado o aumento de corrente para concentração de glicina variando de 280,0 a 2990,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tendo a concentração de sarcosina fixada em 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na Figura 55 (B) a corrente anódica é proporcional à concentração de sarcosina variando de 5,0 a 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mantendo a concentração de glicina fixada em 1330,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Comparando os coeficientes angulares das curvas, constata-se que o método desenvolvido apresenta 156 vezes maior sensibilidade à sarcosina comparado à glicina.

Figura 55 – (A) Curva analítica fixando a concentração de sarcosina ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e variando a concentração de glicina ($280,0$ a $2990,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (B) curva analítica variando a concentração de sarcosina ($5,0$ a $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e fixando a concentração de glicina ($1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de urina sintética utilizando o método MISPE.



De posse dos resultados obtidos, pode-se inferir que o método apresenta potencial analítico para avaliar a presença de sarcosina em urina mesmo na presença de glicina em elevada concentração e com isto, auxiliar no diagnóstico de câncer de próstata. Esta constatação está pautada na maior afinidade do MIP-AMPS-VP à sarcosina. Assim, considerando que a concentração basal de glicina em urina é de $1330,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, espera-se obter resposta analítica em termos de corrente de $60 \mu\text{A}$.

Porém, caso exista sarcosina na urina, na presença de elevada concentração de glicina, espera-se obter corrente duas vezes menores, sendo um indicativo de câncer de próstata e, desta maneira, requerendo que estudos como exame de toque ou biópsia sejam realizados para um diagnóstico conclusivo.

6 CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido avaliou o desempenho de um polímero molecularmente impresso denominado poli(ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico-co-vinilpiridina) (MIP-AMPS-VP) como sorvente para extração em fase sólida para pré-concentração de sarcosina empregando detecção eletroquímica (cronoamperometria) em sistema de análise por injeção em fluxo utilizando um sensor de MWCNT/Nafion[®]/Ni(OH)₂.

O sensor utilizado proporcionou a detecção eletroquímica de sarcosina com boa repetibilidade e reusabilidade de 86 injeções. Por outro lado, verificou-se a importância de desenvolver um MIP para sarcosina como sorvente em SPE, possibilitando o desenvolvimento de um método de pré-concentração e *clean-up* para detecção de sarcosina em amostras de urina empregando o sistema FIA-ED.

Por meio dos resultados da caracterização por fisissorção de gás N₂ à 77 K, o MIP sintetizado apresentou área específica menor que o material controle (NIP), sendo um indicativo do efeito de impressão química no material, dado este reforçado pela maior sorção de sarcosina no material.

Parâmetros analíticos satisfatórios para o método de pré-concentração foram obtidos, como fator de enriquecimento de 50,6 e menores limites de detecção e quantificação, compatível para a detecção de sarcosina em amostras de urina de pacientes com câncer de próstata.

O método MISPE desenvolvido pode ser aplicado em amostras de urina sintética sem efeitos de matriz. Além disso, o MIP apresentou seletividade para sarcosina na presença de altas concentrações de glicina.

É importante mencionar que devido ao fato da sarcosina apresentar caráter anfótero, a síntese de um polímero utilizando dois monômeros funcionais possibilitou maior seletividade do material à molécula molde.

No que diz respeito à reutilização do material, um único cartucho (MIP-AMPS-VP) foi utilizado por mais de 170 ciclos de pré-concentração/eluição. Ainda, o MIP sintetizado não necessita de solução para a regeneração da fase sólida, uma etapa essencial quando utiliza-se materiais convencionais de troca iônica, o que é de suma importância quando este material é empregado em cartuchos de SPE. O custo do material foi de R\$ 74,64 para a construção de um cartucho contendo 300,0 mg do

polímero, no entanto 93,77% deste valor é referente ao cartucho convencional de SPE e aos frits utilizados para o empacotamento do material no cartucho.

Por fim, conclui-se que o método MISPE desenvolvido além de apresentar baixo custo e dispensar o uso de reagentes de derivatização, apresenta potencial para avaliar a presença de sarcosina em amostras de urina de pacientes com câncer de próstata como um método de triagem e auxiliar no diagnóstico precoce da doença.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. C.; PEDROSA, N. L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. P.; CARVALHO, V. H.; CARDOSO, A. A. A. Marcadores tumorais: Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305–316, 2007.

