



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÉBORA NOBILE CLAUSEN

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS E
MATERIAIS ADSORVENTES BASEADOS EM SISTEMAS
BIOMIMÉTICOS E NANOESTRUTURADOS PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE
FARMACÊUTICO E ALIMENTÍCIO**

Londrina
2014

DÉBORA NOBILE CLAUSEN

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS E
MATERIAIS ADSORVENTES BASEADOS EM SISTEMAS
BIOMIMÉTICOS E NANOESTRUTURADOS PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE
FARMACÊUTICO E ALIMENTÍCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Dr. César Ricardo Teixeira Tarley.

Londrina
2014

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

Clausen, Débora Nobile.

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS E MATERIAIS ADSORVENTES BASEADOS EM SISTEMAS BIOMIMÉTICOS E NANOESTRUTURADOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO E ALIMENTÍCIO / Débora Nobile Clausen. - Londrina, 2014.
217 f.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

Inclui bibliografia.

1. NANOTUBOS DE CARBONO - Teses. 2. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS - Teses. I. Teixeira Tarley, César Ricardo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

DÉBORA NOBILE CLAUSEN

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS E
MATERIAIS ADSORVENTES BASEADOS EM SISTEMAS
BIOMIMÉTICOS E NANOESTRUTURADOS PARA DETERMINAÇÃO
DE COMPOSTOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO E ALIMENTÍCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Cláudio Celestino Oliveira
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dra. Christiana Andrade Pessoa
Universidade Estadual de Ponta Grossa -
UEPG

Prof. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori Braz
UEL – Londrina – PR

Londrina, 24 de de setembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por todas minhas conquistas e por Ele ter colocado meu marido Guilherme em minha vida e nos abençoado com dois filhos queridos e amados Lucas e Livia. Agradeço por esta família me ensinar a ser uma pessoa melhor, pela força dada durante estes mais de 3 anos de trabalho e pela paciência. Gostaria de pedir desculpas aos meus filhos pela ausência, pela falta de paciência em alguns momentos, mas quando crescerem entenderão que todo este sacrifício foi para o nosso bem.

Agradeço de forma especial aos meus pais, Waldemar e Maria Diva, pelo apoio e incentivo constante ao longo da minha vida, e que não mediram esforços para eu chegar ao Doutorado. Agradeço em especial às grandes mulheres presentes em minha vida, minha mãe, minha sogra e minha funcionária que sempre se prontificaram e não mediram esforços em cuidar dos meus filhos em todos os momentos que precisei me ausentar para execução deste trabalho.

Agradeço ao Prof. César Ricardo Teixeira Tarley pela oportunidade de fazer o doutorado na Universidade Estadual de Londrina, por compartilhar sua experiência e conhecimento, contribuindo para a minha formação acadêmica e pelo seu comprometimento e paciência durante toda a orientação.

Agradeço a todos os companheiros de grupo, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização e finalização deste trabalho. Agradeço à amizade do Eduardo, da Kristiany, da Marcela e da Raquel que estavam comigo em qualquer circunstância. Em especial agradeço o Eduardo pelo companheirismo principalmente do primeiro capítulo desta tese e por toda sua habilidade com a pasta de nanotubo de carbono. Ao Igor, que mesmo por um tempo curto, me acompanhou e me ajudou muito nos experimentos do segundo capítulo.

Agradeço à Marcia e à Dalva pelo auxílio no laboratório neste segundo capítulo.

Enfim, agradeço imensamente a todas as pessoas amigas que me incentivaram e acima de tudo me deixaram uma lição de vida.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

CLAUSEN, Débora Nobile. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e método de extração para determinação de compostos de interesse farmacêutico e alimentício empregando nanotubo de carbono e polímeros molecularmente impressos.** 2014. 217 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

No presente trabalho, foram desenvolvidos dois métodos para determinação de compostos de interesse farmacêutico e alimentício. Um método foi baseado em nanotubo de carbono multi-parede modificado com hemina para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos e o segundo método baseado na utilização de polímeros molecularmente impressos para métodos de extração. No capítulo 1, foi avaliado o desempenho do sensor de nanotubo de carbono multi-parede (MWCNT) modificado com hemina para determinação voltamétrica de hidroquinona e peróxido de hidrogênio em formulações farmacêuticas. O método desenvolvido foi aplicado à determinação de hidroquinona e forneceu os seguintes parâmetros analíticos: faixa linear de $2,5 - 120,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0,996$) e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de $0,78 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,60 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Em relação ao método para peróxido de hidrogênio, os parâmetros foram: faixa linear de $0,2 - 1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ($r = 0,999$) e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $41,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A exatidão do método proposto no capítulo 1 foi confirmada por meio das técnicas de referência de cromatografia (HPLC) para hidroquinona e volumetria de oxidação-redução para peróxido de hidrogênio. No capítulo 2, foram desenvolvidos polímeros híbridos de poli(ácido metacrílico)/sílica em duas razões molares diferentes de ácido metacrílico/sílica 6:1 e 1:5 e explorou-se suas viabilidades como adsorventes em extração em fase sólida na determinação de colesterol em alimento por HPLC. Os materiais foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, análise térmica e medidas de sorção/dessorção com nitrogênio. Como estudo complementar de caracterização, isotermas de adsorção foram construídas e os dados de adsorção de colesterol nos polímeros híbridos mostraram bom ajuste ao modelo de Langmuir-Freundlich para dois sítios. Os dados de cinética de adsorção foram descritos pelo modelo de pseudo-segunda ordem para ambos os polímeros. Os dados de seletividade mostraram que somente o polímero híbrido na proporção molar de ácido metacrílico/sílica 6:1 apresentou impressão quando comparado ao seu material controle (polímero sem impressão molecular). Dessa forma, para os estudos analíticos e aplicação em amostras de leite foi utilizado o polímero híbrido impresso na razão molar 6:1. A faixa linear para colesterol usando este polímero foi de $25,0 - 250,0 \text{ mg L}^{-1}$, ($r = 0,997$) e o LOD e LOQ encontrados foram de $1,21 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,75 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A exatidão do método foi confirmada por testes de adição e recuperação no capítulo 2.

Palavras-chave: Nanotubo de carbono. Sensores voltamétricos. Polímeros molecularmente impressos. Métodos de extração.

CLAUSEN, Débora Nobile. **Development of electrochemical sensors and extraction method for determination of compounds of pharmaceutical and food interest employing carbon nanotube and molecularly imprinted polymers.** 2014. 217 p. Thesis (Doctoral degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

In this study, multi-wall carbon nanotube modified with hemin and molecularly imprinted polymers have been employed in the development of electrochemical sensors and extraction method, respectively, for the determination of compounds of pharmaceutical and food interest. In Chapter 1, we have evaluated the performance of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) sensor modified with hemin for voltammetric determination of hydroquinone and hydrogen peroxide in pharmaceutical formulations. The developed method was applied to hydroquinone determination and furnished the following analytical parameters: linear range 2.5 to 120.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r=0.996$) and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were obtained 0.78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 2.60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Regarding hydrogen peroxide method the parameters were: linear range from 0.2 to 1.4 mmol L^{-1} ($r=0.999$) and detection limits (LOD) and quantification (LOQ) of 12.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 41.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The accuracy of the proposed method in Chapter 1 was confirmed by the reference techniques chromatography (HPLC) for hydroquinone and volumetric oxidation-reduction to hydrogen peroxide. In Chapter 2, hybrid polymers of poly(methacrylic acid)/silica were developed in two different molar ratios of methacrylic acid/silica 6:1 and 1:5 and its feasibility was explored as adsorbents in solid phase extraction for the determination of cholesterol in food by HPLC. The materials were characterized by infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, energy dispersive spectroscopy, thermal analysis and measurements of sorption/desorption with nitrogen. As a complementary study of characterization, adsorption isotherms were constructed and the data of adsorption of cholesterol in poly(methacrylic acid)/silica showed good fit to the Langmuir-Freundlich for two sites model for both polymers. The adsorption kinetics data were described by the pseudo-second-order model for both polymers. The selectivity data showed that only the hybrid polymer in a molar ratio of methacrylic acid/silica 6:1 presented imprinting effect when compared to its control material (non imprinted polymer). For the analytical studies and application in milk samples the imprinted hybrid polymer at 6:1 molar ratio was used. The linear range for cholesterol using this polymer was 25.0 - 250.0 mg L^{-1} ($r=0.996$) and LOD and LOQ were 1.21 mg L^{-1} and 3.75 mg L^{-1} , respectively. The accuracy of the proposed method was confirmed by the addition and recovery tests in Chapter 2.

Keywords: Carbon nanotube. Molecularly Imprinted polymers. Voltammetric sensors. Extraction methods.

LISTA DE ABREVIATURAS

CNT	Nanotubos de carbono
MIP	Polímero Molecularmente Impresso (do inglês, Molecularly Imprinted Polymer)
NIP	Polímero não impresso (NIP, do inglês Non Imprinted Polymer)
SWCNT	nanotubos de carbono de parede simples (do inglês single-walled carbon nanotubes)
MWCNT	Nanotubos de carbono multicamadas (do inglês, multi-walled carbon nanotubes)
CV	Carbono Vítreo
β -CD	β -ciclodextrina
DMF	Dimetilformamida
CTAB	Brometo de cetiltrimetil amônio
EBNH	2,2'-[1,2-etanodilbis(nitriloetilidina)]-bis-hidroquinona
GOx	Enzima glucose oxidase
BMIMPF ₆	1-butil-3-metilimidazol hexafluorofosfato
ELL	Extração Líquido-Líquido
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, Solid Phase Extraction)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, dispersive liquid-liquid microextraction)
C ₁₈	Sílicas quimicamente ligadas a grupos octadecilssilano
C ₈	Sílicas quimicamente ligadas a grupos octissilano
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato
AIBN	2, 2'- azo-iso-butilnitrila
MAA	Ácido metacrílico
MISPE	MIP como sorventes para SPE (do inglês, Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography)
TRIM	Trimetilpropano trimetacrilato
DMAAm	Dimetilacrilamida
MBAAm	N,N-metileno(bis)acrilamida

TEOS	Tetraetoxissilano
HQ	Hidroquinona
FDA	Food Drug Administration
OTC	Over the counter
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
DPR	Desvio padrão relativo
GS	Folha de grafeno (do inglês, Grapheno Sheet)
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
CHO	Colesterol
AVC	Acidente vascular cerebral
NCEP	National Cholesterol Education Program
VRD	Valores Diários de Referência
CG	Cromatografia gasosa
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, Fourier Transform Infrared)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
BET	Brunauer, Emmett, Teller
BJH	Barret, Joyner, Halenda
TG	Análise termogravimétrica
KH 570	3 - metacrilato propil trimetoxissilano
DMSO	dimetilsulfóxido
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
DTG	Derivada termogravimétrica
PMAA-SiO ₂	Poli(ácido metacrílico)/sílica
CMA	Capacidade máxima adsortiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação ilustrando uma folha de grafite (a) responsável pela formação de um nanotubo de carbono (b)	36
Figura 2.	Representação esquemática das duas formas de CNT: (a) SWCNT e (b) MWCNT	37
Figura 3.	Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida, operada no modo isolamento do analito. Etapas: 1. Ativação e condicionamento do adsorvente; 2. Adição da amostra; 3. Remoção dos interferentes; 4. Dessorção dos analitos	59
Figura 4.	Representação esquemática do processo de formação dos MIP	63
Figura 5.	Estrutura química do iniciador radicalar 2,2' – azo-bis-isobutironitrila (AIBN)	70
Figura 6.	Síntese de um polímero para colesterol usando ligação covalente durante a impressão e ligação não covalente durante a adsorção	77
Figura 7.	Desenho esquemático para a superfície do polímero molecularmente impresso com nanopartículas superparamagnéticas de Fe ₃ O ₄	79
Figura 8.	Síntese de um polímero híbrido orgânico-inorgânico impresso através de monômero orgânico e alcoxido metálico	84
Figura 1.1.	Célula eletroquímica utilizada nos experimentos de voltametria cíclica, voltametria linear, de onda quadrada e cronoamperometria	115
Figura 1.2.	Eletrodo modificado com CNT/hemina/ Nujol®	117
Figura 1.3.	Voltamogramas cíclicos de HQ usando eletrodo de (a) CNT/Nujol®, (b) CV e (c) CNT/hemina/Nujol® (20:10:70) na ausência e presença de HQ. [Tris-HCl] = 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), [HQ] = 200 µmol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹ (3° ciclo)	121
Figura 1.4.	(a) Dependência do pH (a) com I _{pa} (µA) e (b) com E _{pa} (V) da HQ. [HQ] = 200 µmol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹	124
Figura 1.5.	Mecanismo eletroquímico de oxidação da HQ	125

Figura 1.6. (a) Voltamogramas cíclicos de corrente anódica (μA) e catódica (μA) de HQ vs potencial (V) em diferentes velocidades de varredura. (b) Variação I_{pa} (μA) de HQ versus $v^{1/2}$ (mV s^{-1}) ^{1/2} ($r = 0,997$).....	126
Figura 1.7. Voltamogramas cíclicos do tampão Tris-HCl = 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 7,0) na ausência e presença de H ₂ O ₂ (a) usando eletrodo CNT/hemina/Nujol® e (b) eletrodo CNT/Nujol®. 50 mV s ⁻¹ (3° ciclo).....	128
Figura 1.8. (a) Voltamogramas cíclicos com concentrações crescentes de HQ (0,2 mmol L ⁻¹ a 1,2 mmol L ⁻¹) na presença de 0,8 mmol L ⁻¹ H ₂ O ₂ usando o eletrodo de CNT/hemina/Nujol®. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . [Tris-HCl] = 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 7,0). (b) Curvas analíticas obtidas de cronoamperogramas de HQ na presença e ausência de H ₂ O ₂ . [HQ] = 2,0 a 5 mmol L ⁻¹ , [Tris-HCl] = 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0), [H ₂ O ₂] = 0,6 mmol L ⁻¹ , potencial fixo em -0,05 V'	130
Figura 1.9. Voltamogramas cíclicos para o tampão (I) e HQ a 1,0 mmol L ⁻¹ (II) com crescentes níveis (III a VII) de H ₂ O ₂ (0,5 a 3,5 mmol L ⁻¹) usando os eletrodos de CNT/hemina/Nujol® (a) e CNT/Nujol® (b). Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . Experimentos realizados em pH 7,0.....	132
Figura 1.10. Cronoamperograma obtido para o eletrodo CNT/hemina/Nujol® em diferentes concentrações de hidroquinona (0,025 a 0,2 mmol L ⁻¹), Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ , t = 60 s e E _{pa} = 0,25 V	134
Figura 1.11. Gráficos de I_{pa} (μA) vs $t^{-1/2}$ obtidos dos cronoamperogramas da Figura 10.....	134
Figura 1.12. Variação da I_{pa} (μA) de HQ em função do Incremento de potencial (V). Amplitude = 50 mV e Frequência = 50 Hz.....	135
Figura 1.13. Variação da I_{pa} (μA) de HQ em função da Frequência. Amplitude = 50 mV e Incremento de potencial = 0,01 V	136
Figura 1.14. Variação da I_{pa} (μA) de HQ em função da Amplitude. Frequência = 70 Hz e Incremento de potencial = 0,01 V	137
Figura 1.15. Influência da concentração do eletrólito Tris-HCl (pH 7,0) na I_{pa}	

da HQ. [HQ] = 10^{-3} mol L ⁻¹	138
Figura 1.16. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de hidroquinona (0 a 120 μ mol L ⁻¹) obtidos com o eletrodo CNT/hemina/Nujol®. [Tris-HCl] = 0,15 mol L ⁻¹ (pH 7,0), Amplitude = 70 mV, Frequência = 70 Hz e Incremento de potencial = 0,01 V	140
Figura 1.17. Curva analítica de HQ. [Tris-HCl] = 0,15 mol L ⁻¹ (pH = 7,0). Amplitude = 70 mV, Frequência = 70 Hz, Incremento de potencial = 0,01 V. (r = 0,996)	140
Figura 1.18. Voltamogramas cíclicos usando o eletrodo de pasta de CNT/hemina/ Nujol® (20:10:70) feita em 2 dias diferentes (08/06/11e 21/12/11). [Tris-HCl] = 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 7,0), 50 mV s ⁻¹ (3° ciclo)	142
Figura 1.19. Voltamogramas cíclicos realizados em Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0) usando eletrodo não modificado de CNT/Nujol® e modificado CNT/hemina/Nujol® na ausência e presença de H ₂ O ₂	145
Figura 1.20. Dependência da I _{pc} (μ A) com o pH para o eletrodo de CNT/hemina/ Nujol®. [Tris-HCl] = 0,05 mol L ⁻¹ , [H ₂ O ₂] = 0,6 mmol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹ , 3° ciclo	147
Figura 1.21. (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CNT/hemina/Nujol® na presença de 0,4 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ em diferentes velocidades de varredura. (b) Variação I _{pc} (μ A) de H ₂ O ₂ versus v ^{1/2} (mV s ⁻¹) ^{1/2} (r = 0,991)	148
Figura 1.22. (a) Voltamogramas de voltametria linear do eletrodo CNT/hemina/ Nujol® em diferentes concentrações de H ₂ O ₂ de 0,2 a 1,4 mmol L ⁻¹ . (b) Curva analítica de H ₂ O ₂ . [Tris-HCl] = 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 7,0), Velocidade de varredura = 100 mV s ⁻¹	151
Figura 1.23. Voltamogramas lineares de 0,4 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ usando pasta de CNT/hemina/Nujol® preparada em 2 dias diferentes (30/09/12 e 21/12/12). [Tris-HCl] = 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 7,0), 100 mV s ⁻¹	152

Figura 1.24. (a) Estabilidade operacional realizada no sensor CNT/hemina/Nujol® por voltametria cíclica por 300 ciclos consecutivos em tampão Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0) e H ₂ O ₂ 0,4 mmol L ⁻¹ a 50 mV s ⁻¹ ; (b) % da resposta inicial versus o número de ciclos	153
Figura 2.1. Estrutura do colesterol	163
Figura 2.2. Espectros de IV dos polímeros (a) com impressão: MIP 6:1 (I) e MIP 1:5 (II), (b) sem impressão: NIP 6:1 (III) e NIP 1:5 (IV)	177
Figura 2.3. Micrografias do MEV do MIP (a) e do NIP (b) na razão molar MAA/TEOS 6:1 em ampliação 13000x	180
Figura 2.4. Micrografias do MEV do MIP (a) e do NIP (b) na razão molar MAA/TEOS 1:5 em ampliação 13000x	181
Figura 2.5. Termogramas do polímero híbrido com impressão (a) e sem impressão (b) na razão molar MAA/TEOS 6:1	183
Figura 2.6. Termogramas do polímero híbrido com impressão (a) e sem impressão (b) na razão molar MAA/TEOS 1:5	184
Figura 2.7. % de adsorção de colesterol pelos polímeros híbridos sintetizados nas proporções molares MAA/TEOS 6:1 (a) e 1:5 (b) em diferentes solventes: hexano, isopropanol, clorofórmio, metanol e etanol	186
Figura 2.8. Proposta de mecanismo para a síntese do polímero híbrido	187
Figura 2.9. Influência do tempo de contato na quantidade adsorvida de colesterol nos polímeros híbridos com (a) e sem impressão (b) nas razões molares MAA/TEOS 6:1	188
Figura 2.10. Influência do tempo de contato na quantidade adsorvida de colesterol nos polímeros híbridos com (a) e sem impressão (b) nas razões molares MAA/TEOS 1:5	189
Figura 2.11. Isotermas de adsorção de colesterol no MIP (a) e no NIP (b) da síntese I e dos MIP (c) e NIP (d) da síntese II e ajuste dos dados empregando modelos não lineares de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich	196
Figura 2.12. Estruturas do (a) colesterol, (b) 5 - α -colestano e (c) 7-dehidrocolesterol	200

Figura 2.13. Sistema manifold à vácuo utilizado na otimização do protocolo MISPE para extração de colesterol	202
Figura 2.14. Percentual de remoção de colesterol (%) em cartuchos de MIP usando diferentes solventes de lavagem	203
Figura 2.15. Percentual de recuperação de colesterol (%) em cartuchos de MIP utilizando diferentes solventes de eluição.....	204
Figura 2.16. Cromatogramas do extrato hexânico de leite após saponificação e submetidos a procedimento SPE usando MIP ou NIP	205
Figura 2.17. Cromatograma do extrato hexânico de leite após saponificação e submetido a procedimento SPE usando C ₁₈	205
Figura 2.18. Curva de ruptura do MIP 6:1 usando 100,0 mg L ⁻¹ de colesterol a um fluxo de 0,6 mL min ⁻¹ . C: concentração de colesterol do efluente da coluna e C ₀ : concentração inicial de colesterol de 100,0 mg L ⁻¹	207
Figura 2.19. (a) Curva analítica de colesterol, (b) cromatogramas relacionados a curva analítica.....	208

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP	69
Quadro 2. Características entre as biomoléculas naturais (enzimas, anticorpos, receptores) e os MIP.....	72
Quadro 3. Exemplos de aplicações biológicas e ambientais utilizando MISPE	74

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Diferença entre os picos de potenciais anódicos e catódicos de HQ utilizando diferentes eletrodos como carbono vítreo (CV), nanotubo de carbono (CNT/Nujol®) e nanotubo de carbono modificado com hemina (CNT/hemina/ Nujol®) em diferentes proporções	122
Tabela 1.2. Influência de diferentes tampões no potencial anódico, corrente anódica e largura de pico da HQ.	137
Tabela 1.3. Comparação do desempenho do eletrodo desenvolvido neste trabalho para HQ com outros eletrodos	141
Tabela 1.4. Potenciais de oxidação da HQ e dos interferentes estudados na faixa de potencial de -0,2 a 0,7 V e seus respectivos sinais	143
Tabela 1.5. Determinação de hidroquinona usando o sensor CNT/hemina/ Nujol® em formulações farmacêuticas e validação em HPLC como técnica de referência	144
Tabela 1.6. Correntes catódicas de peróxido de hidrogênio em diferentes proporções de pasta de CNT/hemina/Nujol®	146
Tabela 1.7. Correntes catódicas de peróxido de hidrogênio em diferentes velocidades de varredura na presença de 0,4 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	149
Tabela 1.8. Determinação de peróxido de hidrogênio em antissépticos bucais e clareador dental em gel usando o método volumétrico e o método proposto	154
Tabela 2.1. Parâmetros texturais dos polímeros híbridos com e sem impressão sintetizados nas proporções molares MAA/TEOS 6:1 e 1:5.....	181
Tabela 2.2. Parâmetros cinéticos estimados para a adsorção de colesterol nos polímeros híbridos com e sem impressão usando os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem	191
Tabela 2.3. Parâmetros cinéticos estimados para a adsorção de colesterol nos polímeros híbridos com e sem impressão usando os modelos de Elovich e Difusão Intrapartícula	192

Tabela 2.4. Parâmetros isotérmicos da adsorção de colesterol pelos MIP e NIP preparados pela síntese I. Q_{exp} para o MIP = 224,04 mg g ⁻¹ , Q_{exp} para o NIP = 93,21 mg g ⁻¹	195
Tabela 2.5. Parâmetros isotérmicos da adsorção de colesterol pelos MIP e NIP preparados pela síntese II. Q_{exp} para o MIP = 155,94 mg g ⁻¹ , Q_{exp} para o NIP = 141,81 mg g ⁻¹	196
Tabela 2.6. Comparação entre as capacidades máximas adsorptivas de colesterol nos materiais híbridos molecularmente impressos poli(ácido metacrílico)/sílica (PMAA-SiO ₂) com outros adsorventes	198
Tabela 2.7. Parâmetros relacionados ao efeito de impressão (K_d , k , k') para colesterol e 5- α -colestano	200
Tabela 2.8. Parâmetros relacionados ao efeito de impressão (K_d , k , k') para colesterol e 7-dehidrocolesterol (7-DHCHO).....	201
Tabela 2.9. Recuperação do colesterol em diferentes amostras de leite bovino integral após extração com MISPE (n = 2).....	210

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	26
REFERÊNCIAS.....	31
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
1. NANOTUBO DE CARBONO: CARACTERÍSTICAS GERAIS E APLICAÇÕES EM ELETROANALÍTICA	36
1.1. Características gerais dos nanotubos de carbono.....	36
1.2. Aplicação dos nanotubos de carbono para o desenvolvimento de sensores.....	39
1.3. Sensores voltamétricos usados na determinação de peróxido de hidrogênio	50
1.4. Sensores voltamétricos baseados em CNT usados na determinação de hidroquinona	51
2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO	55
3. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS COMO EXTRATORES EM FASE SÓLIDA: MÉTODOS DE PREPARO, APLICAÇÕES, CARACTERIZAÇÃO E DESEMPENHO.....	60
3.1. Métodos de preparo dos MIP.....	65
3.2. Aplicação dos MIP como sorventes para SPE.....	71
3.3. Polímeros molecularmente impressos para extração de colesterol.....	75
3.4. Caracterização dos polímeros molecularmente impressos	85
3.4.1. Cinética de adsorção.....	85
3.4.2. Isotermas de adsorção.....	88
3.5. Avaliação do desempenho seletivo do MIP	90
4. REFERÊNCIAS.....	92

CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR VOLTAMÉTRICO BASEADO EM PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO MODIFICADO COM HEMINA PARA DETERMINAÇÃO DE

HIDROQUINONA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS		109
1.	INTRODUÇÃO	110
2.	OBJETIVO GERAL	113
2.1.	Objetivos Específicos	114
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	115
3.1.	Equipamentos e Reagentes	115
3.2.	Preparo do eletrodo de pasta de nanotubo de carbono modificado com hemina para determinação de hidroquinona e peróxido de hidrogênio	117
3.3.	Preparo de amostras e métodos voltamétricos para determinação de hidroquinona em cremes cosméticos e peróxido de hidrogênio em antissépticos bucais e gel clareador	118
3.3.1.	Determinação de hidroquinona	118
3.3.2.	Determinação de peróxido de hidrogênio	119
3.4.	Método Cromatográfico para determinação de HQ	119
3.5.	Método Volumétrico para determinação de H₂O₂	120
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
4.1.	SENSOR VOLTAMÉTRICO PARA HIDROQUINONA	120
4.1. 1.	Avaliação do desempenho do sensor voltamétrico para HQ	120
4.1.2.	Estudo da composição da pasta CNT/hemina/Nujol® para HQ	122
4.1.3.	Efeito do pH para HQ	123
4.1.4.	Efeito da velocidade de varredura para HQ	125
4.1.5.	Avaliação da hemina como catalisador biomimético do do sítio ativo de peroxidase para peróxido de hidrogênio	127
4.1.6.	Determinação do coeficiente de difusão da hidroquinona	133
4.1.7.	Estudo dos parâmetros relativos à técnica de voltametria de onda quadrada	135
4.1.8.	Estudo dos tampões e suas concentrações	137
4.1.9.	Características Analíticas do sensor de CNT/hemina/Nujol®	139
4.1.10.	Avaliação de interferentes na determinação de hidroquinona no sensor CNT/hemina/Nujol®	142
4.1.11.	Aplicação do Método Proposto e Exatidão	143

4.2. SENSOR VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	144
4.2.1. Avaliação do desempenho do sensor voltamétrico para H ₂ O ₂ e estudo da melhor composição da pasta CNT/hemina Nujol®.....	144
4.2.2. Estudo do pH	146
4.2.3. Efeito da velocidade de varredura	147
4.2.4. Otimização para determinação de H ₂ O ₂ usando voltametria linear.....	149
4.2.5. Características analíticas e aplicação do sensor voltamétrico	149
5. CONCLUSÕES	154
6. REFERÊNCIAS	156

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA EXTRAÇÃO DE COLESTEROL EM ALIMENTOS	162
1. Introdução	163
2. OBJETIVOS GERAIS	169
2.1. Objetivos Específicos	169
3. METODOLOGIA.....	170
3.1. Equipamentos	170
3.2. Reagentes	170
3.3. Síntese dos polímeros híbridos para colesterol	171
3.4. Estudo cinético em batelada	172
3.5. Construção das isotermas de adsorção.....	173
3.6. Avaliação do efeito de impressão	173
3.7. Procedimento de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)	174
3.8. Extração do colesterol no leite bovino integral	175
3.9. Otimização do protocolo MISPE.....	175
3.10. Estudo da capacidade exaustiva do polímero híbrido sob condições dinâmicas (curva de ruptura).....	176
3.11. Parâmetros Analíticos.....	176
3.12. Aplicação do método proposto e validação.....	176

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	177
4.1.	Caraterização dos Polímeros Híbridos	177
4.1.1.	Análises de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	177
4.1.2.	Microscopia eletrônica de varredura e análises texturais	179
4.1.3.	Análise Termogravimétrica	181
4.1.4.	Adsorção de colesterol: efeito de diferentes solventes	185
4.1.5.	Estudo cinético de adsorção	186
4.1.6.	Isoterma de adsorção	193
4.1.7.	Estudos de Seletividade	198
4.2.	Utilização do material híbrido molecularmente impresso como sorvente em extração em fase em fase sólida (MISPE) para extração de colesterol total	201
4.2.1.	Otimização do protocolo MISPE para extração de colesterol em leite bovino	202
4.3.	Estudo da capacidade exaustiva do polímero híbrido (Síntese I) sob condições dinâmicas (curva de ruptura)	206
4.4.	Validação e aplicação do método proposto	206
5.	CONCLUSÕES	210
6.	REFERÊNCIAS	212
	CONCLUSÕES GERAIS	216

INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de novos materiais tem aumentado significativamente em diversos campos trazendo grandes contribuições e inovações em diferentes áreas, principalmente em Química Analítica. Novos materiais podem introduzir maior sensibilidade e seletividade aos métodos analíticos já conhecidos por meio da variação da composição química, dimensões físicas, inclusão de componentes biológicos fazendo com que estes apresentem novas propriedades, potencializando suas aplicabilidades. Dentre estes novos materiais tem se destacado os nanomateriais e os polímeros biomiméticos¹.

Atualmente, tem-se buscado padrões de concentrações cada vez menores em amostras de interesse ambiental, farmacêutica, clínica e alimentícia e métodos alternativos têm sido propostos, como o uso de materiais adsorventes que retêm seletivamente e reversivelmente o analito.

Na área de nanomateriais, os nanotubos de carbono (CNT) destacam-se em aplicações eletroanalíticas, devido ao seu tamanho nanométrico e suas interessantes propriedades físico-químicas, tais como excelente condutividade elétrica, alta estabilidade química e notável resistência mecânica, sendo recomendado como material promissor para várias aplicações.²

Em eletroanalítica, o CNT é usado em eletrodos, podendo ser utilizado como adquirido, pré-purificado³⁻⁷ ou também funcionalizado com outros grupos químicos.⁸⁻¹² Por diminuir o potencial redox de vários substratos e, ao mesmo tempo, aumentando a velocidade de reação, melhora a seletividade e sensibilidade da detecção amperométrica. Por esta razão, o CNT pode ser usado como material eletródico em processos de transferência de elétrons

envolvendo vários sistemas eletroquímicos como: nitrito¹³, ferroceno¹⁴, H₂O₂¹⁵, NADH¹⁶, epinefrina¹⁷, hemina¹⁸, hemoglobina^{14,19} e peroxidases.¹⁹⁻²¹ O estudo de processos de transferência de elétrons direta entre eletrodos e biomoléculas (proteínas redox, oxiredutases, etc) é um meio conveniente e informativo para entender a cinética e a termodinâmica dos processos redox biológicos. Neste contexto, a hemina (protoporfirina IX de ferro II), que apresenta boa estabilidade em solução, baixo peso molecular e baixo custo, desempenha um importante papel como molécula modelo para entender a atividade redox das heme-proteínas (exemplos: b-citocromos, peroxidases, catalases) e das proteínas que transportam oxigênio (mioglobina e hemoglobina).²²⁻²³ Ainda, atua como composto biomimético para peroxidases ou nitrito redutases²⁴, além de funcionar como mediador em condições próximas ao meio ambiente biológico nativo e para detecção amperométrica de várias espécies, como O₂²⁵, H₂O₂²³, NO/NO₂⁻²⁴, superoxidase²², triptofano e seus derivados.²⁶ A hemina apresenta a vantagem de possuir um anel de protoporfirina que promove sua adsorção em materiais carbonáceos, podendo ser imobilizada na superfície do CNT para o preparo de sensores² e utilizados para determinação de analitos em formulações farmacêuticas.

Apesar das vantagens da hemina como composto biomimético de enzimas, apenas sensores baseados em CNT/hemina na forma de filme sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo foram desenvolvidos e não há na literatura sensores que utilizam material compósito baseado em nanomaterial (CNT/hemina) na forma de pasta. Esta apresenta a vantagem da sua simplicidade e baixo custo na sua preparação, além da sua superfície ser reprodutível.

Em relação aos polímeros biomiméticos, as principais estratégias analíticas que permitem obter materiais seletivos, baseiam-se no reconhecimento molecular de muitos processos biológicos.²⁷⁻²⁸ Essas biomoléculas possuem sítios receptores que se ligam seletivamente a uma molécula na presença de outras com estruturas análogas. No entanto, as enzimas ou anticorpos apresentam elevado custo, precisam ser purificadas, são de difícil obtenção, além de serem instáveis em condições diferentes daquelas de seu ambiente nativo.²⁹ Com isso, os materiais biológicos podem ser substituídos, dependendo do sistema biológico, por materiais sintéticos (polímeros) que possuam o mesmo grau de reconhecimento molecular.

Estes polímeros sintéticos preparados por tecnologia de impressão química são conhecidos como polímeros molecularmente impressos, MIP (do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*). A capacidade de reconhecimento molecular do polímero molecularmente impresso (MIP) é avaliada em relação ao polímero não impresso (NIP, do inglês *Non Imprinted Polymer*). Este material é sintetizado nas mesmas condições do MIP, com exceção da adição do analito, ou seja, funciona como um polímero controle. Estes polímeros com impressão têm sido bastante utilizados em tratamentos prévios da amostra, em etapas de extração e/ou pré-concentração, a fim de eliminar os interferentes (clean-up) e/ou pré-concentrar o analito.³⁰⁻³¹

Os MIP podem ser classificados como polímeros orgânicos e inorgânicos, os quais se diferem na estratégia de síntese, bem como nos monômeros empregados. No preparo dos MIP orgânicos são utilizados monômeros, reagentes de ligação cruzada e iniciadores radicalares orgânicos, podendo ser sintetizados via processo em *bulk*, precipitação ou suspensão. Durante a síntese

de MIP orgânicos, uma variedade de monômeros comercialmente disponíveis pode ser avaliada dependendo do tipo de analito que será usado, conferindo assim uma ampla aplicabilidade destes materiais. Em relação aos MIP inorgânicos, geralmente emprega-se tetraetoxisilano (TEOS), o qual é responsável pela formação da rede polimérica, sendo o processo de síntese baseado no processo sol-gel. Nestes materiais o efeito de impressão molecular se dá pelo uso de um precursor funcional que contém grupos funcionais que é capaz de se ligar à molécula, conferindo assim seletividade ao adsorvente.³²⁻³³ Os MIP inorgânicos preparados via processo sol-gel apresentam como vantagem a possibilidade de controle dos poros do material, assim como maior estabilidade térmica em relação aos MIP orgânicos.

Mediante as características intrínsecas dos polímeros orgânicos e inorgânicos, estudos na área de ciência de materiais têm mostrado que polímeros híbridos orgânicos-inorgânicos oferecem características desejadas que não são encontradas em um único constituinte e a combinação adequada dos componentes tem levado à formação de materiais que apresentem propriedades complementares e multifuncionais.³⁴ Assim, o preparo de polímeros híbridos pode levar a formação de materiais porosos, termicamente estáveis e multifuncionais. Apesar das características destes materiais híbridos, há poucos relatos na literatura que empregam este polímero híbrido molecularmente impresso como adsorventes de moléculas.³⁵⁻³⁷

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo geral empregar nanomaterial para o desenvolvimento de sensor voltamétrico e, também, desenvolver materiais biomiméticos para serem utilizados como material adsorvente seletivo. O Capítulo 1 compreende o desenvolvimento de um sensor

voltamétrico baseado em nanotubo de carbono/hemina para a determinação de hidroquinona e peróxido de hidrogênio em formulações farmacêuticas e odontológicas. O Capítulo 2 aborda o desenvolvimento de polímeros impressos para serem aplicados como material adsorvente na extração de colesterol em matrizes alimentícias.

REFERÊNCIAS

1. He, L.; Toh, C. S. Recent advances in analytical chemistry--a material approach. *Anal. Chim. Acta*, v. 556, p. 1-15, 2006.
2. Turdean, G. L.; Popescu, I. C.; Curulli, A.; Palleschi, G. Iron (III) protoporphyrin IX—single-wall carbon nanotubes modified electrodes for hydrogen peroxide and nitrite detection. *Electrochimica Acta*, v. 51, p. 6435-6441, 2006.
3. Rezaei, B.; Damiri, S. Voltammetric behavior of multi-walled carbon nanotubes modified electrode-hexacyanoferrate(II) electrocatalyst system as a sensor for determination of captopril. *Sens. Actuators B*, v. 134, p. 324 – 331, 2008.
4. Belin, T.; Epron, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Mater. Sci. Eng. B*, v. 119, p. 105 – 118, 2005.
5. Zhao, L.; Liu, H.; Hu, N. Electroactive films of heme protein-coated multiwalled carbon nanotubes. *J. Colloid. Interf. Sci.*, v. 296, p. 204 – 211, 2006.
6. Tavana, T.; Khalilzadeh, M. A.; Karimi-Maleh, H.; Ensafi, A. A.; Beitollahi, H.; Zareyee, D. Sensitive voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode. *J. of Molecular Liquids*, v. 168, p. 69–74, 2012.
7. Beitollah, H.; Goodarzian, M.; Khalilzadeh, M. A.; Karimi-Maleh, H.; Hassanzadeh, M.; Tajbakhsh, M. Electrochemical behaviors and determination of carbidopa on carbon nanotubes ionic liquid paste electrode. *J. of Molecular Liquids*, v. 173, p. 137 – 143, 2012.
8. Wohlstadter, J. N.; Wilbur, J. L.; Sigal, G. B.; Biebuyck, H. A.; Billadeau, M. A.; Dong, L.; Fisher, A. B.; Gudibande, S. R.; Jameison, S. H.; Kenten, J. H.; Leginus, J.; Leland, J. K.; Massey, R. J.; Wohlstadter, S. J. Carbon nanotube-based biosensor. *Adv. Mater.*, v. 14, p. 1184, 2003.
9. Bu, C.; Liu, X.; Zhang, Y.; Li, L.; Zhou, X.; Lu, X. A sensor based on the carbon nanotubes-ionic liquid composite for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Colloids Surf. B*, v. 88, p. 292 – 296, 2011.
10. Liu, Z.; Wang, Z.; Cao, Y.; Jing, Y.; Liu, Y. High sensitive simultaneous determination of hydroquinone and catechol based on graphene/BMIMPF₆ nanocomposite modified electrode. *Sens. Actuators B*, v. 157, p. 540 – 546, 2011.

11. Ozoner, S. K.; Yalvac, M.; Erham, E. Flow injection determination of catechol based on polypyrrole–carbon nanotube–tyrosinase biocomposite detector. *Curr. Appl. Phys.*, v. 10, p. 323 – 328, 2010.
12. Shahmiri, M. R.; Bahari, A.; Karimi-Maleh, H.; Hosseinzadeh, R.; Mirnia, N. Ethynylferrocene–NiO/MWCNT nanocomposite modified carbon paste electrode as a novel voltammetric sensor for simultaneous determination of glutathione and acetaminophen. *Sen. Actuators B*, v. 177, p. 70 – 77, 2013.
13. Liu, S.; Dai, Z.; Chen, H.; Ju, H.; Liu, S.; Dai, Z.; Chen, H.; Ju, H. Immobilization of hemoglobin on zirconium dioxide nanoparticles for preparation of a novel hydrogen peroxide biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, v.19, p. 963-969, 2004.
14. Sherigara, B. S.; Kutner, W.; D'Souza, F. Electrocatalytic properties and sensor applications of fullerenes and carbon nanotubes. *Electroanalysis*, v. 15, p. 753-772, 2003.
15. Wang, J.; Musameh, M.; Lin, Y. Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors. *Am. Chem. Soc.*, v. 125, p. 2408-2409, 2003.
16. Antiochia, R.; Lavagnini, I.; Pastore, P.; Magno, F. A comparison between the use of a redox mediator in solution and of surface modified electrodes in the electrocatalytic oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide. *Bioelectrochemistry*, v. 64, p. 157-163, 2004.
17. Luo, H.; Shi, Z.; Li, N.; Gu, Z.; Zhuang, Q. Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode. *Anal. Chem.*, v. 73, p. 915-920, 2001.
18. Cai, C.; Chen, J. Direct electron transfer and bioelectrocatalysis of haemoglobin at a carbon nanotube electrode. *Anal. Biochem.*, v. 325, p. 285-292, 2004.
19. Zhao, Y.-D.; Y.-H. Bi; W.-D. Zhang; Q.-M. Luo, *Talanta*, **2005**, 65,489.
20. Yu, X.; Chattopadhyay, D.; Galeska, I.; Papadimitrakopoulos, F.; Rusling, J. F. Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes. *Electrochem. Commun.*, v. 5, p. 408-411, 2003.
21. Xu, J.-Z.; Zhu, J.-J.; Wu, Q.; Hu, Z.; Chen, H.-Y. An Amperometric Biosensor Based on the Coimmobilization of Horseradish Peroxidase and Methylene Blue

on a Carbon Nanotubes Modified Electrode. *Electroanalysis*, v. 15, p. 219-224, 2003.

22. Chen, J.; Wollenber, U.; Lisdat, F.; Ge, B.; Scheller, F. W. Superoxide Sensor Based on Hemin Modified Electrode. *Sens. Actuators B*, v. 70, p. 115-120, 2000.

23. Zhang, Y. L.; Zhang, C. X.; Shen, H. X. The studies on hemin as mimetic peroxidase in salt bridge supported bilayer lipid membrane system. *Electroanalysis*, v. 13, p. 1431-1435, 2001.

24. Mimica, D.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. Electrocatalysis of nitric oxide reduction by hemoglobin entrapped in surfactant films. *Electrochem. Commun.*, v. 3, p. 435-438, 2001.

25. Zheng, N.; Zeng, Y.; Osborne, P. G.; Li, Y.; Chang, W.; Wang, Z. Electrocatalytic reduction of dioxygen on hemin based carbon paste electrode. *J. Appl. Electrochem.*, v. 32, p. 129-133, 2002.

26. Nan, C. G.; Fena, Z. Z.; Li, W. X.; Ping, D. J.; Qin, C. H. Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at glassy carbon electrode modified with hemin. *Anal. Chim. Acta*, v. 452, p. 245-254, 2002.

27. Haupt, K. Molecularly Imprinted polymers: the next generation. *Anal. Chem.*, v. 75, p. 376-383, 2003.

28. Marestoni, L. D.; Sotomayor, M. D. T.; Segatelli, M. G.; Sartori, E. R.; Tarley, C.R.T. Ion imprinted polymers: fundamentals, preparation strategies and applications in analytical chemistry. *Quim. Nova*, v. 36, p. 1194-1207, 2013.

29. Sellergren, B., Noncovalent molecular imprinting: Antibody-like molecular recognition in polymeric network materials. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, v. 16, p. 310-320, 1997.

30. Garcia-Viloca, M.; Gao, J.; Karplus, M.; Truhlar, D. G., How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science*, v. 303, p. 186-195, 2004.

31. Wang, L.; Lin, F.; Yu, L. A molecularly imprinted photonic polymer sensor with high selectivity for tetracyclines analysis in food. *Analyst*, v. 137, p. 3502-3509, 2012.

32. Dai, S. et al. Hierarchically imprinted sorbents for the separation of metal ions. *Am. Chem. Soc.*, v. 122, p. 982-993, 2000.
33. Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Froba, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 45, p. 3216-3251, 2006.
34. Judeinstein, P.; Sanchez, C. Hybrid organic-inorganic materials: a land of multidisciplinary. *J. of Materials Chemistry*, v. 6, p. 511-525, 1996.
35. Lv, Y.-K.; Wang, L.-M.; Yang, L.; Zhao, C.-X.; Sun, H.-W. Synthesis and application of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)-silica hybrid composite material for selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of oxytetracycline residues in milk. *J. Chromatogr. A*, v. 1227, p. 48-53, 2012.
36. Lin, C. I.; Joseph, A. K.; Chang, C. K.; Wang, U. C.; Lee, Y. D. Synthesis of molecular imprinted organic-inorganic hybrid polymer binding caffeine. *Anal. Chim. Acta*, v. 481, p. 175-180, 2003.
37. Lv, Y.-K.; Wang, L.-M.; Yang, S.-L.; Wang, X.-H.; Sun, W.-H. Synthesis and characterization of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica hybrid composite materials for selective recognition of lincomycin in aqueous media. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 126, p. 1631-1636, 2012.

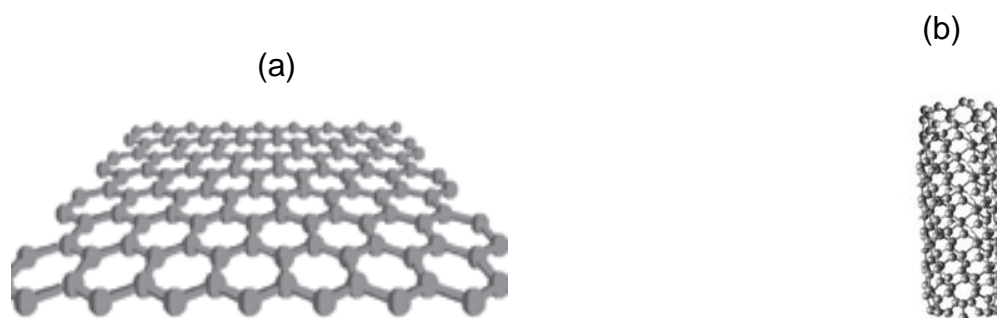
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. NANOTUBO DE CARBONO: CARACTERÍSTICAS GERAIS E APLICAÇÕES EM ELETROANALÍTICA

1.1. Características gerais dos nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (CNT, do inglês *Carbon Nanotubes*) são obtidos por meio de uma folha de grafite (Figura 1(a)) enrolada em forma cilíndrica (Figura 1(b)).

Figura 1. Representação ilustrando uma folha de grafite (a) responsável pela formação de um nanotubo de carbono (b) (Souza Filho & Fagan, 2007)¹.



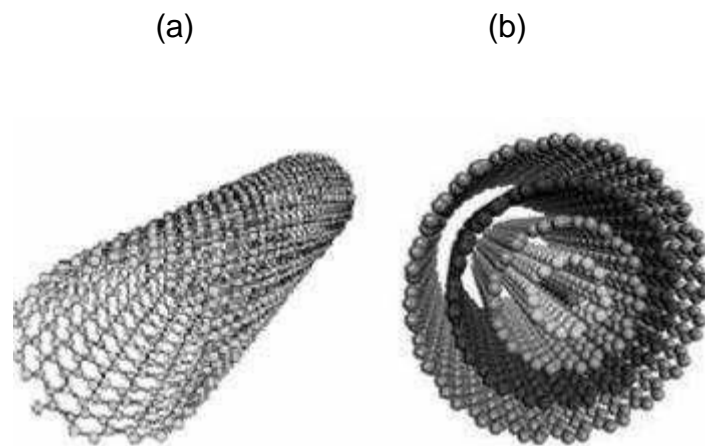
Os CNT são formados de arranjos hexagonais de átomos de carbono sp^2 e apresentam diâmetro nanométrico e comprimento na ordem de micrômetros ou centímetros.² Este material foi descrito inicialmente por Iijima em 1991 e sua descoberta teve um grande impacto na tecnologia e na ciência, principalmente no campo da eletroquímica, por apresentar alta condutividade, consequência do arranjo hexagonal de átomos de carbono sp^2 , além de apresentar propriedades químicas e físicas excelentes, devido a combinação de sua morfologia, estrutura e tamanho.³

Os nanotubos de carbono podem ser divididos em duas classes: nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT, do inglês *single-walled*

carbon nanotubes) e nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*).⁴

Os nanotubos de parede simples são formados pelo enrolamento de uma única folha de grafeno (Figura 2(a)), enquanto que os nanotubos de carbono multicamadas são formados pelo enrolamento de duas ou mais camadas concêntricas de grafeno (Figura 2(b)).

Figura 2. Representação esquemática das duas formas de CNT: (a) SWCNT e (b) MWCNT.



Existem várias técnicas para se produzir CNT, sendo que as mais utilizadas são por arco elétrico⁵⁻⁶, ablação por laser⁷⁻⁸ e deposição química a vapor.⁹⁻¹¹

No método por arco elétrico é aplicada uma alta corrente elétrica através de dois eletrodos de grafite, o qual deve apresentar elevada pureza, sob atmosfera de argônio ou hélio, assim o grafite vaporiza e se condensa no cátodo. Na produção de SWCNT os eletrodos de grafite são dopados com átomos de um metal usado como catalisador como o níquel, cobalto, Fe e etc.⁵⁻⁶ Entretanto, é importante atentar que o diâmetro dos tubos, grau de

pureza e tipo de nanotubo são propriedades dependentes do tipo, qualidade e distribuição dos catalisadores. A desvantagem deste método refere-se ao processo de purificação dos SWCNT, uma vez que a remoção de material carbonáceo (exceto nanotubo de carbono) e catalisadores metálicos é bastante onerosa.¹²

Na ablação a laser é utilizado um laser de alta potência que vaporiza um alvo de grafite em temperaturas elevadas, aproximadamente 1200°C, sob fluxo de argônio. Neste método, os átomos de carbono que foram sublimados na região de alta temperatura, são arrastados por um fluxo de gás até um coletor de cobre resfriado, no qual estes átomos são condensados na forma de CNT. Com este método é possível produzir SWCNT utilizando catalisadores metálicos no alvo de grafite, como citado no método do arco elétrico e também produzir MWCNT utilizando grafite puro.⁷⁻⁸ Este método é vantajoso no tocante à alta qualidade do material obtido, podendo ser controlado o diâmetro e o crescimento dos SWCNT. Mudanças na temperatura do tubo de quartzo, catalisadores metálicos e fluxo de argônio afetam diretamente o diâmetro dos SWCNT.¹³

No método de deposição química a vapor (CVD) é feita uma pirólise de uma fonte de carbono, a qual pode ser monóxido de carbono, hidrocarbonetos líquidos ou gasosos, na presença de catalisadores metálicos suportados em sílica, alumina ou zeólitas, em temperaturas de 500 a 1000°C.^{9-11,13}

Apesar dos métodos de arco elétrico e ablação a laser fornecerem CNT com alta qualidade, cristalinidade, especificidade e diâmetros controlados, estas técnicas apresentam elevado custo e geram pequenas quantidades

destes materiais.¹⁴⁻¹⁵ Por outro lado, o método de deposição química a vapor apresenta um custo mais baixo e produção de CNT em larga escala, sendo, portanto, o método mais utilizado para se obter este nanomaterial, principalmente na forma de camadas múltiplas.

1.2. Aplicação dos nanotubos de carbono para o desenvolvimento de sensores

O conjunto das propriedades únicas de estabilidade térmica, elétrica e de condutividade, permite que os CNT possam ser utilizados em diversas aplicações tecnológicas, como em dispositivos eletrônicos e óticos eletrônicos, em transistores, tubos de raios catódicos, células solares, eletrodos em baterias de lítio, armazenadores de hidrogênio de células combustíveis, dispositivos fotovoltaicos, e também, têm ganhado destaque em desenvolvimento de sensores biológicos e eletroquímicos para aplicações médicas e farmacêuticas. Merkoçi¹⁶ em 2006 e Rivas e colaboradores¹⁷ realizaram revisões sobre o emprego de nanotubos de carbono em diversos segmentos, desde aplicações em técnicas de extração, bem como no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

O uso de sensores eletroquímicos baseados em CNT tem sido bastante intensificado para a determinação de espécies eletroativas¹⁸⁻²² devido sua habilidade em promover a reação de transferência de elétron com alto efeito eletrocatalítico quando usado como materiais eletródicos.²³⁻²⁴ A atividade eletrocatalítica dos MWCNT depende fortemente do modo de fabricação dos

CNT e também do agente de dispersão utilizado para imobilizá-lo na superfície do eletrodo.²⁵

Como citado anteriormente, independentemente do método de síntese do CNT, as impurezas, como carbono amorfo e partículas metálicas, podem permanecer e afetar as propriedades destes materiais²⁶ ou serem retiradas por processos químicos. Os métodos de oxidação e funcionalização têm sido utilizados com o objetivo de se obter materiais com teor de pureza desejável, melhorar a capacidade de transferência eletrônica dos CNT²⁷⁻²⁹, além de aumentarem a capacidade de dispersão do CNT em solventes orgânicos, assim como também melhorar a sorção e a seletividade das espécies a serem determinadas, uma vez que grupos funcionais são inseridos em sua superfície.¹ No entanto, a funcionalização envolvendo ligação covalente causa efeitos prejudiciais nas propriedades mecânicas, elétricas e térmicas dos CNT. Dentre esses efeitos prejudiciais, destaca-se a fragmentação dos nanotubos, bem como a perturbação no seu sistema elétrons π , prejudicando a condução térmica e elétrica dos mesmos. Por outro lado, quando o CNT é usado *in natura* na construção de sensores, preserva sua estrutura sp^2 e assim, preservando suas características eletrônicas.³⁰

A oxidação química é considerada o método mais antigo e popular na remoção de impurezas e na funcionalização da superfície dos nanotubos de carbono. Este método é conhecido por gerar estruturas com superfícies mais hidrofílicas, por meio da formação dos grupos funcionais -COOH, -OH, ou -C=O³¹⁻³³ com capacidade de reter uma variedade de espécies. O tratamento químico da superfície é comumente realizado com oxidantes fortes, tais como HNO₃, NaClO, H₂SO₄, KMnO₄ e H₂O₂ ou uma mistura deles.¹ No

entanto, uma das principais desvantagens do método de oxidação é a fragmentação e a geração de defeitos nas redes de grafite.

Os nanotubos de carbono, funcionalizados ou *in natura*, são comumente incorporados nos eletrodos a partir da modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo (CV) na forma de filme, e também podem ser misturados com um aglutinante para preparar pastas de CNT.

Os agentes dispersantes mais utilizados no preparo de sensores na forma de filmes tem sido a água, polímeros como Nafion® (perfluorosulfonato de sódio), β -ciclodextrina (β -CD), solventes orgânicos como dimetilformamida (DMF) e, tensoativos, como o dodecilsulfato sódico. Estes meios não alteram a superfície química do nanomaterial como ocorre quando se utilizam meios ácidos ou tratamentos eletroquímicos de ativação, mas influenciam a morfologia dos recobrimentos e as propriedades eletroquímicas dos CNT dependendo do sistema redox.

A aplicação de CNT dispersos em agentes dispersantes adequados para o uso em filmes pode ser encontrada na revisão por Merkoçi et al.³⁴ Em outras aplicações no preparo de sensores, os MWCNT foram dispersos em dimetilformamida (DMF) e depositados em um eletrodo de carbono vítreo e o comportamento eletroquímico do anti-hemorragico e angioprotetor etansilato foi investigado em detalhe. Foi observado um efeito eletrocatalítico favorável para o processo de eletro-oxidação desta catecolamina.³⁵

Bi e colaboradores³⁶ desenvolveram um eletrodo para determinação em soluções ternárias de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico dispersando nanotubos de carbono, previamente funcionalizados por tratamentos ácidos, contendo hidroxila e carboxila, em Nafion®. O MWCNT funcionalizado com

grupo carboxílico foi o que promoveu a atuação eletrocatalítica do eletrodo de carbono vítreo modificado, proporcionando a separação dos potenciais de pico dos analitos estudados.