ALPO DIAGNOSTICS – **Total prostate-specific antigen ELISA (PSA ELISA) for the quantitative determination of PSA in human serum**. Disponível em: <<https://www.alpco.com/pdfs/25/25-PSAHU-E01.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

ANDERSSON, L.; SELLERGREN, B.; MOSBACH, K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 45, p. 5211–5214, 1984.

ANIRUDHAN, T. S.; SANDEEP, S. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymer of N-maleoylchitosan-grafted-2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid and its controlled delivery and recognition of bovine serum albumin. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 9, p. 2052-2061, 2011.

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

ASTURIAS-ARRIBAS, L.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Sensitive and selective cocaine electrochemical detection using disposable sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 834, p. 30–36, 2014.

BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1–2, p. 35–44, 2001.

BAO, Y.; MA, J.; LI, N. Synthesis and swelling behaviors of sodium carboxymethyl cellulose-g-poly(AA-co-AM-co-AMPS)/MMT superabsorbent hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 76–82, 2011.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172–175, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Campinas: Unicamp, 2001.

BARTON, J.; GARCÍA, M. B. G.; SANTOS, D. H.; FANJUL-BOLADO, P.; RIBOTTI, A.; MCCAUL, M.; DIAMOND, D.; MAGNI, P. Screen-printed electrodes for environmental monitoring of heavy metal ions: A review. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 2, p. 503–517, 2016.

BEKYAROVA, E.; DAVIS, M.; BURCH, T.; ITKIS, M. E.; ZHAO, B.; SUNSHINE, S.; HADDON, R. C. Chemically functionalized single-walled carbon nanotubes as ammonia sensors. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 51, p. 19717–19720, 2004.

BELLON, G.; LUNDY, A. M.; MALGRAS, A.; BOREL, J. P. Fluorometric evaluation of sarcosine in urine and serum. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 311, p. 405–410, 1984.

BOTTOM, C. B.; HANNA, S. S.; SIEHR, D. J. Mechanism of the ninhydrin reaction. **Biochemical Education**, v. 6, n. 1, p. 4–5, 1978.

CAI, X.; LI, J.; ZHANG, Z.; WANG, G.; SONG, X.; YOU, J.; CHEN, L. Chemodosimeter-based fluorescent detection of L-cysteine after extracted by molecularly imprinted polymers. **Talanta**, v. 120, p. 297–303, 2014.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CALVETE, A. C.; SROUGI, M.; NESRALLAH, L. J.; DALL'OGGIO, M. F.; ORTIZ, V. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: Valor do PSA, da percentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 250–254, 2003.

CASARIN, J.; GONÇALVES JUNIOR, A. C.; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, C. R. T. Insight into the performance of molecularly imprinted poly(methacrylic acid) and polyvinylimidazole for extraction of imazethapyr in aqueous medium. **Chemical Engineering Journal**, v. 343, p. 583–596, 2018.

CATALDI, T. R. I.; CENTONZE, D.; RICCIARDI, G. Electrode modification with a poly(Ni^{II}-tetramethyldibenzotetraaza[14]annulene) film. Electrochemical behavior and redox catalysis in alkaline solutions. I. **Electroanalysis**, v. 7, n. 4, p. 312–318, 1995.

CATARINO, R. I.; CONCEIÇÃO, A. C.; GARCIA, M. B. Q.; GONÇALVES, M. L.; LIMA, J. L. F.; CORREIA DOS SANTOS, M. Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 4, p. 571–580, 2003.

CAVALIERE, B.; MACCHIONE, B.; MONTELEONE, M.; NACCARATO, A.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: A rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction–gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 9, p. 2903–2912, 2011.

ÇAVUŞ, S.; GÜRDAĞ, G. Competitive heavy metal removal by poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid-co-itaconic acid). **Polymers for Advanced Technologies**, v. 19, n. 9, p. 1209–1217, 2008.

CERNEI, N.; HEGER, Z.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; BABULA, P.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; KIZEK, R.; ADAM, V. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker—A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13893–13908, 2013.

CERNEI, N.; ZITKA, O.; RYVOLOVA, M.; ADAM, V.; MASARIK, M.; HUBALEK, J.; KIZEK, R. Spectrometric and electrochemical analysis of sarcosine as a potential prostate carcinoma marker. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 7, p. 4286–4301, 2012.