Outro eletrodo para determinação simultânea de cafeína e ácido ascórbico em formulações farmacêuticas foi preparado por uma mistura de nanotubos de carbono e dimetilformamida (DMF). O eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT/DMF apresentou limites de detecção menores, tanto para a cafeína quanto para o ácido ascórbico, quando comparado ao eletrodo de carbono vítreo sem modificação.³⁷

Um eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT(funcionalizado)/ β -CD incorporados num filme de polianilina foi desenvolvido para determinação do herbicida bentazona. Este eletrodo mostrou uma eficiente oxidação eletrocatalítica deste composto com alta estabilidade e sensibilidade.³⁸

Quando se utiliza nanotubo de carbono disperso na forma de filme sobre a superfície de eletrodos de carbono vítreo, dois aspectos importantes devem ser considerados. O primeiro é relativo à estabilidade dos CNT no solvente dispersor; portanto, estudos com diferentes solventes ou agentes surfactantes associados com emprego de ultrassom devem ser realizados. O segundo aspecto, refere-se à necessidade de funcionalizar os CNT para garantir maior estabilidade no meio dispersor e, por consequência, maior reprodutibilidade na formação do filme sobre o eletrodo base.

Uma outra maneira de se preparar sensores a base de CNT é na forma de pastas e tem se tornado cada vez mais popular nas últimas cinco décadas. O primeiro eletrodo de pasta foi feito com grafite em 1958 por

Adams, na tentativa de se desenvolver eletrodo de carbono renovável, o qual poderia ser aplicado em potenciais mais positivos, nos quais os eletrodos de mercúrio não podiam ser aplicados devido à sua oxidação.³⁹ A pasta de carbono consiste em uma mistura de um material de carbono, tais como grafite e nanotubo de carbono em pó e um aglutinante e se tornou um dos mais populares materiais eletródicos utilizados no preparo de sensores e biossensores.⁴⁰⁻⁴³

Os sensores à base de pasta de nanotubo de carbono são versáteis, apresentam baixa corrente de fundo, permitem trabalhar em uma ampla faixa de potencial de trabalho, baixo custo, e também vale ressaltar sua vantagem quanto a facilidade de renovação da superfície. Além disso, diferentemente do que ocorre em eletrodos sólidos convencionais em que a modificação ocorre na superfície, os sensores baseados em pasta possibilitam a modificação interna do material eletródico, justificando seu progressivo uso em eletroquímica e eletroanalítica.^{19,44}

As pastas de carbono são preparadas manualmente, misturando-se o nanotubo de carbono ou grafite em pó com os líquidos orgânicos (aglutinantes) até formar uma pasta compacta que possibilita sua fixação ao eletrodo. Esses líquidos orgânicos devem ser substâncias quimicamente inertes, eletroinativas e imiscíveis em soluções aquosas, além de possuir elevada pureza, baixa volatilidade e alta viscosidade. Os aglutinantes mais utilizados na preparação de pastas de carbono são o Nujol® e a parafina líquida, sendo que estes óleos minerais são materiais não condutores.⁴⁵

Abbar e colaboradores desenvolveram um sensor de pasta de CNT/parafina (2:7, m/m) para determinação de pentoxifilina, um princípio

ativo encontrado em fármacos hemorreológicos, em formulações farmacêuticas e urina. Este sensor apresentou limite de detecção de 16,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para pentoxifilina.⁴⁶

Duarte e colaboradores desenvolveram um sensor usando pasta de CNT/óleo mineral (22:78, m/m) na presença do surfactante brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), para a determinação simultânea de acetoaminofeno e ácido ascórbico em formulações farmacêuticas. Neste trabalho o CNT utilizado foi *in natura*. Os resultados voltamétricos obtidos mostraram claramente que a eletroxidação de acetoaminofeno e ácido ascórbico foi significativamente facilitada na presença do surfactante catiônico. O método proporcionou uma separação de pico notável de acetoaminofeno e ácido ascórbico maior que 350 mV, usando a voltametria de pulso diferencial e também obteve limites de detecção satisfatórios de 2,1 e 7,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.⁴⁷

Ainda como exemplo de aplicação de sensores em pasta, Duarte e colaboradores, utilizaram a mesma proporção de CNT/Nujol®, na presença de ácido sulfúrico, para determinação do antidepressivo amitriptilina em formulações farmacêuticas. Segundo os autores, o ácido sulfúrico melhora a eletroxidação da amitriptilina, provavelmente devido a oxidação dos átomos alquilamina de nitrogênio com transferência de um elétron, e também a formação de radicais catiônicos. O preparo do eletrodo foi bastante fácil e rápido. Além disso, o sensor foi altamente estável para várias medidas de amitriptilina sem a necessidade de regeneração ou renovação da superfície do eletrodo.⁴⁸

Em outro trabalho, Hudari e colaboradores também utilizaram a mesma proporção, citada nos trabalhos anteriores, de CNT/Nujol® no preparo de um sensor para determinação simultânea de acetoaminofeno e ácido úrico em urina, usando o surfactante brometo de cetilpiridínio. O efeito sinérgico dos nanotubos de carbono e do surfactante catiônico promoveu uma separação de pico notável e um aumento das correntes de pico. Além disso, como as medidas foram realizadas em pH 7,7, valor este próximo ao pH fisiológico de amostras de urina, não foram necessários ajustes de pH e tampouco pré-tratamentos anteriores.⁴⁹

Mazloun-Ardakani e colaboradores⁵⁰ utilizaram um sensor de pasta de CNT modificado com 2,2'-[1,2-etanodilbis(nitriloetilidina)]-bis-hidroquinona (EBNH) para determinação de dopamina e ácido úrico. Este sensor apresentou seletividade e sensibilidade para dopamina na presença de ácido úrico. Os limites de detecção para dopamina e ácido úrico foram 0,087 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Conforme mencionado, este tipo de preparo de sensores na forma de pasta é rápido, de baixo custo e a pasta pode ser utilizada por vários ciclos, sem a necessidade de regeneração ou renovação da superfície do eletrodo.

Além do CNT ser utilizado na construção de sensores modificados na forma de filme e pasta, pode ser usado também como material eletródico na construção de biossensores.

O termo biossensor foi introduzido em 1956 por Leland C. Clack Jr.⁵¹ com a invenção do eletrodo amperométrico de oxigênio e, a partir deste eletrodo realizou vários estudos na detecção de diferentes analitos fazendo sua modificação com enzimas. Em 1962, Clack e Lyons desenvolveram um

sensor de glicose, o qual era envolto por uma membrana de diálise com a enzima glucose oxidase (GOx) imobilizada.⁵²⁻⁵³

O biossensor consiste de um dispositivo analítico composto de um elemento biológico de reconhecimento em contato com um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico proporcional à concentração do analito.⁵⁴ Dentre os receptores biológicos estão as organelas, tecido animal e vegetal, microrganismos, anticorpos, ácidos nucleicos e, principalmente, enzimas. Um ponto muito importante na construção dos biossensores que utiliza enzimas como receptores é a imobilização da mesma sobre o eletrodo, pois vários parâmetros podem variar como a constante de ligação do substrato à enzima, a velocidade máxima desta reação e o pH ótimo para que a reação ocorra.

Yang & Zang desenvolveram um biossensor modificando a superfície do eletrodo de CV com SWCNT previamente tratado com uma mistura de HNO₃ e H₂SO₄ e disperso em DMF. Após o tratamento, o eletrodo de CV pré-tratado foi incubado em SWCNT e DNA em tampão fosfato para produzir o sensor de SWCNT baseado em DNA. Segundo os autores, este eletrodo apresentou elevada sensibilidade e seletividade, podendo torná-lo uma ferramenta de grande potencial para o diagnóstico precoce de doenças relacionadas com gene e também para a detecção de numerosas biomoléculas tais como trombina e cocaína.⁵⁵

Han e colaboradores⁵⁶ desenvolveram um biossensor baseado em MWCNT, previamente funcionalizado por oxidação eletroquímica em solução alcalina, e subsequente imobilização das biomoléculas de microcistina L-R para determinação de cianotoxinas. Este biossensor mostrou dependência

linear no intervalo de 0,05 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para microcistina L-R, permitindo o monitoramento desta cianotoxina em água potável, já que o valor limite pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em outra aplicação, um sensor de MWCNT modificado com D-glucose foi desenvolvido para determinação de concavalina A. O sensor proposto apresentou baixo limite de detecção, reprodutibilidade e estabilidade.⁵⁷

Alguns cuidados devem ser tomados quando se utiliza biossensores enzimáticos, como verificar fatores que afetem a estabilidade das enzimas, no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional. Deve-se usar condições adequadas de pH e temperatura, escolher adequadamente o método de imobilização em transdutores e também garantir a manutenção da atividade enzimática. Além disso, o custo de uma enzima purificada é relativamente alto.⁵⁸

Como alternativa para biossensores, alguns estudos têm proposto sensores baseados em eletrodo de nanotubo de carbono modificado com substâncias redox que exibam atividade catalítica para moléculas importantes com a mesma função da enzima, tais como as porfirinas.

As porfirinas pertencem a uma classe de compostos que ocorrem naturalmente e podem atuar como sítio ativo de muitas enzimas importantes, incluindo hemes, clorofilas e peroxidases. A estrutura macrocíclica da porfirina pode conjugar diversos elementos metálicos, tais como Co, Fe, Ni, e Mn, para formar complexos estáveis, que podem ser geralmente utilizados como catalisadores homogêneos em uma variedade de reações de oxidação-redução. Além disso, desempenha importante papel no sistema de transferência biológica.⁵⁹

Entre estes complexos, as porfirinas de ferro podem ser usadas como mediadores de elétrons com base na reação redox reversível do ferro e exibem propriedades eletrocatalíticas para muitas moléculas pequenas relacionadas ao meio ambiente biológico nativo. Na última década, a interação de porfirina com nanotubo de carbono tem atraído atenção⁵⁹ e esta interação se dá por ligação covalente⁶⁰, eletrostática⁶¹, e interações não covalentes π - π .⁶²

Dentre deste contexto, a hemina, uma protoporfirina IX de ferro, pode ser adsorvida em materiais que contenham carbono, devido seu anel de protoporfirina, podendo então, ser imobilizada na superfície do CNT para o preparo de sensores⁵¹, os quais são utilizados na determinação de analitos de interesse farmacêutico.

A hemina tem sido usada no preparo de sensores devido ao fato de atuar como sítio ativo de enzima oxi-redutase, além das vantagens como fácil preparo, baixo custo e resistência a ambientes diversos. Este composto desempenha um papel importante como composto biomimético para avaliar a atividade redox das hemeoproteínas (b-citocromo, peroxidase) e proteínas para transporte de oxigênio (mioglobina, hemoglobina), uma vez que tem uma boa estabilidade em soluções e apresenta baixo peso molecular.⁶³⁻⁶⁴ Além disso, é um agente mimético de peroxidase e nitrato redutase⁶⁵, além de funcionar como um mediador em condições próximas a um ambiente biológico nativo para detecção amperométrica de muitas espécies, tais como O_2 ⁶⁶, H_2O_2 ⁶⁴, NO/NO_2 ⁻⁶⁵, superoxidase⁶³, triptofano e seus derivados.⁶⁷

Mediante o exposto, alguns trabalhos têm sido reportados na literatura a respeito do uso de materiais nanocompósitos baseados em CNT e hemina

para o desenvolvimento de sensores na forma de filme.^{51, 68-71} Valentini e colaboradores primeiramente dispersaram o SWCNT previamente funcionalizado em acetonitrila, para posteriormente ser colocado na superfície do eletrodo de CV. Para a imobilização da hemina, o eletrodo de CV modificado com CNT foi mergulhado numa solução de hemina por uma noite a temperatura ambiente. Este eletrodo de carbono vítreo modificado com SWCNT/hemina foi usado na determinação de H_2O_2 e NO_2^- em soluções aquosas e apresentou bom desempenho analítico em termos de linearidade, limite de detecção, alta sensibilidade e significativa reprodutibilidade.⁶⁸

Em outro sensor, a hemina adsorvida no SWCNT funcionalizado com hidroxila, foi incorporada numa matriz de Nafion® imobilizada na superfície de eletrodo de CV. Segundo os autores o eletrodo apresentou atividade eletrocatalítica para determinação de H_2O_2 e NO_2^- .⁵¹

Um sensor biomimético desenvolvido por Santos e colaboradores consistiu de hemina e SWCNT funcionalizados ligados de forma covalente à quitosana, através do agente de ligação cruzada 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida metiodina, seguida da eletrodeposição de quitosana na superfície de microeletrodos de fibra de carbono. O microssensor foi aplicado com sucesso na medida de NO no cérebro de rato.⁷⁰

Uma outra aplicação usando nanocompósito de CNT/hemina foi no desenvolvimento de um sensor para determinação de L-tirosina. O sensor foi fabricado com base na imobilização da hemina em poli(amidoamina)/MWCNT (PAMAM/MWCNT) na forma de filme sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Este estudo mostrou boa propriedade de oxidação catalítica

da hemina, sugerindo que este composto apresenta potencial para substituir algumas enzimas redox para a construção de sensores.⁷¹

1.3. Sensores voltamétricos usados na determinação de peróxido de hidrogênio

A detecção eletroquímica do peróxido de hidrogênio pode ser realizada por oxidação direta em eletrodos de carbono e platina, mas devido aos altos valores de potencial (300 a 600 mV vs Ag/AgCl) aplicado ao eletrodo de trabalho, este sensor é sensível a espécies interferentes.⁷² Para solucionar este problema, alguns autores têm feito mudanças químicas e eletroquímicas nas superfícies dos eletrodos de trabalho.^{68-69,73}

Em 2011, Silva e colaboradores, desenvolveram eletrodos modificados com azul da prússia apresentando atividade catalítica para a redução ou oxidação de H_2O_2 . No entanto, este sensor apresenta algumas desvantagens, pois o filme de azul da prússia não apresenta estabilidade eletroquímica, apresenta baixa estabilidade em pH neutro quando se pretende aplicar em amostras biológicas reais.⁷²

A determinação voltamétrica de H_2O_2 também tem sido amplamente realizada usando biossensor⁷⁴⁻⁷⁹, envolvendo o uso da enzima peroxidase depositada sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo ou como pasta de nanotubo de carbono. Como já citado, as desvantagens de se empregar um biossensor são o tempo prolongado na sua preparação, a necessidade de ativação das enzimas em solventes orgânicos e o armazenamento a baixas temperaturas para evitar a desnaturação, e também o alto custo das enzimas

purificadas. Além disso, a transferência de elétrons entre os sítios ativos das enzimas e da superfície do eletrodo depende da abordagem adotada para a preparação do biossensor.

Apesar das vantagens da hemina como composto biomimético de enzimas, apenas sensores baseados em nanotubos de carbono imobilizados com hemina na forma de filme depositados na superfície do eletrodo de carbono vítreo foram desenvolvidos para peróxido de hidrogênio, e sua viabilidade para amostras reais em análises de produtos odontológicos ainda não foi demonstrada. Estes sensores que utilizam filmes depositados na superfície de eletrodos de carbono vítreo^{60,68,80} requerem tempo para serem preparados, têm baixa reprodutibilidade devido ao problema da deposição do filme normalmente ser manual, e também o tempo de vida mais curto.

Conforme já mencionado, o eletrodo com pasta de nanotubo de carbono contendo catalisador biomimético pode ser adequado para esta finalidade, devido a rapidez e facilidade na preparação e a possibilidade de obter uma superfície reprodutível e porosa, além do baixo custo.⁸¹⁻⁸³

1.4. Sensores voltamétricos baseados em CNT usados na determinação de hidroquinona

Como a hidroquinona (HQ) é eletroativa, pode ser determinada por técnicas eletroquímicas. A literatura tem reportado o uso de sensores voltamétricos para determinação deste composto fenólico, baseado em eletrodos modificados com filme empregando agentes dispersores e compósito iônico líquido⁸⁴⁻⁸⁷, material híbrido preparado pela polimerização

de grafeno oxidado, CNT e tertiofeno⁸⁸, e biossensores modificados com parafina/grafite⁸⁹, e com peroxidase imobilizada num eletrodo de pasta de carbono modificado com prata/arginina.⁹⁰

Qi & Zhang desenvolveram um sensor de carbono vítreo modificado com MWCNT funcionalizado com grupos carboxílicos e disperso em dimetilformamida para determinação simultânea de hidroquinona e catecol em amostras de água. Os autores mostram que o eletrodo apresentou eficácia na detecção simultânea destes dois isômeros e também boas recuperações.⁸⁴

No eletrodo de filme com compósito iônico, desenvolvido por Liu e colaboradores, o MWCNT foi primeiramente purificado com ácido clorídrico e oxidado. Após a purificação, o MWCNT foi disperso e misturado manualmente com o compósito iônico 1-butil-3-metilimidazol hexafluorofosfato (BMIMPF₆) até obter uma pasta homogênea. Posteriormente, o gel formado foi colocado sob o eletrodo de carbono vítreo. Este sensor foi usado na determinação de hidroquinona, mas não foi aplicado em amostras reais e também não foi mostrado o limite de detecção.⁸⁵

Liu e colaboradores desenvolveram um sensor para determinação simultânea de HQ e catecol utilizando folhas de grafeno dispersas em BMIMPF₆. A dispersão formada foi colocada na superfície limpa do eletrodo de carbono vítreo. Segundo os autores, as correntes de pico mantiveram 93% dos seus valores iniciais, após o eletrodo ser mantido a 4°C por duas semanas. O sensor desenvolvido neste trabalho foi aplicado em águas residuais e obteve limite de detecção de 1,0 µmol L⁻¹ para HQ.⁸⁶

Hong e colaboradores primeiramente sintetizaram o material de carbono mesoporoso grafitico e, posteriormente, o mesmo foi disperso em dimetilformamida. Na sequência, a solução foi dispersa no composto iônico BMIMPF₆. Esta suspensão foi colocada na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. O eletrodo foi usado na determinação de HQ. As correntes de pico deste sensor mantiveram 92,8% dos seus valores iniciais, após o eletrodo ser mantido a 4°C por duas semanas e apresentou limite de detecção de 0,05 μmol L⁻¹.⁸⁷

No preparo do eletrodo com material híbrido de grafeno, CNT e tertiofeno, Han e colaboradores, primeiramente oxidaram grafite para formar o óxido de grafeno e purificaram o CNT em uma mistura de ácidos. Na sequência foi adicionado o tertiofeno ao óxido de grafeno e CNT. Este material foi sonificado e então a suspensão foi colocada na superfície do eletrodo de carbono vítreo. O sensor desenvolvido por estes autores foi aplicado em águas de torneira para quantificação de HQ e catecol. Segundo os autores, após o eletrodo ser mantido a 4°C por três semanas, as respostas de correntes para HQ diminuíram 90,1% dos seus valores iniciais. O limite de detecção para hidroquinona encontrado foi de 3,5x10⁻² μmol L⁻¹.⁸⁸

Vieira e colaboradores construíram um biossensor à partir de pó de casca de batata doce, a qual foi usada como fonte enzimática de peroxidase. Para construção do biossensor, foram utilizados pó de grafite, casca de batata, soro de albumina de bovino sólido e parafina. Antes de cada análise, o eletrodo foi imerso em solvente orgânico e em solução tamponada. O biossensor construído foi armazenado em refrigerador a 4°C e o método

apresentou limite de detecção para HQ de $8,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Este eletrodo foi aplicado em amostras de cremes cosméticos.⁸⁹

Nas determinações de HQ usando biossensores, Raghua e colaboradores, prepararam um biossensor baseado no eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de prata/poli(arginina) e peroxidase imobilizada. O eletrodo de pasta de carbono foi elaborado manualmente, misturando-se pó de grafite e óleo de silicone. A pasta obtida foi então colocada na cavidade de um eletrodo com diâmetro de 2 mm. Posteriormente, uma solução de arginina foi colocada na célula eletroquímica e mergulhou-se o eletrodo de pasta de carbono nesta solução, a fim de se formar o filme de poli(arginina). Para a fabricação do eletrodo com a enzima, foi preparado um polímero pelo processo sol-gel usando tetraetoxisilano (TEOS), água, Triton-X-100 e KCl. Na sequência foi adicionado um volume de solução estoque de enzima, tampão acetato e nanopartículas de prata. Uma gota desta dispersão foi colocada sobre a superfície do eletrodo de pasta de carbono poli(arginina), previamente preparado e descrito acima, até a polimerização. Este biossensor foi armazenado sob refrigeração a 4°C e de acordo com os autores após 50 ciclos, houve uma redução de 88% no pico de corrente quando comparada ao seu valor inicial. O biossensor foi aplicado em águas mineralizadas e de torneira para quantificação de HQ e piragolol e o método obteve limite de detecção para HQ de $0,52 \mu\text{mol L}^{-1}$.⁹⁰

Com base no exposto, apesar das vantagens da hemina já mencionadas, não há na literatura sensores baseados em pasta de nanotubos de carbono modificados com este composto para quantificação de

hidroquinona em formulações farmacêuticas, tampouco para determinação de H₂O₂ em formulações odontológicas e farmacêuticas.

2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO

O preparo de amostras é uma das etapas críticas do processo analítico e tem sido um dos principais obstáculos na obtenção de resultados adequados, pois é a etapa que mais consome tempo e é a possível fonte de imprecisão e inexatidão de toda a metodologia. Além disso, o preparo de amostras deve ser rápido e conveniente com perdas mínimas dos analitos e também baixo custo de análise.⁹¹⁻⁹² As etapas mais críticas envolvidas na análise de matrizes complexas, como a alimentícia, é a extração e isolamento dos analitos de interesse.⁹³ A etapa de limpeza (*clean-up*) tem o objetivo de eliminar possíveis interferentes e a extração na retenção/pré-concentração dos analitos da matriz.

Dentre os métodos amplamente utilizados na extração/pré-concentração de analitos de matrizes complexas incluem a extração líquido-líquido (ELL)⁹⁴⁻⁹⁵, microextração líquido-líquido⁹⁶ e extração em fase sólida.⁹⁷⁻⁹⁹

A técnica de extração líquido-líquido (LLE, do inglês, *liquid-liquid extraction*) encontra muitas aplicações na determinação de elementos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas como amostras biológicas e ambientais. A LLE é baseada na solubilidade dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis, visando aumentar a sensibilidade e seletividade do método⁹⁴. Para isso, o analito deve ser extraído da amostra pela ação do solvente, fazendo com que as espécies interferentes permaneçam na fase aquosa. A eficiência desse

processo vai depender da afinidade do analito pelo solvente extrator, da proporção entre as fases e do número de extrações. Apesar da eficiência em remover os interferentes, este método de preparo de amostra demanda tempo, custo, introduz quantidades elevadas de solventes orgânicos ao ambiente, apresenta baixa seletividade, os solventes usados devem possuir alto grau de pureza, além de apresentar baixas reprodutibilidade e repetibilidade devido às várias etapas que são realizadas.¹⁰⁰

Entretanto, estudos mais recentes, têm-se focado no desenvolvimento de novos procedimentos de extração que sejam mais eficientes, rápidos, de baixo custo e que consumam menor volume de solventes orgânicos, fornecendo dados mais precisos e exatos e com razoáveis limites de detecção. Assim, uma das técnicas que tem atraído especial atenção é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*), introduzida em 2006 por Rezaee e colaboradores para pré-concentração de analitos orgânicos e inorgânicos a partir de soluções aquosas.¹⁰¹ Esta técnica baseia-se na partição dos analitos de interesse empregando-se pequenos volumes de uma mistura de solventes (dispersor e extrator). O princípio deste método é baseado na rápida injeção de uma mistura de solvente extrator e dispersor com alta miscibilidade em ambas fases, orgânica e aquosa, em uma solução da amostra. Uma solução turva, no momento da injeção é formada, contendo gotículas muito finas do solvente extrator dispersas por toda fase aquosa promovendo uma rápida extração do analito à partir dessa fase. A dispersão formada é removida por centrifugação e o solvente extrator contendo o analito é levado para análise com auxílio de uma microseringa. Entretanto, para que o analito seja retirado

da amostra através desta técnica, alguns cuidados precisam ser tomados como na escolha do solvente extrator, pois afeta a eficiência de extração, além disso, o solvente deve ser miscível no solvente dispersor e ter baixa solubilidade em água.

Entre as modalidades de extração/pré-concentração frequentemente utilizadas em procedimentos analíticos, os métodos baseados em extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), atualmente tem sido considerada como uma das mais importantes e populares modalidades de extração/pré-concentração de moléculas devido ao volume reduzido de solvente, diminuindo muito o tempo de extração, apresentando fácil regeneração da fase sólida, extraindo seletivamente o analito, além da facilidade de combinação com várias técnicas de detecção¹⁰²⁻¹⁰³, como as cromatográficas.

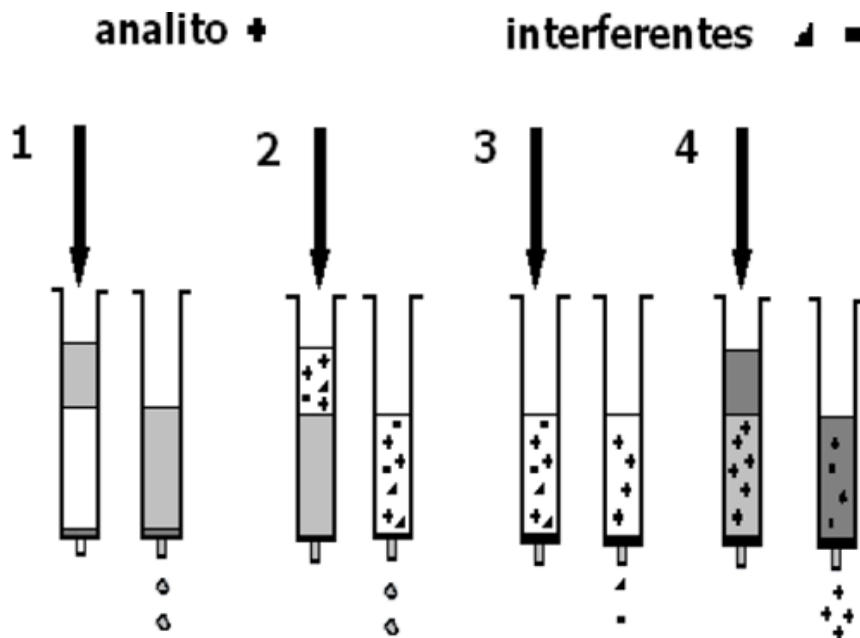
A SPE foi introduzida em meados da década de 70, e passou a ser disponível comercialmente em 1978 na forma de cartuchos descartáveis. Mas foi em 1994 que esta técnica se popularizou, quando os fabricantes inseriram no mercado cerca de 84 produtos, com inúmeras fases extratoras.¹⁰³ A SPE é uma técnica de separação sólido-líquido baseada no mecanismo de separação da cromatografia líquida clássica sendo empregada com o intuito de isolar analitos presentes em uma matriz complexa. Esta técnica, em sua forma mais simples, utiliza um pequeno tubo aberto (cartucho de extração) que contém o sorvente sólido (fase extratora sólida). Para se extrair o analito, a matriz é colocada na parte superior do cartucho e aspirada sob vácuo. Neste momento, ocorre a interação entre a fase extratora e o(s) analito(s), e posteriormente os compostos de interesse são eluídos com solvente

adequado. O analito é coletado, normalmente em frascos, em concentração adequada para análise.¹⁰⁴

Há quatro modos de operação em SPE, sendo eles o isolamento do analito e da matriz, concentração dos analitos (enriquecimento) e estocagem da amostra. No modo isolamento do analito (limpeza), isola-se o composto de interesse dos interferentes da matriz. No isolamento da matriz, o analito não é retido na fase extratora, passa direto pelo cartucho e os interferentes é que são retidos no adsorvente. No modo enriquecimento, são passados grandes volumes de amostra pelo cartucho, retendo o analito de interesse e eluindo o solvente e os interferentes. Por último, o modo estocagem da amostra é usado para transportar a amostra do local de coleta até o laboratório de análise, a fim de evitar o transporte de grandes volumes de amostra para o laboratório.¹⁰³

Existem, basicamente, quatro etapas na extração em fase sólida: a) ativação do sorvente para deixar os sítios disponíveis e condicionamento do cartucho para ajustar as forças do solvente da amostra com o solvente de eluição; b) percolação da amostra/sorção do(s) analito(s) no sorvente; c) eliminação de interferentes (*clean-up*); d) eluição/dessorção dos analitos com um pequeno volume de solvente.¹⁰³ O cartucho de extração em uma seringa plástica de polipropileno tem sido o formato mais utilizado em SPE, o qual é recheado com um adsorvente que fica retido entre dois discos de polietileno, conforme ilustra a Figura 3. Existem também cartuchos nos formatos em disco e placas, entre outros.

Figura 3. Principais etapas empregadas na Extração em Fase Sólida, operada no modo isolamento do analito. Etapas: 1. Ativação e condicionamento do adsorvente; 2. Adição da amostra; 3. Remoção dos interferentes; 4. Dessorção dos analitos (Adaptado de Lanças, 2004).¹⁰³



Atualmente, há diversos adsorventes disponíveis no mercado, destacando-se os adsorventes à base de sílicas quimicamente ligadas a grupos octadecilssilano (C_{18}) e octissilano (C_8), sendo utilizadas em diversas aplicações.¹⁰⁵ Apesar da vasta disponibilidade de adsorventes no mercado, a seletividade é baixa em amostras complexas, como a matriz alimentícia, e como consequência, os interferentes presentes na matriz são coextraídos juntamente com os analitos de interesse. Sendo assim, a escolha apropriada do adsorvente é o fator crítico para obter desempenho analítico satisfatório em procedimentos de SPE. Neste sentido, o desenvolvimento de novos materiais adsorventes para serem usados como fases extratoras em sistemas de limpeza e extração é de grande importância.

3. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS COMO EXTRATORES EM FASE SÓLIDA: MÉTODOS DE PREPARO, APLICAÇÕES, CARACTERIZAÇÃO E DESEMPENHO

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver novos adsorventes para SPE que apresentem aplicações mais seletivas, baseados no princípio biomolecular de muitos processos biológicos, como a replicação do DNA, interação antígeno-anticorpo, enzima-substrato, entre outros. Nestes sistemas, as biomacromoléculas possuem sítios receptores capazes de se ligar seletivamente a uma molécula na presença de outras com estruturas químicas análogas. Baseado no princípio da produção de anticorpos pelo sistema imunológico de vertebrados em resposta a presença de moléculas estranhas no organismo (antígeno)¹⁰⁶, estes métodos seletivos, conhecidos como ensaios de imunoafinidade, promovem a extração baseada no reconhecimento molecular.¹⁰⁷ Na prática, os anticorpos são covalentemente ligados em um adsorvente apropriado (geralmente sílica porosa) gerando o chamado imunosorvente, que é posteriormente disposto em cartuchos de extração em fase sólida ou em colunas cromatográficas.¹⁰⁸ Face às características de bioafinidade apresentada pelo anticorpo frente ao antígeno (espécie de interesse), o imunosorvente permite isolar a espécie de interesse sem efetuar qualquer interação com moléculas concomitantes, eliminando desta forma, a ocorrência de co-eluição comumente verificada durante as etapas de eluição quando se emprega adsorventes pouco seletivos como, por exemplo, a sílica modificada (C₁₈), citada anteriormente.¹⁰⁸ Apesar das características marcantes dos imunosorventes como materiais seletivos,

deve-se ressaltar algumas desvantagens dos anticorpos incluindo o elevado custo, necessidade de purificação, dificuldade de obtenção e instabilidade quando empregados em condições diferentes daquelas de seu ambiente nativo.¹⁰⁹ Além disso, a aplicação desses materiais em análises de amostras complexas é relativamente recente devido às dificuldades em sintetizar anticorpos seletivos para pequenas moléculas.

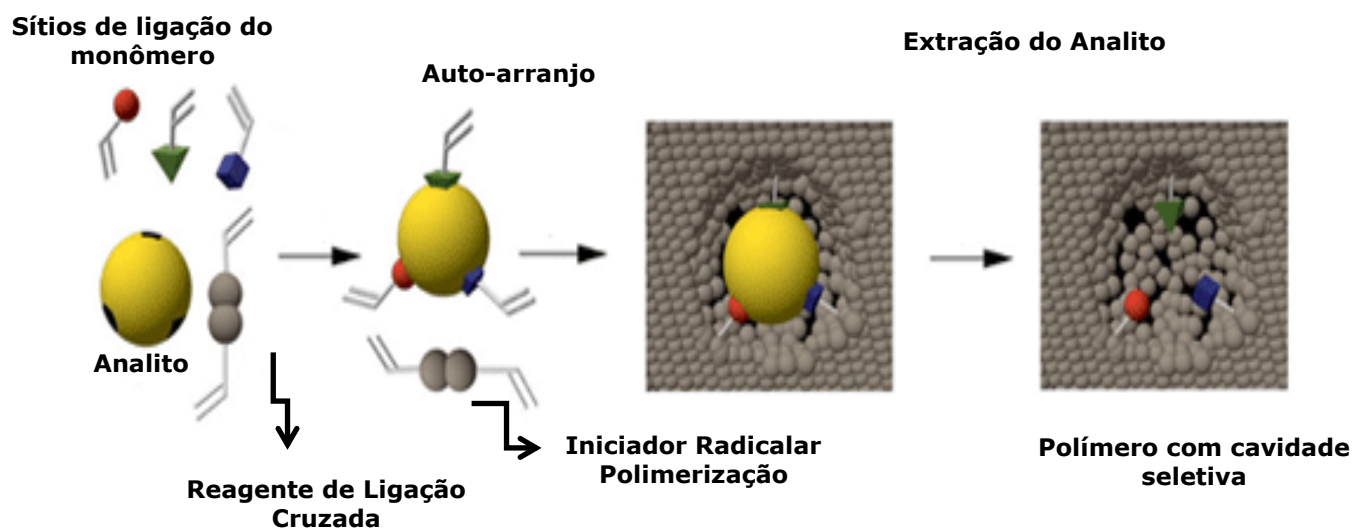
Graças ao avanço das ciências, novos e sofisticados materiais com propriedades cada vez mais surpreendentes têm possibilitado minimizar as limitações dos materiais biológicos, permitindo a concepção de materiais biomiméticos sintéticos com desempenho seletivo destacável. Estes materiais são conhecidos como polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*). Os MIP são obtidos por meio da preparação de polímeros com sítios de reconhecimentos sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um analito, o que se deve ao arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor do analito alvo.¹¹⁰

Em 1932 Mudd¹¹¹ e em 1940 Pauling¹¹² tiveram a ideia de utilizar uma molécula alvo como template (analito alvo) para se ligar seletivamente a um sítio de reconhecimento para explicar o funcionamento do sistema imunológico. Em 1942 Pauling e Campbell¹¹³ mostraram o preparo de anticorpos artificiais tendo como template moléculas de antígeno. A primeira síntese de materiais com impressão molecular baseou-se no procedimento sol-gel. O primeiro trabalho publicado mostrando a afinidade de algumas moléculas por sílica gel foi em 1949 por Dickey.¹¹⁴ Nesse trabalho, a sílica gel foi preparada através de impressão da sílica com alaranjado de metila. Foi comprovado que este material adsorvia mais alaranjado de metila, quando

comparado com o seu respectivo material controle, a sílica gel sem adição do analito.

Estes polímeros com reconhecimento molecular são polímeros sintéticos obtidos por polimerização na presença de um analito alvo a ser impresso, formando um esqueleto polimérico ao redor do futuro analito ou de uma molécula com estrutura análoga. Após a polimerização, a molécula molde que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação que são complementares em forma e tamanho do analito (Figura 4). Com esta estratégia, resulta em uma “memória” molecular no polímero, sendo apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo do analito. O processo de impressão molecular consiste em três etapas. A primeira etapa consiste em misturar o monômero, o qual contém grupos funcionais complementares aos da molécula molde, permitindo formar um complexo “monômero-molécula molde”, por meio de interações (covalentes ou não covalentes) entre os respectivos grupos funcionais complementares. Na segunda etapa, são adicionados ao meio reacional o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar de polimerização. A polimerização é induzida por meio de calor e/ou luz UV na ausência de oxigênio. Na terceira etapa é feita a remoção do analito (template) do material polimérico, deixando neste, cavidades com tamanho, forma e estrutura complementar ao analito alvo. A capacidade de reconhecimento molecular do polímero molecularmente impresso deve ser avaliada em relação a um polímero não impresso (NIP, do inglês *Non-Imprinted Polymer*). Este material controle é sintetizado da mesma maneira que o MIP, com exceção da não adição da molécula-molde.¹⁰⁵

Figura 4. Representação esquemática do processo de formação dos MIP (Adaptado de Haupt, 2001).¹¹⁵



Os monômeros funcionais podem interagir com o analito, durante a síntese polimérica, de forma covalente, não-covalente e por espaço sacrificial.¹¹⁵⁻¹¹⁶

A impressão covalente foi introduzida por Wulff e Sarchan¹¹⁷ e envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre o analito alvo e os monômeros funcionais antes da polimerização. Permite o posicionamento preciso do grupo funcional no sítio ativo sob diferentes polimerizações. O template é retirado do polímero por clivagem das ligações covalentes. Entretanto, a retirada da molécula molde após a polimerização é dificultada devido a natureza das ligações serem consideradas fortes. Devido a isto, os sítios de ligações ficam indisponíveis após a retirada do molde. Os templates impressos utilizando esse procedimento incluem galactose e frutose¹¹⁷, colesterol¹¹⁸, entre outros.

A impressão não covalente foi introduzida por Arshady e Mosbach e tem sido a mais estudada e aplicada, devido a versatilidade das interações não-

covalentes formadas, tais como ponte de hidrogênio e interações iônicas.¹¹⁹ A cinética de ligação é bastante rápida e a quebra das ligações para a retirada do molde é realizada de maneira simples. Um inconveniente seria a formação heterogênea dos sítios de ligação que se dá em função da natureza fraca das ligações não-covalentes.¹¹⁸

Hwang e colaborador compararam a capacidade máxima adsortiva entre polímeros impressos usando impressão covalente e não covalente. Para a impressão covalente os autores usaram o monômero funcional colesteril (4-vinil) fenil carbonato e para a impressão não-covalente o ácido metacrílico. Em ambas impressões foram usados como reagente de ligação cruzada o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e iniciador radicalar 2, 2'- azo-iso-butilnitrila (AIBN). O material impresso covalentemente apresentou capacidade máxima adsortiva de $36,73 \text{ mg g}^{-1}$ e o método não-covalente de $25,13 \text{ mg g}^{-1}$.¹²⁰

Santos e colaboradores desenvolveram um polímero com impressão não covalente para 4-aminofenol contendo ácido metacrílico, hemina, EGDMA, AIBN e a retirada do analito foi realizada utilizando metanol/ácido acético. A hemina foi usada como um material sintético para mimetizar o centro ativo da peroxidase, criando um polímero com impressão molecular cataliticamente ativo. O polímero revelou alta afinidade e seletividade ao analito 4-aminofenol.¹²¹

Um outro trabalho, realizado por Zyablov e colaboradores, também utilizou impressão não covalente, na determinação de glicina em solução aquosa. Os dados mostraram que o fator de impressão foi superior para

glicina quando esta foi analisada em soluções binárias contendo alanina e valina.¹²²

O preparo de MIP explorando a técnica de espaço sacrificial (“*sacrificial space*”, em inglês) foi introduzida em 1995 por Whitcombe e colaboradores, e neste procedimento a molécula molde e o monômero funcional interagem por ligações covalentes no momento da síntese, e por ligações não-covalentes no momento de re-ligação. Após a síntese, é necessária uma hidrólise para a retirada da molécula molde do sítio do MIP, permanecendo neste local, grupos ligantes capazes de interagir não-covalentemente com a molécula molde em futuras interações.¹²³ Dessa forma, foi possível associar as vantagens inerentes às metodologias de síntese covalente e não-covalente.¹²³⁻¹²⁶

Um outro trabalho que utilizou este tipo de procedimento foi desenvolvido por Wang e colaboradores, no qual foi usado para a determinação de esteroides. O material foi preparado por polimerização do colesteril carbonato 2-hidroxietil metacrilato. Após a polimerização, o carbonato foi hidrolisado para dar um local de reconhecimento não-covalente contendo um resíduo flexível de hidroxila. O polímero mostrou ser um bom adsorvente para os compostos análogos de colesterol, como progesterona.¹²⁶

3.1. Métodos de preparo dos MIP

Os MIP podem ser preparados pelos métodos em *bulk*, precipitação, suspensão e expansão em multi-etapas.

O método mais utilizado e comum de preparar materiais impressos é a polimerização em *bulk*, no qual a reação é feita em sistema homogêneo. Em

frascos selados são adicionados os reagentes: monômero, analito, reagente de ligação cruzada, solvente e iniciador radicalar. A reação deve ocorrer na ausência de oxigênio sob fluxo de N₂ ou Ar, induzida por aquecimento e/ou radiação UV. O oxigênio é retirado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar. Após a polimerização, o material polimérico resultante é moído, peneirado e lavado com solvente apropriado para retirada do analito^{105,127}, conforme mostra a Figura 4. Como neste método o material formado é rígido, este necessita ser triturado e moído, apresentando partículas com tamanhos irregulares. Ainda, no processo de trituração alguns sítios são destruídos, diminuindo a seletividade do polímero, além de apresentar estruturas desfavoráveis para rápida transferência de massa do analito para a cavidade do polímero outrora formado.

O método de precipitação é semelhante ao *bulk*, mas utiliza volumes maiores de solvente para impedir a formação de uma pasta polimérica e assim, produzir partículas com tamanhos mais uniformes e regulares com diâmetros menores que 10 µm. Durante a polimerização por precipitação, as cadeias poliméricas crescem no meio reacional e tornam-se cada vez mais insolúveis na solução. O polímero resultante é obtido na forma de pó, não necessitando da trituração.^{105,128}

No método em suspensão, primeiramente é feita a solubilização de todos os reagentes necessários para a reação, tais como monômero, analito, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar, em um solvente orgânico apolar. Na sequência, esta mistura reacional é adicionada em água contendo um agente estabilizador, a fim de evitar a coagulação das gotas dos monômeros durante o processo. Os estabilizadores podem ser polímeros

orgânicos solúveis em água, como o álcool polivinílico, ou à base de sais inorgânicos. Como os estabilizadores ficam adsorvidos como uma fina camada na superfície das gotas dos monômeros faz com que diminua a tensão interfacial entre as duas fases. A polimerização ocorre após o aquecimento do meio reacional, sob agitação, resultando em partículas poliméricas de tamanhos uniformes. Apesar desta uniformidade das partículas, o método em questão apresenta a desvantagem de algumas moléculas de água se dissolverem na mistura polimérica interferindo na interação analito-monômero, principalmente quando esta é por ligação de hidrogênio. Este método é realizado com sucesso quando a interação analito-monômero se dá por ligações hidrofóbicas e iônicas.^{105,128}

Outro método de preparo de MIP é por expansão em multi-etapas, o qual emprega partículas poliméricas com diâmetros bem definidos, as quais sofrem etapas de expansão com o monômero e o solvente antes do início da reação de polimerização do MIP. As primeiras reações envolvem etapas de expansão destas partículas com o solvente e o monômero funcional. Este procedimento não tem sido muito utilizado por se tratar de um processo laborioso que exige várias etapas de síntese para obtenção do MIP.^{105,128}

No preparo dos MIP, a escolha dos reagentes deve ser criteriosa, pois as características finais do material como superfície morfológica, tamanho de poros e densidade, dependem das interações químicas entre estas moléculas. Um dos atrativos da impressão molecular é sua aplicação a uma vasta variedade de analitos, os quais devem possuir funcionalidades que interagem com os grupos funcionais dos monômeros, devem ser estáveis e

inertes durante a polimerização e não podem interferir em eventuais quantificações da molécula molde.

A escolha do monômero é ditada pela natureza da molécula-molde. Analitos com grupos básicos interagem facilmente com monômeros ácidos como o ácido metacrílico e analitos com grupos ácidos interagem com monômeros básicos como 4-vinilpiridina. A interação analito-monômero é governada por um processo em equilíbrio. Quantidades superiores do monômero em relação ao analito (4:1) devem ser empregados com intuito de deslocar o equilíbrio, para formar maior quantidade de complexos analito-monômero. Além disso, o excesso de monômero também proporciona a interação de todos os grupos funcionais do molde, resultando na formação de sítios de ligação com alta especificidade e seletividade.^{105,128} No Quadro 1 estão reunidos os monômeros mais empregados para o preparo dos MIP. Destes, o monômero orgânico, ácido metacrílico (MAA) tem sido o monômero mais utilizado.

O iniciador radicalar é usado para dar início às reações de polimerização. Estas reações ocorrem inicialmente através da adição de radicais livres às duplas ligações presentes nos monômeros funcionais e reagentes de ligação cruzada. O iniciador radicalar mais utilizado é o 2,2' - azo-bis-isobutironitrila (AIBN, Figura 5).

A decomposição dos iniciadores radicalares devem ocorrer por termólise aquecendo a mistura reacional a aproximadamente 60°C ou por fotólise, utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio com emissão em 365 nm.¹²⁸

Quadro 1. Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP.¹⁰⁵

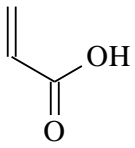
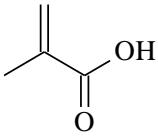
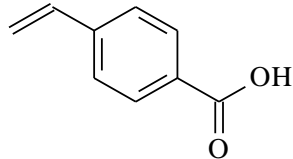
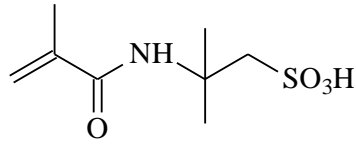
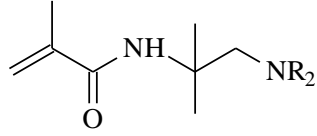
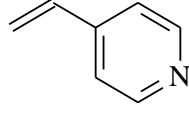
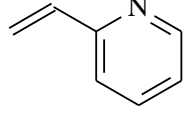
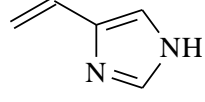
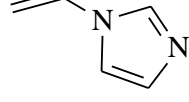
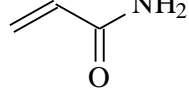
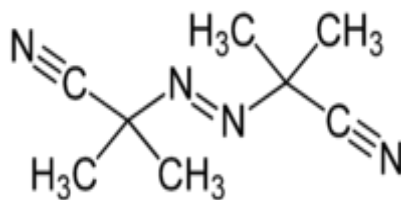
Monômero funcional	Nome do monômero	Tipo de interação com o analito
	Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido metacrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido p-vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido acrilamidossulfônico	Interação iônica
	Amino metacrilaminada	Interação iônica
	4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	4-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	1-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio

Figura 5. Estrutura química do iniciador radicalar 2,2' – azo-bis-isobutironitrila (AIBN).



A escolha do solvente na síntese do polímero impresso também é bastante importante para que os MIP apresentem características desejáveis à seletividade. O solvente deve dissolver os reagentes utilizados na síntese e não pode interferir na interação analito-monômero para não resultar na formação de sítios de ligação poucos seletivos e em pequenos números.^{105,128} Além disso, polímeros que são preparados na ausência de solventes são mais densos, enquanto que na presença de solventes os materiais são mais porosos. A natureza e o volume do solvente porogênico influencia as características morfológicas dos materiais poliméricos.

Na polimerização, as moléculas de solvente são incorporadas no interior do polímero e posteriormente são removidas gerando canais porosos. Na interação analito-monômero que se dá por meio de ligações de hidrogênio e força eletrostática, os solventes apolares com constante dielétrica baixa, tais como clorofórmio e tolueno, são os mais indicados. Também pode ser usado solvente com constante dielétrica alta, como acetonitrila, mas os polímeros obtidos podem apresentar afinidade menos acentuada em se ligar novamente ao analito. Solventes próticos como água e metanol são pouco utilizados, pois atuam como competidores no meio reacional interferindo na formação de

interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre analito e monômero.¹²⁸

A porosidade destes materiais se origina da separação de fases entre o solvente orgânico e as cadeias poliméricas que crescem durante a reação. Quando se utiliza solventes com baixa solubilidade de fase, eles se separam rapidamente e formam materiais com poros grandes e baixa área superficial. Por outro lado, solventes que apresentam alta solubilidade, separam-se mais lentamente, resultando em polímeros com maiores áreas superficiais e tamanhos de poro menores.¹²⁸⁻¹²⁹

Após o preparo do polímero e a extração do analito da cavidade seletiva, o MIP resultante terá elevada seletividade pelo analito quando o mesmo estiver num meio similar àquele empregado na síntese. O reconhecimento molecular ocorre preferencialmente no mesmo meio reacional no qual foi sintetizado.

3.2. Aplicação dos MIP como adsorventes para SPE

Dentre as aplicações, sem dúvida alguma o uso dos MIP como adsorventes para SPE (MISPE, do inglês *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*) tem sido majoritário, pois oferece alto grau de seletividade quando comparado com outros adsorventes, como a sílica modificada (C₁₈) e resinas de troca iônica.¹⁰⁵ Além do caráter seletivo, bastante similar aos sistemas naturais de reconhecimento, tais como enzima-substrato e antígeno-anticorpo, cabe salientar que os MIP possuem vantagens ainda superiores, incluindo maior estabilidade química e física, podendo ser empregados na presença de solventes orgânicos e em condições severas de pH, condições

onde as biomoléculas não podem ser usadas. O Quadro 2 reúne outras vantagens dos MIP em relação às biomoléculas.

Quadro 2. Características entre as biomoléculas naturais (enzimas, anticorpos, receptores) e os MIP.¹³⁰

BIOMOLÉCULAS	MIP
Apresentam estabilidade variável dependendo da estrutura e da fonte. Pelo geral são química, física e termicamente frágeis.	Apresentam alta estabilidade química, física e térmica e por longos períodos de tempo.
Algumas enzimas e receptores apesar de serem de fácil obtenção apresentam um elevado custo.	Geralmente são baratos e fáceis de preparar sempre que a quantidade de “template” for suficiente.
São restritas ao uso em meio aquoso. Muitas apresentam pobre desempenho em meio não aquoso. São mais susceptíveis a variação de pH.	Apresentam melhor desempenho em meio orgânico, porém também podem ser usados em meio aquoso. São menos susceptíveis a variação de pH, e portanto, são mais robustos para esta variável.
Precisam de condições especiais para armazenagem.	Podem ser estocados a seco e na temperatura ambiente.
Considerações éticas podem estar envolvidas, principalmente no caso do uso de fontes animais.	São sintéticos e não precisam de nenhuma fonte natural.
A preparação, separação, purificação e/ou liofilização consomem tempo, porém uma vez que a biomolécula é isolada, pode ser realizada uma produção reprodutível em grande escala.	A preparação dos MIPs é relativamente rápida e com boa reprodutibilidade.

O primeiro estudo empregando MISPE foi realizado por Sellergren em 1994. Neste trabalho, um MIP para extração seletiva de pentanamida foi preparado e aplicado em amostras de urina. A partir daí, outros pesquisadores sintetizaram MIP para extração de diversos compostos empregando a extração em fase sólida como técnica de extração.¹³¹

Nos últimos anos alguns trabalhos foram desenvolvidos mostrando a utilidade dos procedimentos de MISPE na extração de diferentes compostos em diversas amostras: biológicas¹³²⁻¹³⁵, água¹³⁶, solo¹³⁷, farmacêuticas.¹³⁸

Pilau e colaboradores sintetizaram através do processo sol-gel, sílica organicamente modificada e molecularmente impressa, e esta foi avaliada como sorvente seletivo para extração em fase sólida de fenobarbital. O material foi aplicado no isolamento de fenobarbital de amostras aquosas e plasma obtendo fator de impressão de 58, o qual foi calculado pela razão entre os picos das áreas dos cromatogramas de fenobarbital no MIS e seu respectivo NIS.¹³²

Thibert e colaboradores descreveram a síntese de um polímero molecularmente impresso para a extração de cocaína e seu metabólito benzoilegonina em cabelo. O MIP foi preparado usando ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, trimetilpropano trimetacrilato, AIBN e acetonitrila. O material permitiu a remoção de compostos interferentes que estão presentes no extrato de cabelo.¹³⁹

Em outro trabalho, Li et al., sintetizaram um material impresso para ser usado como adsorvente em extração em fase sólida para determinação de bisfenol A em água de torneira. O polímero foi preparado usando sílica mesoporosa e adotando uma abordagem de espaço sacrificial usando tetrabromobisfenol A que apresenta estrutura semelhante ao bisfenol A. Os resultados revelaram que o método desenvolvido foi preciso, seletivo e prático para a determinação de traços de bisfenol A em amostras de água.¹⁴⁰

Song e colaboradores usaram o procedimento MISPE para extração seletiva de clorpromazina em urina. Este medicamento veterinário é usado

como sedativo. O material apresentou alta seletividade e boas recuperações na extração de clorpromazina em urina de porco.¹⁴¹

Uma das aplicações de alta relevância é a utilização da MISPE em matrizes alimentícias. Pereira e Rath sintetizaram um material com impressão molecular para fenitrotona a partir do ácido metacrílico (monômero funcional), etileno glicol dimetacrilato (reagente de ligação cruzada ou reticulante), 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (iniciador radicalar) em diclorometano (solvente). O polímero foi aplicado ao procedimento de MISPE para determinar este analito em tomates por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O material apresentou seletividade e eficiência de extração satisfatórias demonstrando seu potencial para o preparo de amostras de tomate na determinação de resíduos de fenitrotona por HPLC.¹⁴²

Outros trabalhos fizeram uso do MISPE para determinação de colesterol em alimentos.^{133,143-144} Puoci e colaboradores sintetizaram um polímero orgânico para determinação de colesterol em queijo. Foram utilizados diferentes proporções de ácido metacrílico (MAA)/EGDMA, sendo a razão 16:25 mmol a melhor na adsorção de colesterol.¹⁴³

No Quadro 3 são mostradas outras aplicações utilizando o procedimento MISPE.

Quadro 3. Exemplos de aplicações biológicas e ambientais utilizando MISPE.

Analito	Amostra	Referência
Melanina	Leite de vaca	145
Pesticidas Organofosforados	Vegetais	146
Esteróides	Leite de cabra	147
Ibuprofeno	Urina	148
Oxitetraclina	Leite	149

O procedimento de extração quando se usa MISPE é o mesmo quando se usa a SPE convencional, compreendendo as mesmas etapas, condicionamento do cartucho, percolação da amostra, lavagem e eluição dos analitos, conforme mostrado na Figura 4.