CHEMICALIZE. Disponível em: <<https://chemicalize.com/>>. Acesso em: 15 set. 2018.

CHEN, L.; WANG, X.; LU, W.; WU, X.; LI, J. Molecular imprinting: Perspectives and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 8, p. 2137–2211, 2016.

CHEN, L.; XU, S.; LI, J. Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2922-2942, 2011.

CISZEWSKI, A.; MILCZAREK, G.; LEWANDOWSKA, B.; KRUTOWSKI, K. Electrocatalytic properties of electropolymerized Ni(II)curcumin complex. **Electroanalysis**, v. 15, n. 5–6, p. 518–523, 2003.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1980.

CORAZZA, M. Z. **Preparo de fases sorventes baseadas em nanotubos de carbono modificados e matrizes poliméricas: Aplicação em estudos de pré-concentração/especificação de íons metálicos**. 2014. Tese (doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CORMACK, P. A.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, v. 804, n. 1, p. 173–182, 2004.

COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; QUINAZ, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, v. 146, p. 801–814, 2016.

DAMIÃO, R.; FIGUEIREDO, R. T.; DORNAS, M. C.; LIMA, D. S.; KOSCHORKE, M. A. B. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, p. 80–86, 2015.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

DEO, R. P.; LAWRENCE, N. S.; WANG, J. Electrochemical detection of amino acids at carbon nanotube and nickel–carbon nanotube modified electrodes. **The Analyst**, v. 129, n. 11, p. 1076–1081, 2004.

DICKEY, F. H. The preparation of specific adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 35, n. 5, p. 227–229, 1949.

DILTEMIZ, S. E.; USLU, O. A reflectometric interferometric nanosensor for sarcosine. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 1, p. 55–61, 2015.

ERKARTAL, M.; USTA, H.; CITIR, M.; SEN, U. Proton conducting poly(vinyl alcohol) (PVA)/poly(2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) (PAMPS)/zeolitic imidazolate framework (ZIF) ternary composite membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 499, p. 156–163, 2016.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: Uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361–375, 2008.

FUNG, Y. S.; MO, S. Y. Determination of amino acids and proteins by dual-electrode detection in a flow system. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 1121–1124, 1995.

GERRITSEN, T.; WAISMAN, H. A. Hypersarcosinemia. **New England Journal of Medicine**, v. 275, n. 2, p. 66–69, 1966.

GOODWIN, J. F.; STAMPWALA, S. Spectrophotometric quantification of glycine in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1010–1015, 1973.

GREESH, N.; HARTMANN, P.; CLOETE, V.; SANDERSON, R. D. Adsorption of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS) and related compounds onto montmorillonite clay. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, n. 1, p. 2–11, 2008.

GROCHOWICZ, M. Investigation of the thermal behavior of 4-vinylpyridine–trimethylolpropane trimethacrylate copolymeric microspheres. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 118, n. 3, p. 1603–1611, 2014.

HAGINAKA, J.; TABO, H.; MATSUNAGA, H. Preparation of molecularly imprinted polymers for organophosphates and their application to the recognition of organophosphorus compounds and phosphopeptides. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 1–8, 2012.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Review of Physiological Chemistry**. 16^a ed. CA: Los Altos, 1977.

HASHEMI-MOGHADDAM, H.; HAGIGATGOO, M. Nonderivatized sarcosine analysis by gas chromatography after solid-phase microextraction by newly synthesized monolithic molecularly imprinted polymer. **Chromatographia**, v. 78, n. 19–20, p. 1263–1270, 2015.

HASHEMI-MOGHADDAM, H.; RAHIMIAN, M.; NIROMAND, B. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of sarcosine as prostate cancer biomarker from human urine. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 8, p. 2330–2334, 2013.

HASHEMI-MOGHADDAM, H.; TOOSI, M.; TOOSI, M. Synthesis and comparison of new layer-coated silica nanoparticles and bulky molecularly imprinted polymers for the solid-phase extraction of glycine. **Analytical Methods**, v. 7, n. 18, p. 7488–7495, 2015.

HIRATSUKA, Y.; FUNAYA, N.; MATSUNAGA, H.; HAGINAKA, J. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for bisphenol A and its analogues and their application to the assay of bisphenol A in river water. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 75, p. 180–185, 2013.