3.3. Polímeros molecularmente impressos para extração de colesterol

A maioria dos trabalhos na literatura que utilizam MIP para extração de colesterol (CHO) descreve polímeros orgânicos sintetizados pelo método em *bulk* via polimerização radicalar de monômeros orgânicos funcionais e reagente de ligação cruzada com grupos vinílicos ou acrílicos, pois esta síntese é relativamente simples e os monômeros estão disponíveis no mercado em grande quantidade.^{118,120,126,133,143-144,150-151}

O colesterol foi primeiramente impresso por polimerização em *bulk* por Whitcombe et al. empregando o método de impressão covalente e não covalente. Neste método para impressão de colesterol, o qual apresenta uma única hidroxila, foi usado um éster de 4-vinilfenil carbonato. O monômero é ligado de forma covalente à molécula molde, e esta ligação sofre clivagem hidrolítica, com a perda de dióxido de carbono, resultando em um sítio de reconhecimento que interage com o analito através de ligação de hidrogênio.¹²³

Shi e colaboradores sintetizaram um polímero orgânico para colesterol pelo método *bulk*, através da estratégia de impressão não covalente e aplicou o material em amostras biológicas. Neste trabalho os autores compararam diferentes volumes de solvente porogênico na adsorção de colesterol. A

maior capacidade máxima adsorviva de 17,30 mg de colesterol adsorvido por grama de material foi obtida utilizando 8 mL da mistura de solventes porogênicos clorofórmio:tolueno 1:7, v/v.¹³³

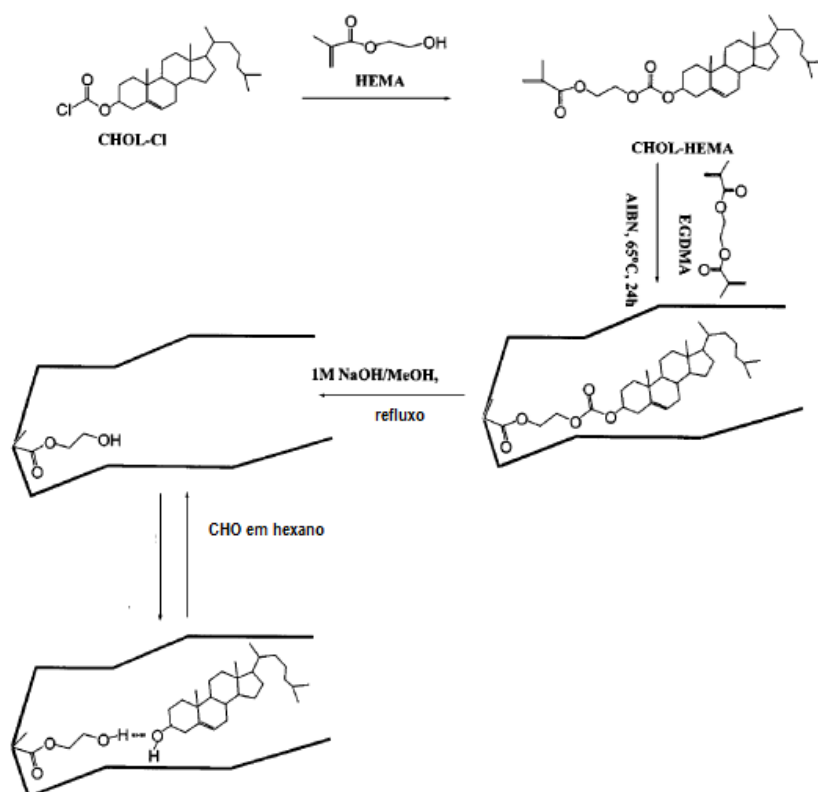
Um material orgânico aplicado para quantificação de colesterol em queijo foi sintetizado por Puoci e colaboradores. Foi utilizado o método *bulk* e estratégia de síntese por impressão não covalente. Os autores estudaram diferentes proporções molares do monômero orgânico ácido metacrílico (MAA) e do reagente de ligação cruzada EGDMA. A melhor proporção de MAA/EGDMA foi 16:25 mmol, resultando na melhor adsorção de colesterol.¹⁴³

Hwang & Lee produziram materiais orgânicos utilizando o método em *bulk* e as duas estratégias de impressão molecular, covalente e não-covalente, e compararam as capacidades máximas adsorvivas destes dois polímeros. Na estratégia de síntese covalente foram utilizados colesteril (4-vinil)fenil carbonato, EGDMA e AIBN. Para a estratégia por impressão não-covalente foram utilizados ácido metacrílico, EGDMA e AIBN. A melhor capacidade máxima adsorviva de 36,73 mg g⁻¹ foi obtida pela estratégia de síntese covalente. Pelo método de impressão não-covalente a capacidade máxima adsorviva foi de 25,13 mg g⁻¹.¹²⁰

Outro polímero orgânico usado para colesterol, utilizou a estratégia de síntese de espaço sacrificial.¹²⁶ O polímero impresso para colesterol foi preparado polimerizando colesteril 2-hidroxietil metacrilato carbonato. Após a polimerização, o carbonato é hidrolisado, usando NaOH/metanol, liberando CO₂, para dar um sítio de reconhecimento não-covalente tendo um resíduo de hidroxila remanescente. Este grupo remanescente no sítio formado após a

hidrólise, é capaz de se religar à molécula molde por meio de interações não-covalentes, como ligação de hidrogênio (Figura 6). Este material obteve 113,24 mg g⁻¹ de capacidade máxima adsortiva.

Figura 6. Síntese de um polímero para colesterol usando ligação covalente durante a impressão e ligação não covalente durante a adsorção¹²⁶.



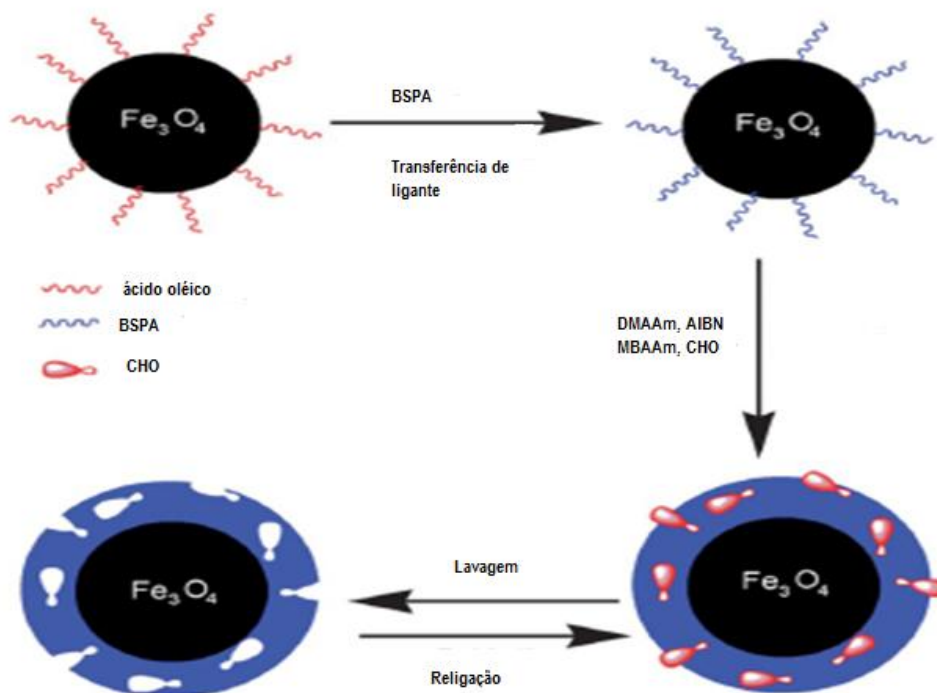
Yavuz e colaboradores sintetizaram um polímero para colesterol utilizando o método em *bulk* e estratégia de impressão não-covalente. Os reagentes utilizados foram N-metil-metacrilóil-(L)-tirosina metilester (MAT), hidroxietil metacrilato (HEMA), AIBN e EGDMA. A capacidade máxima adsortiva foi de 23,10 mg g⁻¹.¹¹⁸

Um polímero orgânico sintetizado pelo método de precipitação foi desenvolvido por Ciardelli e colaboradores. Neste método o diferencial é o volume maior de solvente porogênico utilizado na síntese. Foram utilizados ácido metacrílico, trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), AIBN e diferentes solventes. A melhor capacidade máxima adsortiva, $115,40 \text{ mg g}^{-1}$, foi conseguida com 70,0 mL de etanol. Os autores justificam a melhora na adsorção de colesterol devido a polimerização em precipitação melhorar a morfologia das partículas dos MIP obtendo micro ou nanoesferas com tamanho e forma regulares capazes de se ligar efetivamente à molécula molde devido a alta razão superfície/volume.¹⁵¹

Zengin e colaboradores desenvolveram um polímero de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético molecularmente impresso para colesterol usando o método de dispersão. Primeiramente, preparou-se o Fe_3O_4 através de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ácido oléico. A superfície de Fe_3O_4 é modificada com 3-(benzilsulfaniltiocarbonilsulfanil)ácido propiônico (BSPA), o qual fica ancorado na superfície de Fe_3O_4 por uma reação de simples troca de ligante. O produto final é separado e purificado por coleta magnética e lavado com dioxano e diclorometano, seco a vácuo e guardado no escuro a 4°C . A polimerização ocorreu usando dimetilacrilamida (DMAAm) como monômero funcional e N,N-metileno(bis)acrilamida (MBAAm) como agente de ligação cruzada, AIBN como iniciador radicalar e tolueno como solvente porogênico (Figura 7). A dispersão foi esfriada com gelo e purgado N_2 . O MIP de nanopartículas supermagnéticas de Fe_3O_4 obtido foi magneticamente separado com acetonitrila e lavado com etanol. O CHO foi removido com $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{HAc}$ (3:1:1, v/v/v). A capacidade máxima

adsortiva deste material foi de 20,10 mg g⁻¹. Este material foi aplicado em amostras alimentícias como gema, leite, carne e também em soro humano.¹⁴⁴

Figura 7. Desenho esquemático para a superfície do polímero molecularmente impresso com nanopartículas superparamagnéticas de Fe₃O₄.¹⁵⁴.



Uma outra estratégia de síntese é o processo sol-gel no desenvolvimento de polímeros inorgânicos. Esta técnica foi descoberta em 1800 e citada por Ebelmen quando ele obteve sílica gel à partir da interação da sílica com a umidade do ar.¹⁵² Um século depois, esta técnica foi utilizada por uma indústria de vidro alemã que descobriu a viabilidade no preparo de vidros utilizando reações controladas de hidrólise e condensação.

Posteriormente, este processo passou a ser usado no desenvolvimento de polímeros, sensores, condutores e em eletroquímica.

Para formação do polímero impresso via processo sol-gel, primeiramente a reação deve ocorrer entre o analito e o grupo seletivo do precursor funcional. Na sequência, o tetraetoxissilano (TEOS), o agente reticulante mais usado é responsável pela formação da rede polimérica, e os grupos trimetoxi do precursor funcional são hidrolisados em temperatura controlada. Em seguida, ocorre a autocondensação dos compostos hidrolisados seguido de copolimerização, o que resulta numa cadeia polimérica inorgânica que contém na cavidade seletiva o analito ligado aos sítios do precursor funcional. Podem ser usados catalisadores ácidos ou básicos nesta síntese. Na síntese que se utiliza catalisadores ácidos leva a formação de partículas com tamanhos menores, com maior área superficial e menor agregação, e o polímero resultante apresenta então estabilidade reduzida e estrutura microporos. Em catálise básica, as estruturas resultantes são mesoporosas, as partículas apresentam pequena área superficial e alta agregação. Como constatado, os polímeros inorgânicos vão se diferenciar dos orgânicos no que diz respeito aos diferentes monômeros empregados e também a estratégia de síntese, pois não é necessário usar iniciadores radicalares.¹⁵³

Alguns trabalhos na literatura relatam o desenvolvimento de polímeros inorgânicos para colesterol. Fujiwara et al. reportaram a síntese de sílica preparada via sol-gel utilizando TEOS, ácido acético anidro e colesterol como molécula-molde em meio orgânico para detecção de hormônios esteroides.

Os autores observaram que esta sílica adsorveu os hormônios esteroides como progesterona.¹⁵⁴

Em outro trabalho, Soares et al. desenvolveram um adsorvente sólido por impressão molecular à partir de um complexo de β -ciclodextrina/colesterol moldado num polímero de sílica para a separação de colesterol da sua solução. O material apresentou capacidade máxima adsortiva de 76,5 mg de colesterol por grama de adsorvente.¹⁵⁵

Hsu & Yang sintetizaram um MIP para colesterol via sol-gel usando colesteril propil carbamato trietoxisilano e TEOS como monômeros e agente de ligação cruzada, respectivamente. Segundo os autores, o material apresentou alta seletividade para colesterol quando comparado a outros hormônios esteroides.¹⁵⁶

Gupta & Kumar reportaram a síntese e caracterização de materiais poliméricos molecularmente impressos por sol-gel para colesterol e este foi estimado baseado no método colorimétrico usando o reagente Liebermann Burchard (L-B). De acordo com os autores, o estudo apresentou problemas associados com a impressão de colesterol, bem como mostrou a importância das propriedades estruturais do material. Os autores demonstraram também que na impressão molecular, a solubilidade do template na mistura de polimerização, bem como a extração da molécula molde da matriz polimérica, são fatores importantes que afetam a adsorção/dessorção do analito.¹⁵⁷

Estes polímeros molecularmente impressos inorgânicos preparados pelo processo sol-gel apesar da alta afinidade e seletividade exibem pouca acessibilidade do analito alvo ao sítio de ligação devido aos microporos que compõem o material, assim a cinética de adsorção/dessorção torna-se

desfavorável devido à lenta transferência de massa do analito, além destes materiais mostrarem que não há estabilidade química em uma ampla faixa de pH, devido as características da matriz inorgânica baseada em siloxanos.¹⁵⁷⁻
¹⁵⁸ Conforme já mencionado, os MIP orgânicos quando sintetizados pelo método de polimerização em bulk, apresentam estruturas poliméricas desfavoráveis para a rápida transferência de massa do analito para o polímero, resultando em uma cinética lenta de retenção.¹⁰⁵ Além disso, polímeros orgânicos em geral, apresentam baixa capacidade máxima adsortiva.

Face as características intrínsecas dos polímeros orgânicos e inorgânicos, tem-se desenvolvido polímeros híbridos orgânicos-inorgânicos, os quais são desenvolvidos através da combinação de compostos orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para o desenvolvimento de novos materiais multifuncionais.¹⁵⁸ Nestes materiais, os monômeros orgânicos tem a função de controlar o grupo ativo da cavidade do analito, além da flexibilidade e processabilidade, enquanto o precursor inorgânico é responsável pelas estabilidades térmicas e químicas e também usado a fim de melhorar as características morfológicas do material, esperando-se assim, uma capacidade máxima adsortiva maior e área superficial específica grande.

Estes materiais são de interesse comercial devido às suas propriedades mecânicas, óticas e térmicas, podendo formar materiais cujas propriedades vão diferir daquelas individuais, com os componentes isolados.

Os materiais híbridos podem ser preparados pela incorporação física dos constituintes, pelas ligações químicas entre os componentes orgânicos e

inorgânicos e também preparados pela combinação dos dois tipos de interações física e química.

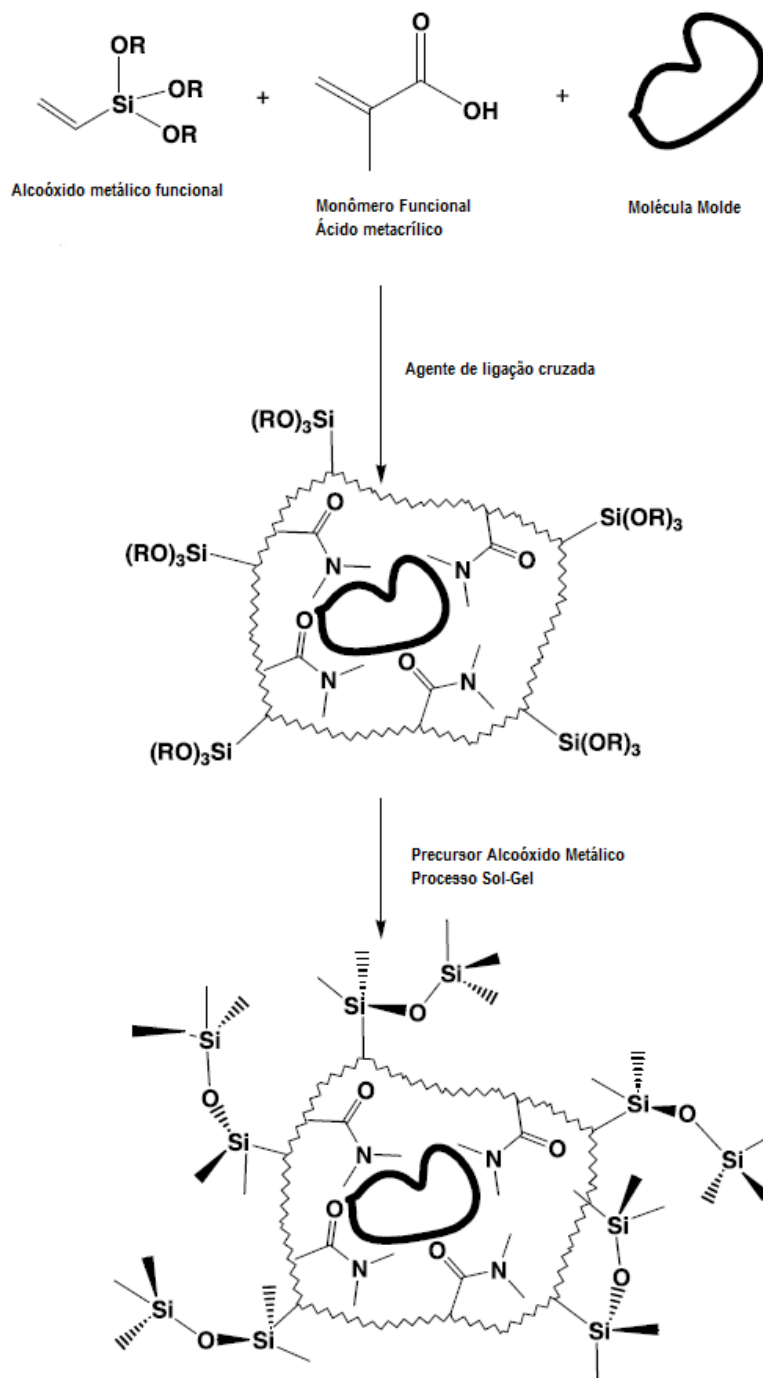
A síntese destes polímeros híbridos via sol-gel tem sido o processo mais utilizado. Neste processo são usados os precursores funcionais como 3-mercaptopropiltrimetoxissilano ou 2-aminoetilamina-3-propiltrimetoxissilano e o agente reticulante TEOS. Nesta síntese, o grupo alcoóxido metálico do precursor inorgânico reage com o TEOS por meio de reações de condensação e policondensação, formando assim a matriz polimérica. A fração orgânica constituída dos grupos amino (-NH₂) e mercapto (-SH) dos precursores funcionais não é polimerizável, sendo responsável pela formação da cavidade seletiva.¹⁵⁸

Os polímeros híbridos impressos também podem ser preparados por meio de monômeros orgânicos e alcoóxidos metálicos contendo grupos vinílicos, os quais são conhecidos como agentes de acoplamento, como mostra a Figura 8¹⁵³. Estes materiais, quando comparado aos demais polímeros híbridos, permitem unir num mesmo material as propriedades orgânicas e inorgânicas, sendo, portanto, mais promissores no preparo de polímeros híbridos impressos.¹⁵⁹

Apesar das vantagens mencionadas para estes materiais, não há relatos disponíveis na literatura sobre polímeros híbridos molecularmente impressos para a extração de colesterol e ainda há poucos relatados para outros analitos. Lin e colaboradores sintetizaram um copolímero de poli (metacrilamida)-co-(vinil trimetoxissilano) e poli (ácido polimetacrílico)-co-(vinil trimetoxissilano) para a extração de cafeína.¹⁶⁰ Lv e colaboradores sintetizaram um material híbrido molecularmente impresso de poli(ácido

metacrílico)-silica usando a técnica sol-gel para a extração seletiva de oxitetraciclina (antibiótico) em amostras de leite.¹⁴⁹

Figura 8. Síntese de um polímero híbrido orgânico-inorgânico impresso através de monômero orgânico e alcoóxido metálico.¹⁵³



3.4. Caracterização dos polímeros molecularmente impressos

3.4.1. Cinética de adsorção

A cinética de adsorção é um importante dado para entender o mecanismo da adsorção e para avaliar o desempenho dos adsorventes¹⁶¹. Assim, o tempo de equilíbrio está diretamente ligado à capacidade máxima que um adsorvente pode reter um adsorvato. A quantidade máxima adsorvida (Q_e) é calculada de acordo com a equação (1):

$$Q_e = (C_0 - C_e) \cdot V/m \quad (1)$$

onde C_0 é a concentração inicial (mg L^{-1}) de analito, C_e a concentração de analito no equilíbrio (mg L^{-1}), V corresponde ao volume da solução do analito em litros (L) e m a massa do polímero em gramas (g). A interpretação do fenômeno de cinética de adsorção do analito sobre a superfície dos polímeros é realizada aplicando os dados experimentais aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (equação 2), pseudo-segunda ordem (equação 3), Elovich (equação 4) e Difusão Intrapartícula (equação 5).

$$\log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad (2)$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad (3)$$

$$Q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t \quad (4)$$

$$Q_t = k_{id} t^{1/2} + C \quad (5)$$

Os modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem são caracterizados pela taxa de adsorção k que envolve as variáveis Q_e , a qual corresponde a quantidade de espécies adsorvidas no equilíbrio (mg g^{-1}) e Q_t a adsorção relacionada ao tempo estudado. O modelo de pseudo-primeira ordem reconhece que a taxa de ocupação dos locais de adsorção é proporcional ao número de locais não ocupados, descreve que o adsorbato liga-se a apenas um único sítio ativo na superfície do adsorvente e as interações que ocorrem entre o adsorbato e o adsorvente é de natureza física.¹⁶²⁻¹⁶³ O modelo de pseudo-segunda ordem descreve que a adsorção deve ser de natureza química, envolvendo mais do que um sítio ativo com diferentes energias de ligação, enquanto que a taxa de ocupação dos sítios de adsorção é proporcional ao quadrado do número de locais desocupados.¹⁶⁴

O modelo de Elovich, de maneira semelhante ao de pseudo-segunda ordem, considera que a cinética de adsorção ocorre por quimissorção¹⁶⁵, onde Q_t é a quantidade de analito adsorvido (mg g^{-1}) no equilíbrio no tempo t (min), α é a taxa de adsorção inicial ($\text{min}^{-1} \text{mg g}^{-1}$) e β é a relação entre o grau de cobertura da superfície e a energia de ativação envolvida na quimissorção (g mg^{-1}). Neste modelo é possível também visualizar o envolvimento de duas fases no processo de adsorção: a primeira relata a adsorção de adsorbato nos sítios externos disponíveis e a segunda é atribuída à difusão lenta dentro e fora dos poros.¹⁶⁶ A presença de segmentos multi-lineares no modelo de

Elovich pode ser usada como indicador da presença de diferentes locais de ligação.^{164,167}

Além do modelo de Elovich, o modelo de difusão intrapartícula também é utilizado para descrever a cinética de adsorção. Este último tem sido amplamente utilizado para verificar a influência da resistência à transferência de massa na ligação de adsorbato ao adsorvente.

No modelo de difusão intrapartícula, a variável k_{di} corresponde ao coeficiente de difusão intrapartícula ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$), Q_t a quantidade de moléculas adsorvidas em mg g^{-1} no tempo t em minutos e C é a constante referente à resistência à difusão (espessura de cada limite) em mg g^{-1} .¹⁴ Quando Q_t (adsorção, a qualquer momento, mg g^{-1}) versus a raiz quadrada do tempo apresenta somente um segmento linear, enquanto que o parâmetro C (constante relacionada a espessura da camada limite) é muito baixo (quase zero), a taxa de adsorção é dependente da difusão intrapartícula. No entanto, quando se apresenta segmentos multi-lineares, o processo de adsorção envolve mais do que uma única etapa cinética (ou taxa de adsorção).¹⁶⁸ A primeira etapa linear está relacionada com o processo de difusão externa limitada pela camada limite, por conseguinte, é a fase de adsorção mais rápida. A segunda etapa é atribuída a difusão intrapartícula dentro dos poros que envolve um processo lento. A terceira etapa linear pode ser considerada como a difusão através de poros menores que envolve um processo mais lento, o qual é seguido pelo estabelecimento do equilíbrio.

3.4.2. Isotermas de adsorção

Após o estudo cinético, isotermas de adsorção são construídas com o objetivo de encontrar a relação entre a quantidade de adsorbato adsorvido pelo sorvente (Q_{eq}) e a concentração de adsorbato remanescente na solução depois do sistema atingir o equilíbrio (C_{eq}), sob o aumento da concentração do analito. Com os modelos de adsorção isotérmicos é possível obter a capacidade máxima de adsorção de adsorbato (em mg) por grama de sorvente e na maioria das vezes, estes modelos inferem informações sobre mecanismo de adsorção, a presença de diferentes sítios de ligação e afinidade do sorvente.¹⁶⁹ Para obter estes dados, faz-se necessária a construção das isotermas, aplicando aos dados experimentais, os modelos não lineares de isotermas de Langmuir, Freundlich e modelo duplo de Langmuir-Freundlich, a fim de prever o tipo de interação sorvente/adsorbato.

O modelo de adsorção de Langmuir baseia-se na suposição que a adsorção máxima corresponde à monocamada saturada de moléculas de soluto na superfície do sorvente, sem que haja qualquer interação lateral entre as moléculas adsorvidas.¹⁶⁹ As expressões que representam os modelos estão apresentadas na equação 6. Na equação de Langmuir b representa a adsorção máxima (mg g^{-1}), Q_{eq} é a quantidade adsorvida no equilíbrio (mg g^{-1}), C_{eq} a concentração do adsorbato no equilíbrio (mg L^{-1}) e k_L é constante do modelo (L mg^{-1}) equivalente à constante de equilíbrio químico em reações.

$$Q_{eq} = k_L b C_{eq} / (1 + k_L C_{eq}) \quad (6)$$

O modelo de isoterma de Freundlich descreve o equilíbrio em superfícies heterogêneas não assumindo a capacidade de monocamada, a adsorção ocorre em multicamadas com interação entre as moléculas de adsorbato¹⁷⁰, considerando-se que os sítios de adsorção possuem energias de adsorção diferentes, que apresentam variação em função da cobertura da superfície¹⁸, onde Q_{eq} é a quantidade do adsorbato adsorvida no equilíbrio (mg g^{-1}), C_{eq} a concentração do adsorbato no equilíbrio (mg L^{-1}) e k_f (L mg^{-1}) é a constante de Freundlich, relacionada a capacidade de adsorção e n representa o fator de heterogeneidade (equação 7).

$$Q_{eq} = k_F C_{eq}^{1/n} \quad (7)$$

O modelo duplo de Langmuir-Freundlich originou-se da combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich, representado pela equação 8, onde Q_{eq} é a quantidade adsorvida de analito no equilíbrio (mg g^{-1}), C_{eq} é a concentração do analito no equilíbrio (mg L^{-1}), k_1 e k_2 são as constantes de Langmuir-Freundlich (L mg^{-1}), b_1 e b_2 é a capacidade máxima de adsorção em cada sítio (mg g^{-1}) e n é o parâmetro de heterogeneidade. Utilizando baixa concentração do adsorbato, esse modelo é efetivamente reduzido ao modelo de Freundlich, considerando a adsorção em multicamadas, enquanto em altas concentrações segue o modelo de Langmuir, considerando a existência de um ponto de saturação.¹⁷¹ O modelo de Langmuir-Freundlich para dois sítios adsorptivos admite que a adsorção ocorre em sítios homogêneos e heterogêneos na superfície do material, na qual em concentrações baixas a

adsorção ocorre preferencialmente com sítios de maior energia e em altas concentrações a adsorção passa a ocorrer em outros sítios.

$$Q_{eq} = \frac{b_1(k_1C_{eq})^{n_1}}{1+(k_1C_{eq})^{n_1}} + \frac{b_2(k_2C_{eq})^{n_2}}{1+(k_2C_{eq})^{n_2}} \quad (8)$$

3.5. Avaliação do desempenho seletivo do MIP

Para avaliar o efeito de impressão dos MIP em relação ao analito alvo são realizados estudos de adsorção de soluções contendo o analito e os interferentes. Os experimentos são realizados empregando os MIP, bem como os NIP (polímero sem impressão molecular), onde uma quantidade dos polímeros é agitada com a solução contendo o analito e interferentes.

Com base nestes experimentos, são determinados os parâmetros relacionados ao desempenho da seletividade do adsorvente, tais como coeficiente de distribuição (K_d), coeficiente de seletividade (k) e coeficiente de seletividade relativo (k'). O coeficiente de distribuição do analito e interferente é calculado a partir da equação 9:

$$K_d = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right] \times \frac{V_s(\text{mL})}{\text{massa do MIP (g)}} \quad (9)$$

Onde C_i , C_f e V_s representam a concentração inicial, final e o volume da solução, respectivamente. O coeficiente de seletividade é definido como a relação entre o coeficiente de distribuição para os analitos e o coeficiente de distribuição para os interferentes. Para fazer a comparação dos valores de k entre o polímero impresso e o polímero controle, ou seja, o coeficiente de

seletividade relativo (k'), a equação 10 é empregada. Os valores de k' , refletem a magnitude do efeito de impressão sobre o MIP. Esta equação permite uma estimativa do efeito da impressão na seletividade.

$$k' = \frac{K_{\text{Impresso}}}{K_{\text{Sem impressão}}} \quad (10)$$

A comparação do coeficiente de seletividade do MIP com o correspondente polímero controle (NIP) revela que razões acima de 1 confirmam o efeito de impressão química originado no MIP.¹⁵⁸

4. REFERÊNCIAS

1. Souza Filho, A. G. D.; Fagan, S. B. Funcionalização de nanotubos de Carbono. *Quím. Nova*, v. 30, p.1695-1703, 2007.
2. Jorio, A.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S. *Carbon Nanotubes: New topics in the synthesis, structure, properties and applications*. Published by Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
3. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v. 354, p.56-58, 1991.
4. Day, L.; Mau, A. W. H. Controlled Synthesis and Modification of Carbon Nanotubes and C60: Carbon Nanostructures for Advanced Polymeric Composite Materials. *Adv. Mater.*, v. 13 p. 899, 2001.
5. Saito, Y.; Nakahara, T.; Uemura, S. Growth Conditions of Double-Walled Carbon Nanotubes in Arc Discharge. *J. of Phys. Chem. B*, v. 107, p.931-934, 2003.
6. Zhao, X.; Ohkohchi, M.; Inoue, S.; Susuki, T.; Kadoya, T.; ANDO, Y. Large scale purification of single-wall carbon nanotubes prepared by electric arc Discharge. *Diamond and Related Materials*, v. 15, p.1098-1102, 2006.
7. Zhang, Y.; Iijima, S. Formation of single-wall carbon nanotubes by laser ablation of fullerenes at low temperature. *Appl. Phys. Letters*, v. 75, p.3087-3089, 1999.
8. Scott, C. D.; Arepalli, S.; Nikolaev, P.; Smalley, R. E. Growth mechanisms for single-wall carbon nanotubes in a laser-ablation process. *Appl. Phys. A: Materials Science & Processing*, v. 72, p.573-580, 2001.
9. Bustero, I.; Ainara, G.; Isabel, O.; Roberto, M.; Inés, R.; Amaya, A. Control of the Properties of Carbon Nanotubes Synthesized by CVD for Application in Electrochemical Biosensors. *Microchim. Acta*, v.152, p. 239-247, 2005.
10. Cassell, A. M.; Raymakers, J. A.; Kong, J.; Dai, H. Large Scale CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. B*, v. 103, p.6484-6492, 1999.
11. Hiraoka, T.; Kawakubo, T.; Kimura, J.; Taniguchi, R.; Okamoto, A.; Okazaki, T.; Sugai, T.; Ozeki, Y.; Yoshikawa, M.; Shinohara, H. Selective synthesis of double-wall carbon nanotubes by CCVD of acetylene using zeolite supports. *Chem. Phys. Letters*, v. 382, p.679-685, 2003.

12. Sugai, T.; Yoshida, H.; Shimada, T.; Okazaki, T.; Shinohara, H.; Bandow, S. New Synthesis of High-Quality Double-Walled Carbon Nanotubes by High-Temperature Pulsed Arc Discharge. *Nano Letters*, v. 3, p.769-773, 2003.
13. Dresselhaus, M. S. D. G.; Jorio, A. *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. Springer, 2008.
14. Jorio, A.; Fantini, C.; Pimenta, M. A.; Heller, D. A.; Strano, M. S.; Dresselhaus, M. S. D. G.; Oyama, Y.; Jiang, J.; Saito, R. Carbon nanotube population analysis from Raman and photoluminescence intensities. *Appl. Phys. Letters*, v. 88, 023109, 2006.
15. Dai, H. *Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties*. *Acc. Chem. Res.*, v. 35, p.1035-1044, 2002.
16. Merkoçi, A. *Carbon Nanotubes in Analytical Sciences*. *Microchim. Acta*, v. 152, p. 157-174, 2006.
17. Rivas, A. G.; Rubianes, M. D.; Pedano, N. F.; Ferreyra, N. F.; Luque, G. L.; Rodriguez, M. C.; Miscoria, S. A. Carbon Nanotubes Paste Electrodes. A new alternative for the development of electrochemical sensors. *Electroanalysis*, v. 19, p. 823 - 831, 2007.
18. Jacobs, C. B., Peairs, M. J., Venton, B. J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Anal. Chim. Acta*, v. 662, p. 105–127, 2010.
19. Aguí, L., Yáñez-Sedeño, P., Pingaron, J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta*, v. 622, p. 11–47, 2008.
20. Mazloum-Ardakani, M.; Sheikh-Mohseni, M. A.; Abdollahi-Alibeik, M.; Benvidi, A. Electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine, paracetamol and folic acid by a nanostructured mesoporous material. *Sen. Actuators B: Chemical*, v. 172, p.380-386, 2012.
21. Jeevagan, A. J.; John, S. A. Electrochemical sensor for guanine using a self-assembled monolayer of 1,8,15,22-tetraaminophthalocyanatonickel(II) on glassy carbon electrode. *Anal. Biochemistry*, v. 424 p. 21–26, 2012.
22. Goyal, R. N.; Singh, S. P. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and adenosine using a single walled carbon nanotube–modified glassy carbon electrode. *Carbon*, v. 46, p.1556-1562, 2008.

23. Ionescu, M. I.; Yong, Z.; Ruying, L.; Xueliang, S.; Hakima, A.-R.; Lussier, L.-S. Hydrogen-free spray pyrolysis chemical vapor deposition method for the carbon nanotube growth: Parametric studies. *Applied Surface Science*, v.257, p. 6843–6849, 2011.
24. Menezes, V. M. de; Rocha, A. R.; Zanella, I.; Mota, R.; Fazzio, A.; Fagan, S. B. Electronic transport properties of ascorbic acid and nicotinamide adsorbed on single-walled carbon nanotubes. *Chem. Phys. Letters*, v. 506, p. 233–238, 2011.
25. Lawrence, N. S.; Deo, R. P.; Wang, J. Electrochemical determination of hydrogen sulfide at carbon nanotube modified electrodes. *Anal. Chim. Acta*, v. 517, p. 131–137, 2004.
26. Banks, C. E.; Crossley, A.; Salter, C.; Wilkins, S. J.; Compton, R. G. Carbon nanotubes contain metal impurities which are responsible for the "electrocatalysis" seen at some nanotube-modified electrodes. *Angewandte Chemie*, v. 45, p. 2533–2537, 2006.
27. Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A.; Kallitsis, I.; Galiotis, C. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, v. 46, p.833-840, 2008.
28. Kyotani, T.; Nakazaki, S.; Xu, W.-H.; Tomita, A. Chemical modification of the inner walls of carbon nanotubes by HNO₃ oxidation. *Carbon*, v. 39, p.782-785, 2001.
29. Liu, M.; Yang, Y.; Zhu, T.; Liu, Z. Chemical modification of single-walled carbon nanotubes with peroxytrifluoroacetic acid. *Carbon*, v. 43, p.1470-1478, 2005.
30. Vashist, S. K.; Zheng, D.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H. T.; Sheu, F-S. Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications. *Biotechnol. Adv.*, v. 29, p. 169 – 188, 2011.
31. Balasubramanian, K.; Burghard, M. Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small*, v. 2, p. 180 –192, 2005.
32. Zhao, Y.-L.; Stoddart, J. F. Noncovalent Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Acc. Chem. Res.*, v.42, 1161–1171, 2009.
33. Trojanowicz, M. Analytical applications of carbon nanotubes. *Trends in Anal. Chem.*, v. 25, p. 480-489, 2006.

34. Merkoçi, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Pérez, B.; del Valle, M.; Alegret, S. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. *Trends in Anal. Chem.*, v. 24, p. 826-838, 2005.
35. Wang, S.-F.; Xu, Q. Electrochemical parameters of ethamsylate at multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, v. 70, p. 296-300, 2007.
36. Bi, H.; Li, Y.; Liuc, S.; Guo, P.; Wei, Z.; Lv, C.; Zhang, J.; Zhao, X. S. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid: The effect of functional groups. *Sen. Actuators B*, v. 171– 172, p. 1132– 1140, 2012.
37. Gupta, V. K.; Jain, A. K.; Shoora, S. K. Multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for the simultaneous determination of ascorbic acid and caffeine. *Electrochim. Acta*, v. 93, p. 248– 253, 2013.
38. Rahemi, V.; Garrido, J. M. P. J.; Borges, F.; Brett, C. M. A.; Garrido, E. M. P. J. Electrochemical Determination of the Herbicide Bentazone Using a Carbon Nanotube b-Cyclodextrin Modified Electrode. *Electroanalysis*, v. 25, p. 2360 – 2366, 2013.
39. Adams, R. N. Carbon paste electrodes. *Anal. Chem.* v. 30, p. 1576, 1958.
40. Crespilho, F. N.; Rezende, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos úmicos: Estudo e determinação de metais em meio aquoso. *Quim. Nova*, v. 27, p. 964-969, 2004.
41. Gorton, L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis*, v. 7, p. 23-45, 1995.
42. Švancara, I.; Vytrás, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J. Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis*, v. 21, p. 7- 28, 2009.
43. Švancara, I.; Walcarius, A.; Kalcher, K.; Vytrás, K. Carbon paste electrodes in the new millennium. *Cent. Eur. J. Chem.*, v. 7, p. 598-656, 2009.

44. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quim. Nova*, v. 25, p. 1012-1021, 2002.
45. Franzoi, A. C.; Brondani, D.; Zapp, E.; Moccelini, S. K.; Fernandes, S. C.; Vieira, I. C. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. *Quim. Nova*, v. 34, p.1042-1050, 2011.
46. Abbar, J. C.; Malode, S. J.; Nandibewoor, S. T. Electrochemical determination of a hemorheologic drug, pentoxifylline at a multi-walled carbon nanotube paste electrode. *Bioelectrochemistry*, v. 83, p. 1–7, 2012.
47. Duarte, E. H.; Kubota, L. T.; Tarley, C. R. T. Carbon Nanotube Based Sensor for Simultaneous Determination of Acetaminophen and Ascorbic Acid Exploiting Multiple Response Optimization and Measures in the Presence of Surfactant. *Electroanalysis*, v. 24, p. 1 – 11, 2012.
48. Duarte, E. H.; dos Santos, W. P.; Hudari, F. F.; Neto, J. L. B.; Sartori, E. R.; Dall'Antonia, L. H.; Pereira, A. C.; Tarley, C. R. T. A highly improved method for sensitive determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations using an unmodified carbon nanotube electrode in the presence of sulfuric acid. *Talanta*, v.127, p. 26–32, 2014.
49. Hudari, F. F.; Duarte, E. H.; Pereira, A. C.; Dall'Antonia, L. H.; Kubota, L.T.; Tarley, C. R. T. Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of surfactant using MWCNT paste electrode. *J. Electroanal. Chem.*, v. 696, p. 52–58, 2013.
50. Mazloun-Ardakani, M.; Beitollahi, H.; Ganjipour, B.; Naeimi, H.; Nejati, M. Electrochemical and catalytic investigations of dopamine and uric acid by modified carbon nanotube paste electrode. *Bioelectrochemistry*, v. 75, p. 1-8, 2009.
51. Turdean, G. L.; Popescu, I. C.; Curulli, A.; Palleschi, G. Iron (III) protoporphyrin IX—single-wall carbon nanotubes modified electrodes for hydrogen peroxide and nitrite detection. *Electrochim. Acta*, v. 51, p. 6435-6441, 2006.
52. Newman, J. D., Turner, A. P. F. Historical Perspective of Biosensor and Biochip Development. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 3, New Delhi, India, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

53. Lowe, C.R. Overview of Biosensor and Bioarray Technologies. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., Handbook of Biosensors and Biochips , chapter 1, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.
54. Giannoudi, L.; Piletska, E.V.; Sergey, A.P. Development of Biosensors for the Detection of Hydrogen Peroxide. In Giard, M.T., Piletska, E.V. Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices, 1 ed., chapter 6, USA, Springer, 2006.
55. Yang, K.; Zhang, C.-Y. Simple detection of nucleic acids with a single-walled carbon-nanotube-based electrochemical biosensor. Biosens. Bioelectron., v. 28, p. 257–262, 2011.
56. Han, C.; Doepke, A.; Cho, W.; Likodimos, V.; de La Cruz, A. A.; Back, T.; Heineman, W. R.; Halsall, H. B.; Shanov, V. N.; Schulz, M. J.; Falaras, P.; Dionysiou, D. D. A Multiwalled-Carbon-Nanotube-Based Biosensor for Monitoring Microcystin-LR in Sources of Drinking Water Supplies. Adv. Funct. Mater., v. 23, p. 1807–1816, 2013.
57. Hu, F.; Chen, S.; Wang, C.; Yuan, R.; Xiang, Y.; Wang, C. Multi-wall carbon nanotube-polyaniline biosensor based on lectin–carbohydrate affinity for ultrasensitive detection of Con A. Biosens. Bioelectron., v. 34, p. 202–207, 2012.
58. Melo, A.F. Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis. Dissertação de M.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.
59. Liu, Y.; Yan, Y.-L.; Lei, J.; Wu, F.; Ju, H. Functional multiwalled carbon nanotube nanocomposite with iron picket-fence porphyrin and its electrocatalytic behavior. Electrochem. Commun., v. 9, p. 2564–2570, 2007.
60. Baskaran, D.; Mays, J. W.; Zhang, X. P.; Bratcher, M. S. Carbon nanotubes with covalently linked porphyrin antennae: photoinduced electron transfer. J. Am. Chem. Soc., v. 127, p. 6916-6917, 2005.
61. Guldi, D. M.; Rahman, G. M.; Ramey, J.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Paolucci, F.; Qin, S. H.; Ford, W. T.; Balbinot, D.; Jux, N.; Tagmatarchis, N.; Prato, M. Donor-acceptor nanoensembles of soluble carbon nanotubes. Chem. Commun., p. 2034-2035, 2004.
62. Chen, J. Y.; Collier, C. P. Noncovalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with water-soluble porphyrins. J. Phys. Chem. B, v. 109, p. 7605-7609, 2005.

63. Chen, J.; U. Wollenber; F. Lisdat; B. Ge; F. W. Scheller. Superoxide Sensor Based on Hemin Modified Electrode. *Sens. Actuators B*, v. 70, p. 115-120, 2000.
64. Zhang, Y. L.; Zhang, C. X.; Shen, H. X. The studies on hemin as mimetic peroxidase in salt bridge supported bilayer lipid membrane system. *Electroanalysis*, v. 13, p. 1431-1435, 2001.
65. Mimica, D.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. Electrocatalysis of nitric oxide reduction by hemoglobin entrapped in surfactant films. *Electrochem. Commun.*, v. 3, p. 435-438, 2001.
66. Zheng, N.; Zeng, Y.; Osborne, P. G.; Li, Y.; Chang, W.; Wang, Z. Electrocatalytic reduction of dioxygen on hemin based carbon paste electrode. *J. Appl. Electrochem.*, v. 32, p. 129-133, 2002.
67. Nan, C. G.; Fena, Z. Z.; Li, W. X.; Ping, D. J.; Qin, C. H. Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at glassy carbon electrode modified with hemin. *Anal. Chim. Acta*, v. 452, p. 245-254, 2002.
68. Valentini, F.; Cristofanelli, L.; Carbone, M.; Palleschi, G. Glassy carbon electrodes modified with hemin-carbon nanomaterial films for amperometric H_2O_2 and NO_2^- detection. *Electrochim. Acta*, v. 63, p. 37-46, 2012.
69. Chen, J.; Zhao, L.; Bai, H.; Shi, G. Electrochemical detection of dioxygen and hydrogen peroxide by hemin immobilized on chemically converted graphene. *Electroanal. Chem.*, v. 657, p. 34-38, 2011.
70. Santos, R. M.; Rodrigues, M. S.; Laranjinha, J.; Barbosa, R.M. Biomimetic sensor based on hemin/carbon nanotubes/chitosan modified microelectrode for nitric oxide measurement in the brain. *Biosens. Bioelectron.*, v. 44, p. 152-159, 2013.
71. Ma, Q.; Ai, S.; Yin, H.; Chen, Q.; Tang, T. Towards the conception of an amperometric sensor of l-tyrosine based on Hemin/PAMAM/MWCNT modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta*, v. 55, p. 6687-6694, 2010.
72. Silva, R. A. B.; Montes, R. H. O.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal usando um microdispositivo contendo partículas de Azul da Prússia. *Quim. Nova*, v. 6, p. 987-991, 2011.
73. Bian, X.; Guo, K.; Liao, L.; Xiao, J.; Kong, J.; Ji, C.; Liu, B. Nanocomposites of palladium nanoparticle-loaded mesoporous carbon nanospheres for the electrochemical determination of hydrogen peroxide. *Talanta*, v. 99, p. 256-261, 2012.
74. Kozan, J. V. B.; da Silva, R. P.; Serrano, S. H. P.; Lima, A. W. O.; Angnes, L. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing

peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L.) fibers. *Anal. Chim. Acta*, v. 591, p. 200-207, 2007.

75. Wang, B.; Dong, S. Sol-gel-derived amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on methylene green incorporated in Nafion film. *Talanta*, v. 51, p. 565-572, 2000.

76. Nandini, S.; Nalini, S.; Manjunatha, R.; Shanmugam, S.; Melo, J. S.; Suresh, G. S. Electrochemical biosensor for the selective determination of hydrogen peroxide based on the co-deposition of palladium, horseradish peroxidase on functionalized-graphene modified graphite electrode as composite. *J. Electroanal. Chem.*, v. 689, p. 233-242, 2013.

77. Chattopadhyay, K.; Mazumdar, S. Direct electrochemistry of heme proteins: effect of electrode surface modification by neutral surfactants. *Bioelectrochemistry*, v. 53, p. 17 – 24, 2000.

78. Liu, S.; Dai, Z.; Chen, H.; Ju, H.; Liu, S.; Dai, Z.; Chen, H.; Ju, H. Immobilization of hemoglobin on zirconium dioxide nanoparticles for preparation of a novel hydrogen peroxide biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, v.19, p. 963-969, 2004.

79. Chen, H.; Dong, S. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in sol-gel-derived ceramic-carbon nanotube nanocomposite film. *Biosens. Bioelectron.*, v. 22, p. 1811-1815, 2007.

80. Elyasi, M.; Khalilzadeh, M. A.; Karimi-Maleh, H. High sensitive voltammetric sensor based on Pt/CNTs nanocomposite modified ionic liquid carbon paste electrode for determination of Sudan I in food samples. *Food Chemistry*, v. 141, p. 4311-4317, 2013.

81. Khalilzadeh, M. A.; Karimi-Maleh, H. Sensitive and selective determination of phenylhydrazine in the presence of hydrazine at a ferrocene monocarboxylic acid modified carbon nanotube paste electrode. *Anal. Letters*, v. 43, p. 186-196, 2010.

82. Ensafi, A. A.; Karimi-Maleh, H. Modified multiwall carbon nanotubes paste electrode as a sensor for simultaneous determination of 6-thioguanine and folic acid using ferrocenedicarboxylic acid as a mediator. *J. Electroanal. Chem.*, v. 640, p. 75-83, 2010.

Tavana, T.; Khalilzadeh, M. A.; Karimi-Maleh, H.; Ensafi, A. A.; Beitollahi, H.; Zareyee, D. Sensitive voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode. *J. Molecular Liquids*, v. 168, p. 69-74, 2012.

83. Qi, H.; Zhang, C. Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at a Glassy Carbon Electrode Modified with Multiwall Carbon Nanotubes. *Electroanalysis*, v. 17, p. 832-838, 2005.
84. Liu, X.; Ding, Z.; He, Y.; Xue, Z.; Zhao, X.; Lu, X. Electrochemical behavior of hydroquinone at multi-walled carbon nanotubes and ionic liquid composite film modified electrode. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, v. 79, p. 27–32, 2010.
85. Liu, Z.; Wang, Z.; Cao, Y.; Jing, Y.; Liub, Y. High sensitive simultaneous determination of hydroquinone and catechol based on graphene/BMIMPF6 nanocomposite modified electrode. *Sens. Actuators B*, v. 157, p. 540– 546, 2011.
86. Hong, Z.; Zhou, L.; Li, J.; Tang, J. A sensor based on graphitic mesoporous carbon/ionic liquids composite film for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Electrochim. Acta*, v. 109, p. 671– 677, 2013.
87. Han, H. S.; You, J.-M.; Seol, H.; Jeong, H.; Jeon, S. Electrochemical sensor for hydroquinone and catechol based on electrochemically reduced GO–terthiophene–CNT. *Sens. Actuators B*, v. 194, p. 460– 469, 2014.
88. Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*, v. 52, p. 681–689, 2000.
90. Raghua, P.; Reddya, T. M.; Reddaiaha, K.; Jaidevb, L. R.; Narasimhab, G. A novel electrochemical biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on Ag-nanoparticles/poly(l-arginine) modified carbon paste electrode toward the determination of pyrogallol/hydroquinone. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 377– 385, 2013.
91. Johns, D. O.; Dillis, R. L.; Morgan, M.S. Evaluation of dynamic headspace with gas chromatography/mass spectrometry for the determination of 1,1,1-trichloroethane, trichloroethanol, and trichloroacetic acid in biological samples. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 817, p. 255-261, 2005.
92. Huie, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 373, p. 23-30, 2002.
93. Majors, R. E. Sampler prep perspectives: Liquid extraction techniques for sample preparation. *LC-GC*, v. 14, p. 88-90, 1996.

94. Wang, Z.; Fang, D.; Li, Q.; Zhang, L.; Qian, R.; Zhu, Y.; Qu, H.; Du, Y. Modified mesoporous silica materials for on-line separation and preconcentration of hexavalent chromium using a microcolumn coupled with flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, v. 725, p. 81 – 86, 2012.
95. Queiroz, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quím. Nova*, v. 24, p. 68-76, 2001.
96. Martins, M. L.; Primel, E. G.; Calda, S. S.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*, v. 4, p. 35-51, 2012.
97. Barrionuevo, W. R.; Lanças, F. M. Extração em Fase Sólida (SPE) e Microextração em Fase Sólida (SPME) de piretroides em água. *Quim. Nova*, v. 24, p. 172-175, 2001.
98. Shen, H.; Jiang, H.; Mao, H. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. *J. Sep. Sci.*, v. 30, p. 48, 2007.
99. Ahn, J.-H.; Jeong, I.-S.; Kwak, B.-M.; Leem, D.; Yoon, T.; Yoon, C.; Jeong, J.; Park, J.-M.; Kim, J.-M. Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2411-2417, 2012.
100. Huck, C. W.; Bonn, G. K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, v. 885, p. 51, 2000.
101. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M-R. M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*, v. 1116, p. 1–9, 2006.
102. Kassem, M. A.; Amim, A.S. Spectrophotometric determination of iron in environmental and food samples using solid phase extraction. *Food Chemistry*, v. 141, p. 1941 – 1946, 2013.
103. Lanças, F.M. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos: RiMa, 2004.
104. Sun, J. J.; Fritz, J.S. Chemically modified resins for solid-phase extraction. *J. Chromatogr.* v. 590, p. 197-202, 1992.

105. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T. Polímeros biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. *Quim. Nova*, v. 28, p. 1076-1086, 2005.
106. Martín-Esteban, A.; Fernández, P.; Cámara, C.; Fresenius, Immunosorbents: a new tool for pesticide sample handling in environmental analysis. *J. Anal. Chem.*, v. 357, p. 927, 1997.
107. Pichon, V.; Bouzige, M.; Miège, C.; Hennion, M-C. Immunosorbents: natural molecular recognition materials for sample preparation of complex environmental matrices. *Trends Anal. Chem.*, v. 18, p. 219-325, 1999.
108. Delaunay, N.; Pichon, V.; Hennion, M-C. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 745, p. 15-37, 2000.
109. Sellergren, B. Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *Trends Anal. Chem.*, v. 18, p. 164–174, 1999.
110. Komiyama, M.; Takeuchi, T.; Mukawa, T.; Asanuma, H. *Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications*. Weinheim: 2003.
111. Mudd, S. A hypothetical mechanism of antibody formation. *J. Immunol.*, v. 23, p. 423-530, 1932.
112. Pauling, L. Theory of the structure and process of formation of antibodies. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 62, p. 2643–2657, 1940.
113. Pauling, L.; Campbell, D.H. The manufacture of antibodies in vitro. *J. Exper. Med.*, v. 76, p. 211-220, 1942.
114. Dickey, F. H. The preparation of specific adsorbents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 35, p. 227-229, 1949.
115. Haupt, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst*, v. 126, p. 747-756, 2001.

116. Sellergren, B.; Andersson, L. I. Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analogue imprinting strategy. *J. Org. Chem.*, v. 55, p. 3381-3383, 1990.
117. Wulff, G.; Sarhan, A. Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew Chem Int Ed.*, v. 11, p. 341–342, 1972.
118. Yavuz, H.; Karakoc, V.; Türkmen, D.; Say, R.; Denizli, A. Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles. *International J. Biological Macromol.*, v. 41, p. 8-15, 2007.
119. Arshady, R.; Mosbach, K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromol. Chem. Phys.*, v. 182, p. 687–692, 1981.
120. Hwang, C.-C.; Lee, W.-C. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. *J. Chromatogr. A*, v. 962, p. 69-78, 2002.
121. Santos, W. J. R.; Lima, P. R.; Tarley, C. R. T.; Kubota, L. T. Synthesis, Characterization and Kinetics of Catalytically Active Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Recognition of 4-Aminophenol. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, p. 820-825, 2009.
122. Zyablov, A. N.; Kalach, A. V.; Zhibrova, Y. A.; Selemenev, V. F.; D'yakonova, O. V. Determination of glycine in aqueous solutions using a molecularly imprinted polymer-modified piezosensor. *J. Anal. Chem.*, v. 65 p. 91-93, 2010.
123. Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 117, p. 7105, 1995.
124. Joshi, V. P.; Karode, S. K.; Kulkarni, M. G.; Mashelkar, R. A. Novel separation strategies based on molecularly imprinted adsorbents. *Chem. Eng. Sci.*, v. 53, p. 2271-2284, 1998.
125. Lübke, M., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N. A novel approach to the molecular imprinting of polychlorinated aromatic compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 120, p. 13342-13348, 1998.