HUANG, Y. C.; LEE, C. M.; CHEN, M.; CHUNG, M. Y.; CHANG, Y. H.; HUANG, W. J. S.; HO, D. M. T.; PAN, C. C.; WU, T. T.; YANG, S.; LIN, M. W.; HSIEH, J. T.; CHEN, Y. M. A. Haplotypes, loss of heterozygosity, and expression levels of glycine N-methyltransferase in prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 5, p. 1412–20, 2007.

IANNI, M.; PORCELLINI, E.; CARBONE, I.; POTENZONI, M.; PIERI, A. M.; PASTIZZARO, C. D.; BENECCHI, L.; LICASTRO, F. Genetic factors regulating inflammation and DNA methylation associated with prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 16, n. 1, p. 56–61, 2013.

INAM, F.; YAN, H.; REECE, M. J.; PEIJS, T. Dimethylformamide: an effective dispersant for making ceramic–carbon nanotube composites. **Nanotechnology**, v. 19, n. 19, p. 195710, 2008.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 9 jul. 2018.

JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; CAMPANA-FILHO, S. P.; FARIA, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Anodic stripping voltammetric determination of copper(II) using a functionalized carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 142, n. 1, p. 260–266, 2009.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JENTZMIK, F.; STEPHAN, C.; MILLER, K.; SCHRADER, M.; ERBERSDOBLER, A.; KRISTIANSEN, G.; LEIN, M.; JUNG, K. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours. **European Urology**, v. 58, n. 1, p. 12–18, 2010.

JIANG, T.; ZHAO, L.; CHU, B.; FENG, Q.; YAN, W.; LIN, J.M. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 β -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 442–447, 2009.

JIANG, Y.; CHENG, X.; WANG, C.; MA, Y. Quantitative determination of sarcosine and related compounds in urinary samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 21, p. 9022–9027, 2010.

JIANG, Z.; ZHENG, X.; WU, H.; WANG, J. Proton conducting CS/P(AA-AMPS) membrane with reduced methanol permeability for DMFCs. **Journal of Power Sources**, v. 180, n. 1, p. 143–153, 2008.

KEMPE, M. Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 11, p. 1948–1953, 1996.

KEMPE, M.; MOSBACH, K. Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 691, n. 1–2, p. 317–323, 1995.

KHAN, H.; KHAN, T.; PARK, J. K. Separation of phenylalanine racemates using d-phenylalanine imprinted microbeads as HPLC stationary phase. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 2, p. 363–369, 2008.

KIM, B.; SIGMUND, W. M. Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites. **Langmuir**, v. 20, n. 19, p. 8239–8242, 2004.

LEE, C. M.; SHIH, Y. P.; WU, C. H.; CHEN, Y. M. A. Characterization of the 5' regulatory region of the human glycine N-methyltransferase gene. **Gene**, v. 443, n. 1–2, p. 151–157, 2009.

LEE, S. K.; CHOI, M. G.; CHOI, J.; CHANG, S.K. Fluorescence signaling of Zn²⁺ levels in synthetic urine by dipicolylamine-armed hydroxynaphthalimide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 303–307, 2015.

LEOFANTI, G.; PADOVAN, M.; TOZZOLA, G.; VENTURELLI, B. Surface area and pore texture of catalysts. **Catalysis Today**, v. 41, n. 1–3, p. 207–219, 1998.

LI, M.; LI, Y. T.; LI, D. W.; LONG, Y. T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 734, p. 31–44, 2012.

LIMPARYOON, N.; SEETAPAN, N.; KIATKAMJORNWONG, S. Acrylamide/2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid and associated sodium salt superabsorbent copolymer nanocomposites with mica as fire retardants. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 6, p. 1054–1063, 2011.

LIN, J. K.; WANG, C. H. Determination of urinary amino acids by liquid chromatography with "Dabsyl Chloride". **Clinical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 579-583, 1980.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, 1983.

LUCCI, P.; DERRIEN, D.; ALIX, F.; PÉROLLIER, C.; BAYOUDH, S. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, n. 1–2, p. 15–19, 2010.

LUQUE, G. L.; FERREYRA, N. F.; RIVAS, G. A. Electrochemical sensor for amino acids and albumin based on composites containing carbon nanotubes and copper microparticles. **Talanta**, v. 71, p. 1282–1287, 2007.

MAJID, S.; JABBARI, A.; HELI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a nickel–curcumin complex modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 4622–4629, 2007.

MEYER, T. E.; FOX, S. D.; ISSAQ, H. J.; XU, X.; CHU, L. W.; VEENSTRA, T. D.; HSING, A. W. A reproducible and high-throughput HPLC/MS method to separate sarcosine from α and β -alanine and to quantify sarcosine in human serum and urine. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 14, p. 5735–5740, 2011.

MOEIN, M. M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. On-line determination of sarcosine in biological fluids utilizing dummy molecularly imprinted polymers in microextraction by packed sorbent. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 5, p. 788–795, 2015.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 192, p. 663–681, 1951.

MORTENSEN, P. B.; KPLVRAA, S.; CHRISTENSEN, E. Inhibition of the glycine cleavage system: hyperglycinemia and hyperglycinuria caused by valproic acid. **Epilepsia**, v. 21, n. 6, p. 563–569, 1980.

NARDINI, M.; GNESUTTA, N.; DONATI, G.; GATTA, R.; FORNI, C.; FOSSATI, A.; VONRHEIN, C.; MORAS, D.; ROMIER, C.; BOLOGNESI, M.; MANTOVANI, R. Sequence-Specific Transcription Factor NF-Y Displays Histone-like DNA Binding and H2B-like Ubiquitination. **Cell**, v. 152, n. 1–2, p. 132–143, 2013.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614–629, 1998.

NGUY, T. P.; VAN PHI, T.; TRAM, D. T. N.; EERSELS, K.; WAGNER, P.; LIEN, T. T. N. Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 246, p. 461–470, 2017.

O'SHANNESY, D. J.; EKBERG, B.; ANDERSSON, L. I.; MOSBACH, K. Recent advances in the preparation and use of molecularly imprinted polymers for enantiomeric resolution of amino acid derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 470, n. 2, p. 391–399, 1989.

OLIVEIRA, P. R. de. **Construção e avaliação de eletrodos modificados com hexacianoferrato de prata para a determinação amperométrica de isoniazida**. 2012. Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ÖZKÜTÜK, E. B.; DILTEMİZ, S. E.; AVCI, Ş.; UĞURAĞ, D.; AYKANAT, R. B.; ERSÖZ, A.; SAY, R. Potentiometric sensor fabrication having 2D sarcosine memories and analytical features. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 231–235, 2016.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PARKS, G. A. The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems. **Chemical Reviews**, v. 65, n. 2, p. 177–198, 1965.

PAULING, L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p. 2643–2657, 1940.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure determination of organic compounds : Tables of spectral data**. Zürich: Springer, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

REBELO, T. S. C. R.; PEREIRA, C. M.; SALES, M. G. F.; NORONHA, J. P.; COSTA-RODRIGUES, J.; SILVA, F.; FERNANDES, M. H. Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 26–32, 2014.

REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: Vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51–58, 1996.

RENEDO, O. D.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; MARTÍNEZ, M. J. A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 202–219, 2007.

RENKECZ, T.; MISTLBERGER, G.; PAWLAK, M.; HORVÁTH, V.; BAKKER, E. Molecularly imprinted polymer microspheres containing photoswitchable spiropyran-based binding sites. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 17, p. 8537–8545, 2013.

RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, A. P. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30^a ed. Chicago: MC Grow Hill, 2009.

ŘUŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145–157, 1975.

SHAMSIPUR, M.; NASERI, M. T.; BABRI, M. Quantification of candidate prostate cancer metabolite biomarkers in urine using dispersive derivatization liquid–liquid microextraction followed by gas and liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 81–82, p. 65–75, 2013.

SILVA, V. P. A. da; ALVES, C. R.; DUTRA, R. F.; OLIVEIRA, J. E. de; RONDINA, D.; FURTADO, R. F. Biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, p. 143–157, 2011.

SONG, R.; HU, X.; GUAN, P.; LI, J.; ZHAO, N.; WANG, Q. Molecularly imprinted solid-phase extraction of glutathione from urine samples. **Materials Science and Engineering: C**, v. 44, p. 69–75, 2014.