126. Wang, S.; Xu, J.; Tong, Y.; Wang, L.; He, C. Cholesterol-imprinted polymer receptor prepared by a hybrid imprinting method. *Polym. Int.*, v. 54, p. 1268-1274, 2005.
127. Tamayo, F. G.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *J. Chromatogr. A.*, v. 1152, p. 32–40, 2007.
128. Yan, H.; Row, K. H. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 7, p. 155-178, 2006.
129. Pichon, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A.*, v. 1152, p. 41–53, 2007.
130. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. P. T.; Kubota, L. T. Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 2: Aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. *Quim. Nova*, v. 28, 1087-1101, 2005.
131. Sellergren, B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. *Anal. Chem.*, v. 66, p. 1578–1582, 1994.
132. Pilau, E. J.; Silva, R. G. C.; Jardim, I. C. F. S.; Augusto, F. Molecularly Imprinted Sol-Gel Silica for Solid Phase Extraction of Phenobarbital. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 19, p. 1136-1143, 2008.
133. Shi, Y.; Zhang, J. H.; Shi, D.; Jiang, M.; Zhu, Y.X.; Mei, S.R.; Zhou, Y. K.; Dai, K.; Lu, B. Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 16, p. 549-555, 2006.
134. Santos, W. D. J. R.; Lima, P. R.; Tarley, C. R. T.; Hoehr, N. F.; Kubota, L. T. Synthesis and application of a peroxidase-like molecularly imprinted polymer based on hemin for selective determination of serotonin in blood serum. *Anal. Chim. Acta*, v. 631, p. 170-176, 2009.
135. Turiel, F.; Cormack, E.; Peter, A. G.; Martín-Esteban, A. Synthesis of core-shell molecularly imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization for the inline molecularly imprinted solid-phase extraction of thiabendazole from citrus fruits and orange juice samples. *J. of Separation Science*, v. 34, p. 217-224, 2011.

136. Chaves, A.; Shea, D.; Danehower, D. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS. *Chemosphere*, v. 71, p. 629-638, 2008.

137. Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Tadeo, J. L. Molecular imprinting-based separation methods for selective analysis of fluoroquinolones in soils. *J. Chromatogr. A.*, v. 23, p. 97-104, 2007.

138. Duan, Y. P.; Dai, C. M.; Zhang, Y. L.; Ling-Chen. Selective trace enrichment of acidic pharmaceuticals in real water and sediment samples based on solid-phase extraction using multi-templates molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta*, v. 3, p. 93-100, 2013.

139. Thibert, V.; Legeay, P.; Chapuis-Hugon, F.; Pichon, V. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC-MS analysis. *Talanta*, v. 15, p. 412-419, 2012.

140. Li, J.; Zhang, X.; Liu, Y.; Tong, H.; Xu, Y.; Liu, S. Preparation of a hollow porous molecularly imprinted polymer using tetrabromobisphenol A as a dummy template and its application as SPE sorbent for determination of bisphenol A in tap water. *Talanta*, v. 117, p. 281-287, 2013.

141. Song, S.; Shi, X.; Li, R.; Lin, Z.; Wu, A.; Zhang, D. Extraction of chlorpromazine with a new molecularly imprinted polymer from pig urine. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1209–1214, 2008.

142. Pereira, L. A.; Rath, S. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 1063-1072, 2009.

143. Puoci, F.; Curcio, M.; Cirillo, G.; Iemma, F.; Spizzirri, U. G.; Picci, N. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. *Food Chemistry*, v. 106, p. 836–842, 2008.

144. Zengin, A.; Yildirim, E.; Tamer, U.; Caykara, T. Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol. *Analyst*, v. 138, p. 7238-7245, 2013.

145. Cheng, W.; Liu, Z.; Wang, Y. Preparation and application of surface molecularly imprinted silica gel for selective extraction of melamine from milk samples. *Talanta*, v. 116, p. 396-402, 2013.
146. Wang, Y.L.; Gao, Y. L.; Wang, P. P.; Shang, H.; Pan, S.Y.; Li, X. J. Sol-gel molecularly imprinted polymer for selective solid phase microextraction of organophosphorous pesticides. *Talanta*, v. 115, p. 920-927, 2013.
147. Gañán, J.; Morante-Zarcelero, S.; Gallego-Picó, A.; Garcinuño, R. M.; Fernández-Hernando, P.; Sierra, I. Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion. *Talanta*, v. 126, p. 157-162, 2014.
148. Farrington, K.; Regan, F. Investigation of the nature of MIP recognition: The development and characterisation of a MIP for ibuprofen. *Biosens. Bioelectr.*, v. 22, p. 1138-1146, 2007.
149. Lv, Y.K.; Wang, L.-M.; Yang, L.; Zhao, C.-X.; Sun, H.-W. Synthesis and application of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)-silica hybrid composite material for selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of oxytetracycline residues in milk. *J. Chromatogr. A*, v. 1227, p. 48– 53, 2012.
150. Sreenivasan, K.; Sivakumar, R. Ferric Iron-containing Molecularly Imprinted Polymer as an Adsorbent for Cholesterol. *Adsorption Science & Technology*, v. 21, p. 261-268, 2003.
151. Ciardelli, G.; Borrelli, C.; Silvestri, D.; Cristallini, C.; Barbani, N.; Giusti, P. Supported imprinted nanospheres for the selective recognition of cholesterol. *Biosens. Bioelectron.*, v. 21, p. 2329-2338, 2006.
152. Ebelmen, M. Recherches sur les combinaisons des acides borique et silicique avec les éthers. *Annales de Chimie et de Physique*, v. 129, p. 166, 1846.
153. Díaz-García, M. E.; Laíño, R. B. Molecular Imprinting in Sol-Gel Materials: Recent Developments and Applications. *Microchim. Acta*, v. 149, p. 19–36, 2005.
154. Fujiwara, M.; Nishiyama, M.; Yamamura, I.; Ohtsuki, S.; Nomura, R. A sol-gel method using acetic anhydride in the presence of cholesterol in organic solution media: Preparation of silicas that recognize steroid hormones. *Anal. Chem.*, v. 76, p. 2374–2381, 2004.

155. Soares, C. M. F.; Moraes, F. F.; Santos, O. A. A.; Castro, H. F. Molecular imprinting of β -cyclodextrin/cholesterol template into a silica polymer for cholesterol separation. *J. of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 57, p. 79-82, 2007.
156. Hsu, C.-H.; Yang, M.-C. Enhancement of the imprinting effect in cholesterol-imprinted microporous silica. *J. of Non-Crystalline Solids*, v. 354, p. 4037–4042, 2008.
157. Gupta, R.; Kumar, A. Synthesis and characterization of sol–gel-derived molecular imprinted polymeric materials for cholesterol recognition. *J. of Sol-Gel Science and Technology*, v. 58, p. 182-194, 2011.
158. Marestoni, L. D.; Sotomayor, M. D. T.; Segatelli, M. G.; Sartori, L. R.; Tarley, C. R. T. Ion imprinted polymers: fundamentals, preparation strategies and applications in analytical chemistry. *Quim. Nova*, v. 36, p. 1194-1207, 2013.
159. Tarley, C. R. T.; Andrade, F. N.; de Santana, H.; Zaia, D. A. M.; Beijo, L. A.; Segatelli, M. G. Ion-imprinted polyvinylimidazole-silica hybrid copolymer for selective extraction of Pb(II): Characterization and metal adsorption kinetic and thermodynamic studies. *React. Funct. Polym.*, v. 72, p. 83-91, 2012.
160. Lin, C. I.; Joseph, A. K.; Changa, C. K.; Wang, Y. C.; Lee, Y. D. Synthesis of molecular imprinted organic–inorganic hybrid polymer binding caffeine. *Anal. Chim. Acta*, v. 481, p. 175–180, 2003.
161. Duran, C.; Ozdes, D.; Gundogdu, A.; Imamoglu, M.; Senturk, H. B. Tea-industry waste activated carbon, as a novel adsorbent, for separation, preconcentration and speciation of chromium. *Anal. Chim. Acta*, v. 688, p. 75-83, 2011.
162. Zolgharnein, J.; Shahmoradi, A. Adsorption of Cr(VI) onto *Elaeagnus* tree leaves: statistical optimization, equilibrium modeling, and kinetic studies. *J. Chem. Eng. Data*, v. 55, p. 3428–3437, 2010.
163. Plazinski, W.; Rudzinski, W.; Plazinska, A. Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. *Adv. in Colloid and Interface Sci.*, v. 152, p. 2–13, 2009.
164. Diniz, K. M.; Segatelli, M. G.; Tarley, C. R. T. Synthesis and adsorption studies of novel hybrid mesoporous copolymer functionalized with protoporphyrin for batch and on-line solid-phase extraction of Cd²⁺ ions. *React. Funct. Polym.*, v. 73, p. 838-846, 2013.

165. Li, Y.; Yue, Q.; Gao, B. Adsorption kinetics and desorption of Cu(II) and Zn(II) from aqueous solution onto humic acid. *J. Hazard. Mater.*, v. 178, p. 455-461, 2010.
166. Cáceres, A. L.; Escudey, M.; Fuentes, E.; Báez, M. E. Modeling the sorption kinetic of metsulfuron-methyl on Andisols and Ultisols volcanic ash-derived soils: Kinetics parameters and solute transport mechanisms. *J. Hazard. Mater.*, v. 179, p. 795–803, 2010.
167. Wang, Z.; Ainsworth, C. C.; Friedrich, D. M.; Gassman, P. L.; Joly, A. G. Kinetics and mechanism of surface reaction of salicylate and alumina in colloidal aqueous suspension. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v. 64, p. 1159-1172, 2000.
168. Arasteh, R.; Masoumi, M.; Rashidi, A. M.; Moradi, L.; Samimi, V.; Mostafavi, S. T. Adsorption of 2-nitrophenol by multi-wall carbon nanotubes from aqueous solutions. *Appl. Surf. Sci.*, v. 256, p. 4447–4455, 2010.
169. Carvalho, T. E. M.; Fungaro, D. A.; Izidoro, J. C. Adsorção do corante reativo laranja 16 de soluções aquosas por zeólita sintética. *Quím. Nova*, v. 33, p. 358-363, 2010.
170. Dizge, N.; C. Aydiner; E. Demirbas; M. Kobya; S. Kara. Adsorption of reactive dyes from aqueous solutions by fly ash: Kinetic and equilibrium studies. *J. Hazard Mater.*, v. 150, p. 737-746, 2008.
171. Praus, P.; M. Turicová. A physico-chemical study of the cationic surfactant adsorption on montmorillonite. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 18, p. 378-383, 2007.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR VOLTAMÉTRICO BASEADO EM PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO MODIFICADO COM HEMINA PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

1. INTRODUÇÃO

A hidroquinona (HQ) foi introduzida para uso clínico em 1961 e tem sido um dos princípios ativos mais usados para tratar manchas na pele, sendo comercializado também em farmácias de manipulação magistral¹. Este composto por inibir o grupo sulfidrilo e atuar como substrato da tirosina, resulta em uma ação seletiva no metabolismo dos melanócitos inibindo a produção da melanina.²

Os principais efeitos adversos da HQ são dermatites, despigmentação, diminuição da capacidade de cicatrização da pele, e seu uso por um período longo, pode causar ocronose exógena, uma doença desfigurante, na qual pigmentos negro-azulados são depositados sobre a pele onde foi aplicado este composto.³

Diante destes problemas causados pela HQ e por ser usada a mais de 50 anos como opção terapêutica no tratamento de melasma, o Comitê Europeu permitiu o uso de hidroquinona em cosméticos e formulações somente através de prescrição por médicos e dermatologistas.⁴ À partir de 2006, nos Estados Unidos, o FDA (Food Drug Administration)⁵ propôs uma nova regra para estabelecer que os produtos despigmentantes que contenham hidroquinona sejam enquadrados na categoria OTC (Over the counter), uma vez que não estão reconhecidos como seguros e eficazes. Desta maneira, o FDA pretendia diminuir o número de casos de ocronoses que ocorrem nos EUA.

No Brasil, formulações contendo diversas concentrações de HQ, são comercializadas sem prescrição médica. A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)⁶, através da Resolução RDC n°215, determina que os

agentes para clarear a pele tenham hidroquinona em uma concentração máxima de 2%, mas nos produtos manipulados pode chegar a 4%.

Vários métodos têm sido usados para determinação deste composto, como cromatografia líquida de alta eficiência⁷, espectrofotometria⁸ e eletroluminescência.⁹ A literatura tem reportado o uso de sensores voltamétricos para determinação de hidroquinona, baseados em eletrodos modificados de filme com compósito iônico líquido¹⁰⁻¹² e biossensores modificados¹³, como já mencionado na seção 1.4 (Revisão Bibliográfica).

Um outro composto importante alvo de estudo nesta tese é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por ser bastante utilizado em processos oxidativos avançados para degradação de poluentes, como clareador nas indústrias de celulose e papel, e também em formulações de higiene oral¹⁴, como os clareadores dentais.

Os clareadores dentais são baseados em peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida e se apresentam sob a forma de líquido ou gel. Eles são aplicados na superfície externa dos dentes, após a proteção da gengiva, penetrando em sua estrutura. A dissociação do H_2O_2 em água, oxigênio reativo e em algumas espécies radicalares livres, é que promove o efeito do clareamento dental no tecidos duros, pois estas moléculas reativas atacam moléculas cromóforas de cor escura e dividi-as em moléculas menores e menos coloridas. Para branquear os dentes, o H_2O_2 deve penetrar através do esmalte até atingir a dentina subjacente, que é a principal responsável pela cor do dente.¹⁵

O risco neste processo de branqueamento, é que o clareador em muitos casos pode atingir a polpa dentária, podendo ocorrer uma reação

inflamatória, o que pode causar até a morte da polpa. Como estes tratamentos podem ser feitos tanto pelo cirurgião dentista no consultório quanto pela própria pessoa, em sua residência, há uma preocupação, principalmente com o tratamento caseiro, pois o usuário pode colocar o produto em excesso, causando assim inflamação da gengiva e da polpa.¹⁶

O H_2O_2 pode ser determinado por titulometria¹⁷, espectrofotometria¹⁸, fluorimetria¹⁹, quimiluminescência²⁰ e métodos eletroquímicos.²¹⁻²⁴ Estes métodos, exceto os eletroquímicos, são vulneráveis às espécies interferentes, consomem tempo no preparo da amostra e também requerem reagentes caros.

A detecção eletroquímica do peróxido de hidrogênio pode ser realizada através da oxidação direta dos eletrodos de carbono e platina²⁵, mas devido aos altos potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho, estes sofrem com outras espécies interferentes.²⁶ Alguns autores, com intuito de minimizar estes problemas, têm feito alterações químicas e eletroquímicas nas superfícies dos eletrodos de trabalho.²⁷⁻³⁰ Determinações voltamétricas de H_2O_2 também têm sido amplamente realizadas utilizando biossensor³⁰⁻³⁶ envolvendo o uso da enzima peroxidase depositada na forma de filme sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo ou como composto em pasta de nanotubo de carbono.

Com base no exposto, o controle de qualidade destes compostos, HQ e H_2O_2 , em formulações farmacêuticas e odontológicas, é de suma importância, já que atualmente um grande número de cremes despigmentantes que contém HQ em sua formulação são vendidos ao público em geral. Além disso, houve também um aumento no uso de agentes

clareadores dentais. Para isso, o desenvolvimento de métodos rápidos, simples, robustos e reprodutíveis para quantificar HQ e H₂O₂ em formulações, como farmacêuticas, magistrais e dentais, torna-se importante. Dentre os métodos usados para quantificar estes analitos que apresenta estas características, destaca-se os voltamétricos, além de serem viáveis para miniaturização das análises.¹⁰

Conforme reportado na Revisão Bibliográfica desta Tese, não há relatos na literatura que fazem uso de sensores voltamétricos baseados em pasta de CNT/hemina para quantificar estes compostos em formulações. Portanto, neste trabalho, foi desenvolvido um sensor baseado em nanotubo de carbono multi-parede (MWCNT), sem tratamentos de pré-purificação ou funcionalização, modificado com hemina para a determinação de hidroquinona e peróxido de hidrogênio em formulações farmacêuticas e odontológicas, respectivamente. Neste sensor, foram unidas as vantagens da excelente condutividade elétrica e estabilidade química dos CNT com as da hemina, que exerce o papel de uma enzima, mas que não apresenta as desvantagens da mesma, conforme descrito na Introdução Geral.

2. OBJETIVO GERAL

O Capítulo 1 tem como objetivo geral avaliar o desempenho do sensor de nanotubo de carbono com hemina (protoporfirina de ferro) para determinação voltamétrica de hidroquinona e peróxido de hidrogênio.

2.1. Objetivos Específicos

Estudos voltamétricos de hidroquinona e peróxido de hidrogênio, comparando o desempenho do eletrodo de pasta de nanotubo de carbono/hemina com o de outros eletrodos (carbono vítreo e pasta de nanotubo de carbono na ausência de hemina).

Estudos da composição da pasta CNT/hemina/Nujol®, efeito do pH, tipos de eletrólitos suporte e força iônica, além da otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (amplitude, incremento de potencial e frequência) para hidroquinona.

Estudos da composição da pasta CNT/hemina/Nujol®, efeito do pH e otimização da voltametria linear para peróxido de hidrogênio.

Determinação das figuras de mérito da metodologia analítica como limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e recuperação, para ambos analitos.

Aplicação do método em formulações cosméticas e medicamentos para hidroquinona e aplicação do método em antissépticos bucais para peróxido de hidrogênio.

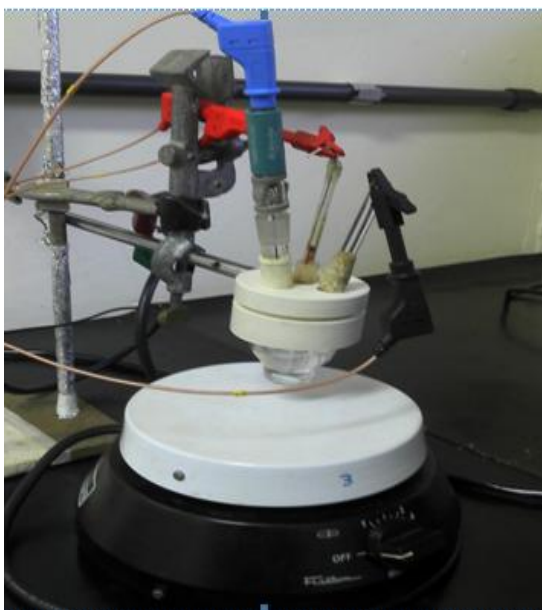
Avaliação da exatidão do método da hidroquinona usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e volumetria de oxidação-redução para peróxido de hidrogênio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e Reagentes

Os experimentos de voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada (VOQ) e cronoamperometria para determinação de hidroquinona e voltametria linear para peróxido de hidrogênio foram realizados em célula eletroquímica convencional, capacidade de 15 mL, com três eletrodos: referência Ag/AgCl, auxiliar Pt e eletrodo de trabalho CNT/hemina/Nujol®, conforme Figura 1.1.

Figura 1.1. Célula eletroquímica utilizada nos experimentos de voltametria cíclica, voltametria linear, de onda quadrada e cronoamperometria.



As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 101 (Autolab) em pH 7,0 (tampão Tris-HCl) e concentração de hidroquinona de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e peróxido de

hidrogênio $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e as soluções agitadas em agitador magnético (Fisatom).

A técnica de HPLC foi usada para checar a exatidão do método voltamétrico proposto para determinação de HQ empregando um cromatógrafo modelo LC-20AT, Shimadzu, operando isocraticamente, com detector de arranjo de diodo e alça de injeção de $20 \mu\text{L}$. A vazão foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ utilizando fase móvel constituída de metanol e água (20:80, v/v) e a detecção foi feita a 289 nm . Uma coluna CLC-ODS(M) ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ i.d., $5 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula) foi usada e a temperatura do forno foi de 25°C . O tempo de retenção de HQ foi de 5,7 minutos.

A volumetria (Iodometria), técnica utilizada para avaliar a exatidão do método para H_2O_2 foi realizada em bureta de $25,0 \text{ mL}$ e erlenmeyer de $125,0 \text{ mL}$, ambos da marca Vidrolabor. Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico, exceto Óleo mineral (Nujol®), e usados sem purificação prévia: Hidroquinona (Sigma, 99%); Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado (Merck, 99,0 – 102,0%); Tris-HCl (Invitrogen, 99,9 – 100,1%); Pipes (Sigma, 99,0%); Hepes (Sigma, 99,5%); Peróxido de hidrogênio (Sigma, 30%); Tiosulfato de sódio (Synth, 99,5 - 102,5%); Iodeto de potássio (Ecibra, 99%); MWCNT (fornecido por CNT Co., Ltda. Yeonsu-Gu, Incheon, Korea 93%); Metanol (Sigma-Aldrich, grau HPLC $\geq 99,9\%$). A água usada no preparo das soluções foi ultrapura Milli Q (Millipore). As soluções de trabalho de hidroquinona, peróxido de hidrogênio e tampão Tris-HCl foram preparadas em água ultrapurificada.

3.2. Preparo do eletrodo de pasta de nanotubo de carbono modificado com hemina para determinação de hidroquinona e peróxido de hidrogênio

O eletrodo de trabalho CNT/hemina/Nujol®, foi preparado na proporção 20% CNT, 10% de hemina e 70% Nujol. Em uma placa de petri foram pesados CNT e hemina, ambos foram misturados por 20 minutos com espátula de aço e transferidos a um almofariz de ágata para maceração. Após, adicionou-se Nujol® e os três reagentes foram misturados até formar uma pasta homogênea. Esta pasta foi colocada na cavidade do eletrodo de platina (área eletroativa de 0,205 cm²), conforme mostra a Figura 1.2.

Figura 1.2. Eletrodo modificado com CNT/hemina/Nujol®. (A = 0,205 cm²)



3.3. Preparo de amostras e métodos voltamétricos para determinação de hidroquinona em cremes cosméticos e peróxido de hidrogênio em antissépticos bucais e gel clareador

3.3.1. Determinação de hidroquinona em cremes cosméticos

Cinco cremes cosméticos, sendo 3 de marcas comerciais de drogarias (I a III) e 2 de farmácias magistrais (IV e V) da cidade de Londrina, Paraná foram utilizados. O preparo dos cremes cosméticos foi realizado segundo a referência Garcia et al³⁷, sendo que para as amostras de II a V contendo 4g/100g de HQ, pesou-se em torno de 20,0 mg da amostra em um béquer de 100,0 mL de capacidade. Adicionou-se aproximadamente 90,0 mL de água ultrapurificada e agitou-se por 30 min a temperatura ambiente. Após a quebra da emulsão, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada, obtendo-se uma solução com concentração próxima a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Desta solução, pipetou-se 200 μL , sem prévia purificação e adicionou-se na célula de trabalho contendo 9,8 mL de tampão Tris-HCl 0,15 mol L^{-1} . Para a amostra I contendo 2g/100g de HQ, o preparo foi semelhante ao citado acima para o restante das amostras, mas pesou-se 40,0 mg da amostra de creme cosmético. As medidas voltamétricas foram realizadas com o sensor proposto CNT/hemina/Nujol® empregando a técnica de voltametria de onda quadrada sob as seguintes condições: [Tris-HCl] = 0,15 mol L^{-1} (pH 7,0), Amplitude = 70 mV, Frequência = 70 Hz e Incremento de potencial = 0,01 V.

3.3.2. Determinação de peróxido de hidrogênio em antissépticos bucais e gel clareador

Foram analisadas duas marcas comerciais de drograrias de enxaguantes bucais (A e B), sendo que a marca A apresentava 1,5% (v/v) de H_2O_2 e a B 2,0% (v/v). Também foi analisado um clareador dental em gel (C), comprado em loja de produtos odontológicos, o qual apresentava 6% (m/m) de H_2O_2 . As amostras de antissépticos bucais foram analisadas, sem prévio preparo de amostra, adicionando-se 14 μL e 10 μL das amostras A e B, respectivamente, na célula eletroquímica contendo 10,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} para obter uma concentração de 0,6 mmol L^{-1} de H_2O_2 . A amostra (1,0 g) de clareador dental em gel foi previamente dissolvida em 90,0 mL de água ultrapurificada e após a dissolução, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada. Adicionou-se na célula eletroquímica 340 μL desta suspensão e 9,66 mL de tampão, para se obter 0,6 mmol L^{-1} de H_2O_2 . As medidas voltamétricas foram realizadas com o sensor proposto CNT/hemina/Nujol® empregando a técnica de voltametria linear sob as seguintes condições: [Tris-HCl] = 0,05 mol L^{-1} (pH = 7,0) e velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} .

3.4. Método cromatográfico para determinação de HQ

No método cromatográfico³⁷, das amostras de II a V contendo 4g/100g de HQ, foram pesados em torno de 16,0 mg de amostra em um becker de 50,0 mL de capacidade. Para a amostra I, pesou-se o dobro da massa de HQ. Adicionou-se aproximadamente 90,0 mL de fase móvel

MeOH/H₂O (20:80, v/v) e agitou-se por 30 min a temperatura ambiente. Após a quebra da emulsão, transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com a fase móvel. Alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, obtendo-se uma solução com concentração próxima a 16,0 µg mL⁻¹. Antes de injetar as amostras no equipamento, as mesmas foram filtradas 3 vezes em filtros de 0,45 µm (Macherey-Nagel).

3.5. Método volumétrico para determinação de H₂O₂

Na volumetria de oxidação-redução, foram pipetados 1,0 mL das amostras dos antissépticos bucais A e B e transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL. Para a amostra C, foi pesado 1,0 g do gel clareador e transferido para balão volumétrico de 50,0 mL. Alíquotas de 10 mL de cada amostra foram colocadas em erlenmeyers de 125,0 mL para posteriormente serem tituladas com iodeto de potássio.³⁸

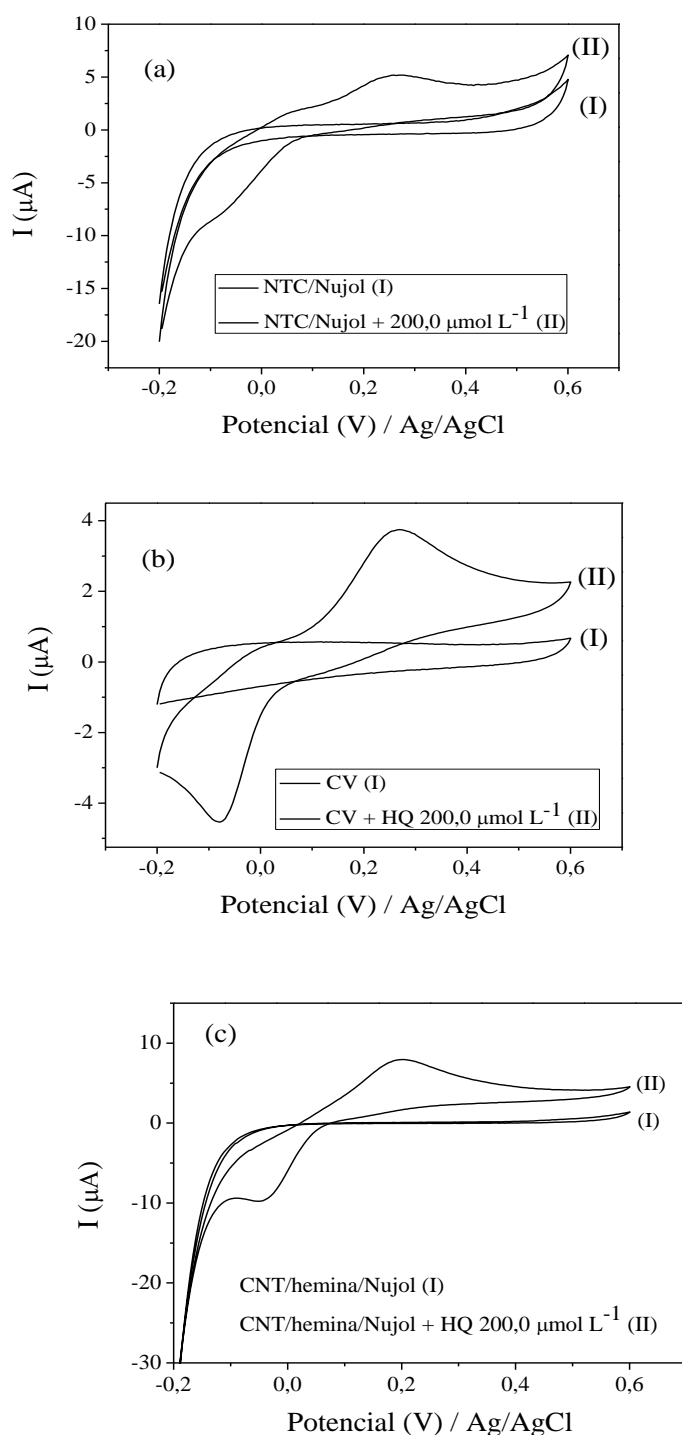
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SENSOR VOLTAMÉTRICO PARA HIDROQUINONA

4.1. 1. Avaliação do desempenho do sensor voltamétrico para HQ

Para avaliar o comportamento eletroquímico do sensor de CNT/hemina/Nujol® na determinação de HQ, foram registrados seus voltamogramas e estes foram comparados com os voltamogramas dos eletrodos de CNT na ausência de hemina e carbono vítreo, conforme mostram as Figuras 1.3(a) e 1.3(b).