SONG, Y. H.; SHIOTA, M.; KUROIWA, K.; NAITO, S.; ODA, Y. The important role of glycine N-methyltransferase in the carcinogenesis and progression of prostate cancer. **Modern Pathology**, v. 24, n. 9, p. 1272–1280, 2011.

SOUZA, M. de F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: Uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191–195, 1997.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1190–1206, 1958.

SREEKUMAR, A.; POISSON, L. M.; RAJENDIRAN, T. M.; KHAN, A. P.; CAO, Q.; YU, J.; LAXMAN, B.; MEHRA, R.; LONIGRO, R. J.; LI, Y.; NYATI, M. K.; AHSAN, A.; KALYANA-SUNDARAM, S.; HAN, B.; CAO, X.; BYUN, J.; OMENN, G. S.; GHOSH, D.; PENNATHUR, S.; ALEXANDER, D. C.; BERGER, A.; SHUSTER, J. R.; WEI, J. T.; VARAMBALLY, S.; BEECHER, C.; CHINNAIYAN, A. M. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 910–914, 2009.

SROUGI, M.; RIBEIRO, L. A.; PIOVESAN, A. C.; COLOMBO, J. R.; NESRALLAH, A. Doenças da próstata. **Revista Medicina**, v. 87, n. 3, p. 166–77, 2008.

STABLER, S.; KOYAMA, T.; ZHAO, Z.; MARTINEZ-FERRER, M.; ALLEN, R. H.; LUKA, Z.; LOUKACHEVITCH, L. V.; CLARK, P. E.; WAGNER, C.; BHOWMICK, N. A. Serum methionine metabolites are risk factors for metastatic prostate cancer progression. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. e22486, 2011.

STEFANO, J. S.; CORDEIRO, D. S.; MARRA, M. C.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Batch-injection versus flow-injection analysis using screen-printed electrodes: determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations. **Electroanalysis**, v. 28, n. 2, p. 350–357, 2016.

TAHBOUB, Y. R.; PARDUE, H. L. A predictive-kinetic method for the quantitation of amino acids with ninhydrin. **Analytica Chimica Acta**, v. 173, p. 23–32, 1985.

TARLEY, C. R. T.; BASAGLIA, A. M.; SEGATELLI, M. G.; PRETE, M. C.; SUQUILA, F. A. C.; DE OLIVEIRA, L. L. G. Preparation and application of nanocomposite based on imprinted poly(methacrylic acid)-PAN/MWCNT as a new electrochemical selective sensing platform of Pb^{2+} in water samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 801, p. 114–121, 2017.

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

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: Aplicações de MIP no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087–1101, 2005b.

THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A. V.; OLIVIER, J. P.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. W. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.

TOFANI, A. C. A. .; VAZ, C. E. Câncer de próstata, sentimento de impotência e fracassos ante os cartões IV e VI do Rorschach. **Revista Interamericana de Psicologia**, v. 41, n. 2, p. 197–204, 2007.

TORRESI, S. I. C.; PROVAZI, K.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Effect of additives in the stabilization of the α phase of $Ni(OH)_2$ electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 148, n. 10, p. A1179-A1184, 2001.

VAN BENSCHOTEN, J. J.; LEWIS, J. Y.; HEINEMAN, W. R.; ROSTON, D. A.; KISSINGER, P. T. Cyclic voltammetry experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 772, 1983.

VIDOTTI, M.; SILVA, M. R.; SALVADOR, R. P.; TORRESI, S. I. C.; DALL'ANTONIA, L. H. Electrocatalytic oxidation of urea by nanostructured nickel/cobalt hydroxide electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 11, p. 4030–4034, 2008.

VIDOTTI, M.; TORRESI, S. I. C.; KUBOTA, L. T. Electrochemical oxidation of glycine by doped nickel hydroxide modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 135, n. 1, p. 245–249, 2008.

VIDOTTI, M.; TORRESI, R.; TORRESI, S. I. C. Eletrodos modificados por hidróxido de níquel: Um estudo de revisão sobre suas propriedades estruturais e eletroquímicas visando suas aplicações em eletrocatalise, eletrocromismo e baterias secundárias. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2176–2186, 2010.

WAISMAN, H. A. .; GERRITSEN, T. Hypersarcosinemia. **American Journal of Diseases of Children**, v. 113, n. 1, p. 134, 1967.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.

WANG, X.; MAO, H.; HUANG, W.; GUAN, W.; ZOU, X.; PAN, J.; YAN, Y. Preparation of magnetic imprinted polymer particles via microwave heating initiated polymerization for selective enrichment of 2-amino-4-nitrophenol from aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 178, p. 85–92, 2011.

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

XU, Z.; FANG, G.; WANG, S. Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 845–850, 2010.

XUE, Z.; WANG, H.; RAO, H.; HE, N.; WANG, X.; LIU, X.; LU, X. Amperometric indicator displacement assay for biomarker monitoring: Indirectly sensing strategy for electrochemically inactive sarcosine. **Talanta**, v. 167, p. 666–671, 2017.

YAN, H.; ROW, K. H. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, n. 5, p. 155–178, 2006.

YU, S.; NG, F. L.; MA, K. C. C.; MON, A. A.; NG, F. L.; NG, Y. Y. Effect of porogenic solvent on the porous properties of polymer monoliths. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 4, p. 2641–2647, 2013.

ZAGATTO, E. A. .; REIS, B. F.; OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; ARRUDA, M. A. Z. Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, n. 1–3, p. 249–256, 1999.

ZDRAVKOV, B.; ČERMÁK, J.; ŠEFARA, M.; JANKŮ, J. Pore classification in the characterization of porous materials: A perspective. **Open Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 385–395, 2007.

ZEN, J. M.; HSU, C. T.; KUMAR, A. S.; LYUU, H. J.; LIN, K. Y. Amino acid analysis using disposable copper nanoparticle plated electrodes. **The Analyst**, v. 129, p. 841–845, 2004.

ZHANG, L.; CHENG, G.; FU, C.; LIU, X.; PANG, X. Adsorption and regeneration properties of tyrosine-imprinted polymeric beads. **Adsorption Science & Technology**, v. 21, n. 8, p. 775–785, 2003.

ZHENG, L.; SONG, J.F. Nickel(II)–baicalein complex modified multiwall carbon nanotube paste electrode and its electrocatalytic oxidation toward glycine. **Analytical Biochemistry**, v. 391, n. 1, p. 56–63, 2009.

ZHU, F.; WANG, J.; ZHU, L.; TAN, L.; FENG, G.; LIU, S.; DAI, Y.; WANG, H. Preparation of molecularly imprinted polymers using theanine as dummy template and its application as SPE sorbent for the determination of eighteen amino acids in tobacco. **Talanta**, v. 150, p. 388–398, 2016.

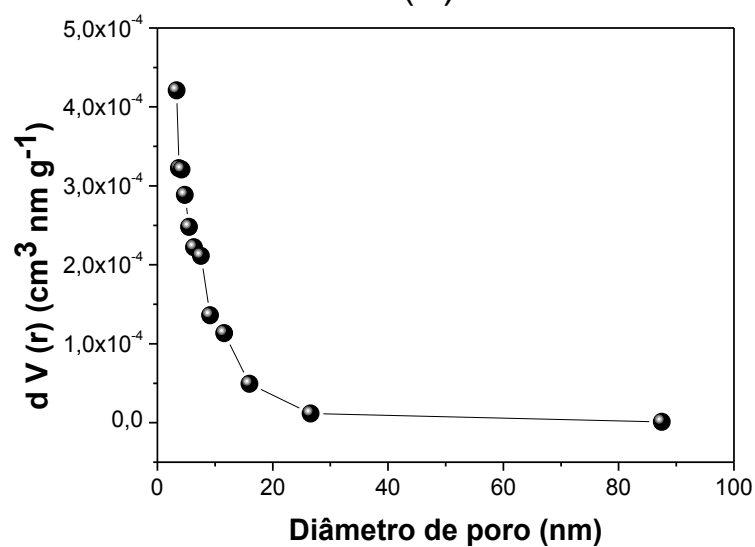
ZIARRUSTA, H.; MIJANGOS, L.; PRIETO, A.; ETXEBARRIA, N.; ZULOAGA, O.; OLIVARES, M. Determination of tricyclic antidepressants in biota tissue and environmental waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 4, p. 1205–1216, 2016.

ANEXO

ANEXO A

Distribuição de poros

Tamanho de poro para (A) SAR-AMPS-VP, (B) MIP-AMPS-VP e (C) NIP-AMPS-VP.

(A)**(B)**