Figura 1.3. Voltamogramas cíclicos de HQ usando eletrodo de (a) NTC/Nujol®, (b) CV e (c) CNT/hemina/Nujol® (20:10:70) na ausência e presença de HQ. Condições: [Tris-HCl] = 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0), [HQ] = 200,0 μmol L⁻¹, 50 mV s⁻¹ (3° ciclo).



Nas Figuras 1.3 (a),(b) e (c) verifica-se que há um aumento no pico de corrente anódica de 400% utilizando pasta de CNT/hemina/Nujol® quando

comparada ao CV, e de 280% quando comparada ao CNT na ausência de hemina, mostrando que a hemina facilita a oxidação da hidroquinona. Além disso, foi observado um decréscimo na diferença dos potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) da HQ no eletrodo CNT/hemina/ Nujol®, indicando melhoria na reversibilidade eletroquímica do sistema associada a maior transferência de elétrons.

4.1.2. Estudo da composição da pasta CNT/hemina/Nujol® para HQ

Após verificar que o sensor desenvolvido foi eficiente na oxidação da hidroquinona, fez-se um estudo da composição da pasta CNT/hemina/Nujol® em diferentes proporções: 35:35:35, 10:70:20, 10:75:15, 20:10:70 e 25:15:60 % (m/m/m) representado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Diferença entre os picos de potenciais anódicos e catódicos de HQ utilizando diferentes eletrodos como carbono vítreo (CV), nanotubo de carbono (CNT/Nujol®), e nanotubo de carbono modificado com hemina (CNT/hemina/Nujol®) em diferentes proporções.

Eletrodos	ΔE_p (V)
CV	0,280
CNT/Nujol®	0,276
CNT/hemina/Nujol® (10:70:20, m/m/m)	0,264
CNT /hemina/Nujol® (25:15:60, m/m/m)	0,232
CNT /hemina/Nujol® (35:35:30, m/m/m)	0,245
CNT /hemina/Nujol® (20:10:70, m/m/m)	0,225
CNT /hemina/Nujol® (10:75:15, m/m/m)	0,269

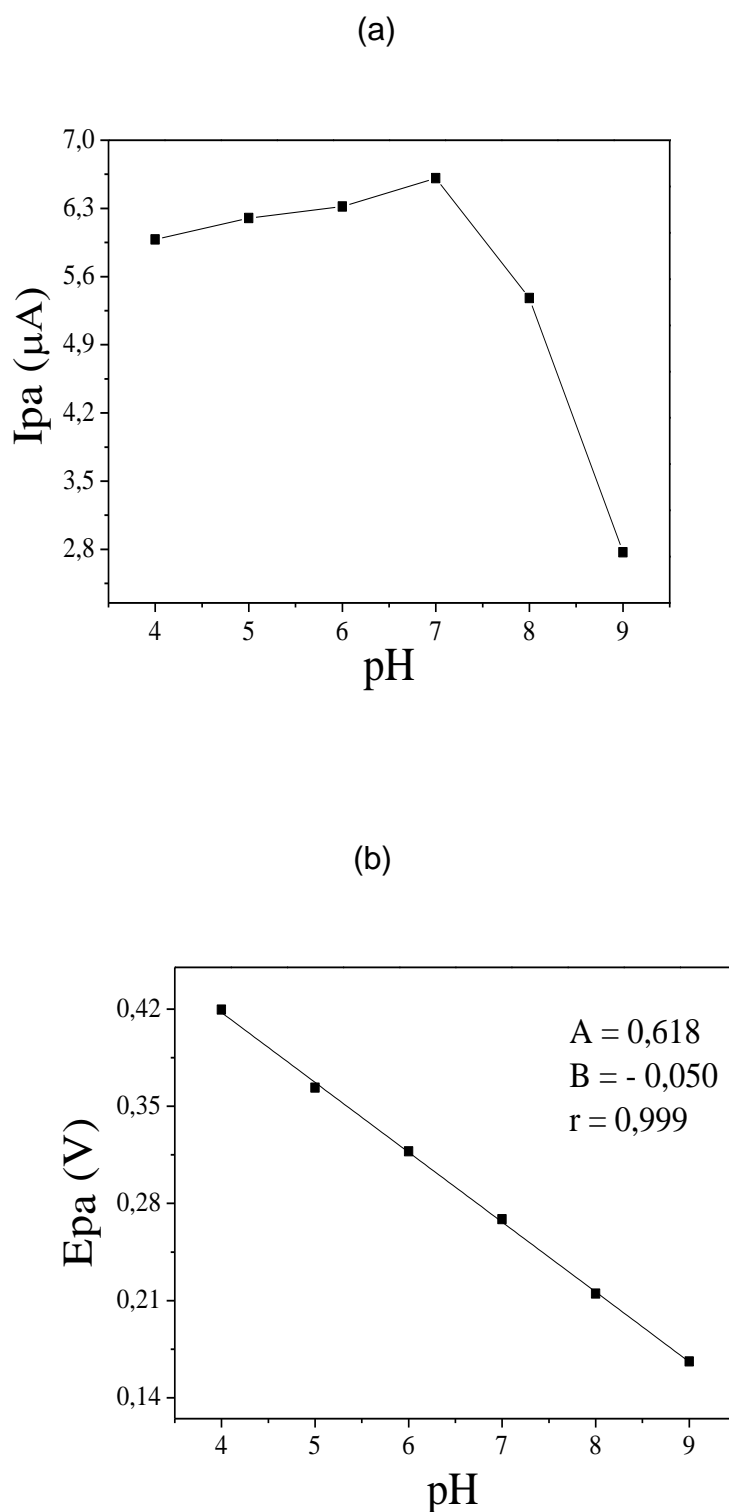
Analisando a composição da pasta presente na Tabela 1.1, constata-se que a menor variação de potencial anódico e catódico (ΔE) de 0,225 V, foi obtida na proporção CNT/hemina/Nujol® (20:10:70 m/m/m). No entanto, em proporções com maior quantidade de hemina, o potencial é deslocado para

potenciais mais positivos, mostrando que, o aumento acentuado de hemina em detrimento ao CNT, mascara o efeito do CNT. Esta constatação corrobora com os dados relativos à corrente. O aumento acentuado de hemina em detrimento ao CNT, de fato, reduz as correntes de redução. Portanto, escolheu-se a proporção CNT/hemina/Nujol® (20:10:70 m/m/m), para dar continuidade ao trabalho. De acordo com os autores Ma et al³⁹, a redução de Fe (III) para Fe (II) ocorre no eletrodo de carbono vítreo modificado PAMAM/MWCNT imobilizado com hemina, no potencial de -0,4 V, enquanto que a oxidação de Fe(III) para Fe(IV) se dá em 0,8 V.⁴⁰ Assim, considerando que a faixa de potencial estudada no eletrodo modificado CNT/hemina/Nujol® é de -0,2 a 0,6 V, constata-se que o Fe da hemina está na forma de Fe(III).

4.1.3. Efeito do pH para HQ

O pH foi variado de 4,0 a 9,0 para estudar seu efeito na corrente anódica de HQ. Para os valores de pH 4,0, 5,0 e 5,9 foi utilizado tampão acetato (0,05 mol L⁻¹) e para 7,0, 8,0 e 9,0 foi usado tampão Tris-HCl (0,05 mol L⁻¹), como mostram as Figuras 1.4(a) e 1.4(b).

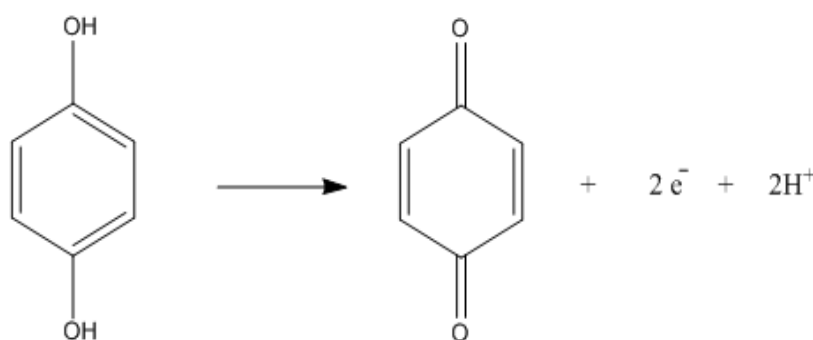
Figura 1.4. (a) Dependência do pH (a) com I_{pa} (μA) e (b) com E_{pa} (V) da HQ. $[HQ] = 200,0 \mu mol L^{-1}$, $50 mV s^{-1}$.



Observando a Figura 1.4(a), o aumento do pH promove incrementos no sinal analítico até pH 7,0, sendo este o pH adotado. Em pH baixo há um

aumento de íons H^+ no meio, além do deslocamento de potencial para valores mais positivos, pois de acordo com a Figura 1.5, ocorre uma diminuição da magnitude da oxidação da hidroquinona.⁴¹ Em valores de pH maiores, 8,0 e 9,0, os picos de oxidação e redução ficam menos evidentes, pois pode estar ocorrendo a desativação da hemina.⁴² O potencial de pico de oxidação da hidroquinona mostra uma variação linear com o pH (Figura 1.4(b)), com coeficiente angular de $-50,3 \text{ mV pH}^{-1}$, sugerindo que o número total de elétrons e prótons envolvidos na oxidação da HQ é o mesmo. Como a oxidação da HQ ocorre pela transferência de 2 elétrons, o número de prótons envolvido é também dois.⁴³

Figura 1.5. Mecanismo eletroquímico de oxidação da HQ.

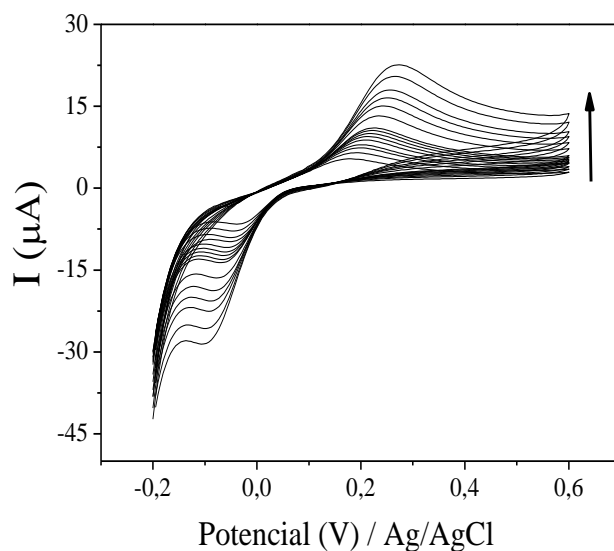


4.1.4. Efeito da velocidade de varredura para HQ

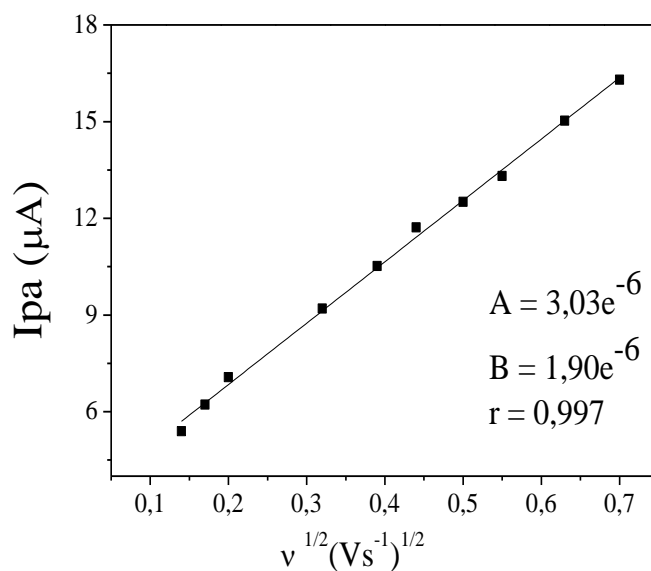
O efeito da velocidade de varredura no comportamento voltamétrico da HQ foi realizado no eletrodo modificado CNT/hemina/Nujol® em Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, hidroquinona $200,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, como mostrado na Figura 1.6(a). Foram utilizadas velocidades de varredura de 20 a 500 mV s^{-1} .

Figura 1.6. (a) Voltamogramas cíclicos de corrente anódica (μA) e catódica (μA) de HQ vs potencial (V) em diferentes velocidades de varredura (20 a 500 mV s^{-1}). (b) Variação I_{pa} (μA) de HQ versus $v^{1/2}$ (mV s^{-1}) $^{1/2}$ ($r = 0,997$).

(a)



(b)



A Figura 1.6(a) mostra que à medida que a velocidade aumenta, há aumento no pico anódico da HQ e também um deslocamento do potencial

anódico para valores mais positivos, pois a transferência de massa não acompanha a transferência de elétrons, típico de mecanismo controlado por difusão. Além disso, na Figura 1.6(b) indica que há linearidade ($r = 0,997$) entre I_{pa} e $v^{1/2}$, mostrando que o processo de oxidação da HQ é controlado por difusão.⁴⁴ Para confirmar o processo de difusão, plotou-se $\log I_{pa}$ x $\log v$, o qual mostrou dependência linear do logaritmo da intensidade de corrente anódica pelo logaritmo da velocidade de varredura, com um coeficiente angular de 0,58, valor próximo ao estimado pela literatura (0,50) para sistemas controlados por difusão.⁴⁵

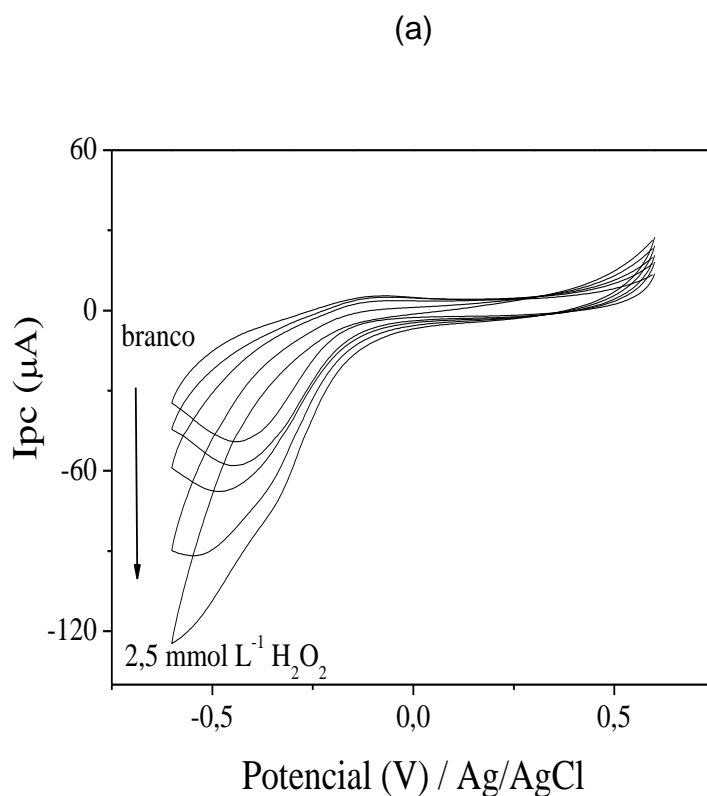
4.1.5. Avaliação da hemina como catalisador biomimético do sítio ativo de peroxidase para peróxido de hidrogênio

A fim de elucidar o mecanismo para a determinação de HQ, experimentos foram realizados na presença e na ausência de H_2O_2 usando voltametria cíclica e cronoamperometria, bem como bem fazendo uso do eletrodo com e sem hemina. O primeiro experimento de voltametria cíclica foi realizado com eletrodo modificado CNT/hemina/Nujol®, usando-se tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, na ausência e presença de concentrações de H_2O_2 ($0,5$ a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), na faixa de potencial de $-0,6$ a $0,6 \text{ V}$ (Figura 1.7(a)).

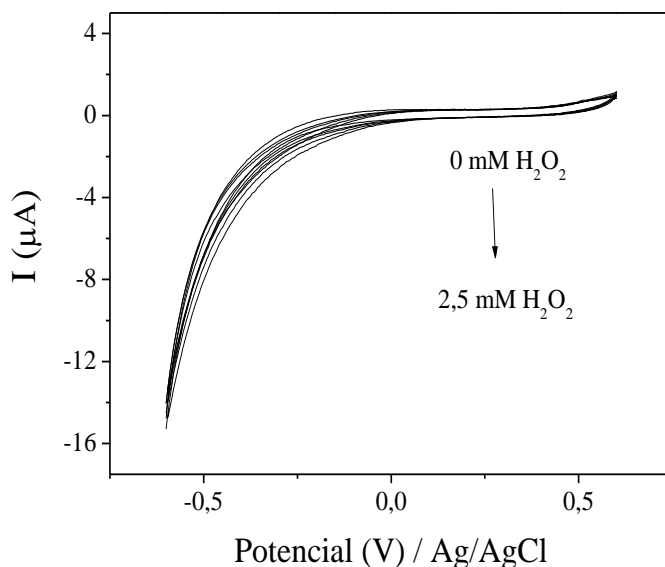
Outro experimento foi executado nas mesmas condições, mas neste, utilizou-se eletrodo de CNT na ausência de hemina (Figura 1.7(b)). Observando a Figura 1.7(a), verifica-se um pico de redução de Fe(III) para Fe(II) (sinal de branco) no eletrodo modificado CNT/hemina/Nujol® no potencial de $-0,4 \text{ V}$, de acordo com estudos realizados pelos autores Ma et al.³⁹ Com a adição de H_2O_2 há aumento linear do pico de redução, indicando

que a hemina exibe propriedade catalítica na redução do peróxido. Já na Figura 1.7(b), nota-se a ausência de pico em -0,4 V devido à ausência de hemina no sensor e, como consequência, nenhum sinal de pico de redução com a adição de H₂O₂. Assim sendo, constata-se que o presente sensor baseado em pasta de nanotubo de carbono modificado com hemina pode ser usado para monitorar concentrações de H₂O₂.

Figura 1.7. Voltamogramas cíclicos do tampão Tris-HCl = 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,0) na ausência e presença de H₂O₂ (a) usando eletrodo CNT/hemina/Nujol® e (b) eletrodo CNT/Nujol®. 50 mV s⁻¹ (3° ciclo).



(b)

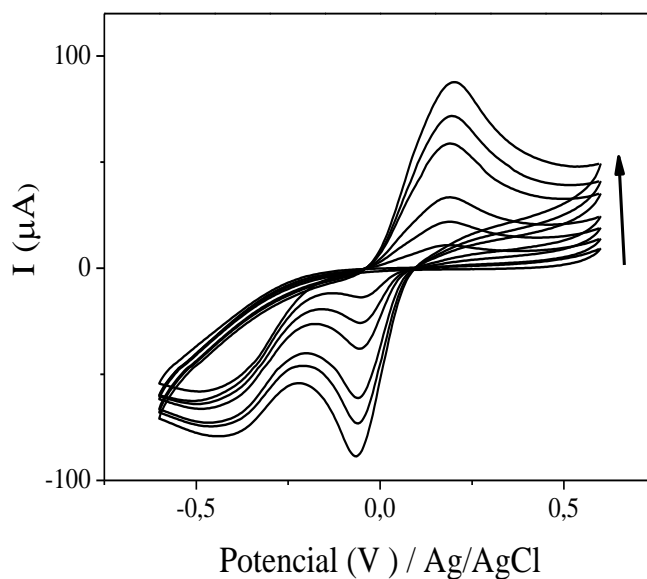


O segundo experimento foi realizado usando o eletrodo CNT/hemina/Nujol® e contendo concentrações crescentes de HQ (0,2 mmol L⁻¹ a 1,2 mmol L⁻¹) em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ mantendo a concentração fixa de H₂O₂ em 0,8 mmol L⁻¹ (Figura 1.8(a)). Outro experimento foi realizado construindo-se curvas analíticas por meio de cronoperimetria na presença e ausência de H₂O₂ para ambos eletrodos de CNT/hemina/Nujol® e CNT/Nujol® (Figura 1.8(b)). Nos estudos cronoamperométricos foi fixado o potencial de -0,05 V com intuito de monitorar a redução de HQ.

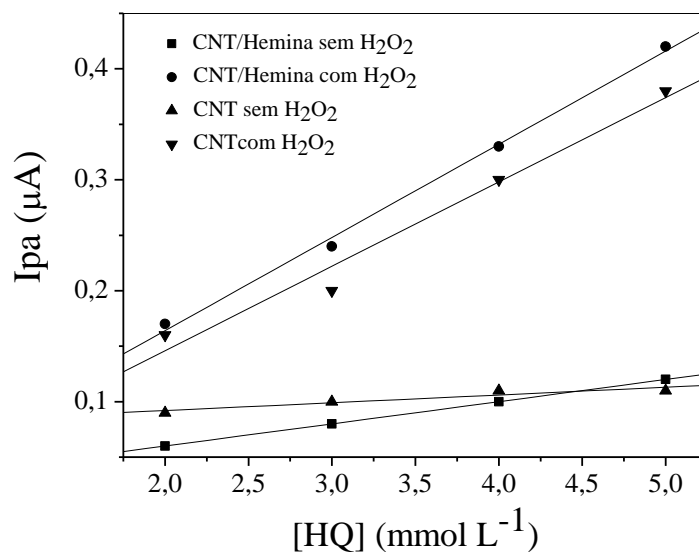
Na Figura 1.8(a), na presença de concentrações crescentes de HQ, também há evidência da redução de Fe(III) para Fe(II) no potencial de -0,4 V, conforme mecanismos descritos na literatura.^{39,46}

Figura 1.8. (a) Voltamogramas cíclicos com concentrações crescentes de hidroquinona ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ a $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ usando o eletrodo de CNT/hemina/Nujol®. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . $[\text{Tris-HCl}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$). (b) Curvas analíticas obtidas de cronoamperogramas de HQ na presença e ausência de H_2O_2 . $[\text{HQ}] = 2,0$ a 5 mmol L^{-1} , $[\text{Tris-HCl}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} 7,0$), $[\text{H}_2\text{O}_2] = 600,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial fixo em $-0,05 \text{ V}$.

(a)



(b)



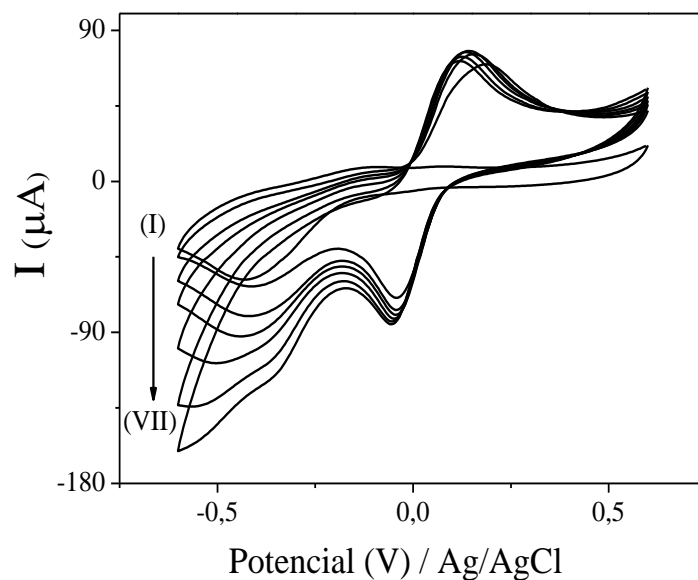
Entretanto, foi observado que o aumento na concentração de HQ, não houve aumento significativo nas correntes de redução do H_2O_2 , ou seja, não

há efeito mediador por parte do composto fenólico.⁴⁷ Neste caso, o processo redox de hemina e de H_2O_2 é independente da presença de HQ. Entretanto, estes resultados, não descartam que a hemina seja um composto biomimético neste sensor, pois a transferência direta de elétrons de Fe (III) para Fe(II) não está completamente bloqueada.

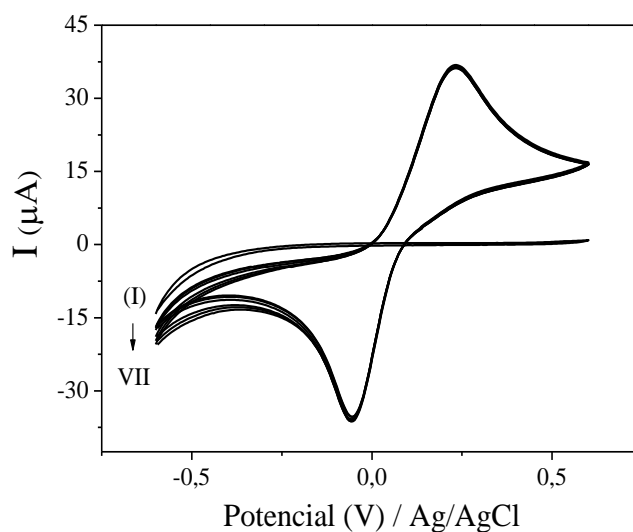
Além disso, foram construídas curvas analíticas por meio de cronopotenciometria na presença e ausência de H_2O_2 para ambos eletrodos de CNT/hemina/Nujol® e CNT/Nujol® (Figura 1.8(b)). Como observado, a sensibilidade para ambos eletrodos na presença de H_2O_2 é muito similar, mostrando que a hemina na pasta de CNT não catalisa a oxidação de HQ pelo H_2O_2 . A influência do aumento da concentração de H_2O_2 nos picos de oxidação/redução de HQ também foi investigada. A Figura 9 exibe os voltamogramas cíclicos de HQ na presença e ausência de concentrações crescentes de H_2O_2 , usando os eletrodos de CNT/hemina/Nujol® (Figura 1.9(a)) e CNT/Nujol® (Figura 1.9(b)). Como esperado, o pico de redução do peróxido de hidrogênio foi somente observado no eletrodo de CNT modificado com hemina. Um aumento na corrente de redução foi observado após a adição de H_2O_2 (Figura 1.9(a)), com um aumento insignificante na corrente catódica de HQ oxidada pela hemina. Se considerar a catálise de oxidação da HQ pela hemina na presença de H_2O_2 na forma semelhante aos biossensores baseados em peroxidase, esperar-se-ia uma diminuição do pico anódico de HQ com subsequente aumento do pico catódico, cuja observação não foi verificada.

Figura 1.9. Voltamogramas cíclicos realizados no tampão (I) e HQ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (II) com crescentes níveis (III a VII) de H_2O_2 ($0,5$ a $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$) usando os eletrodos de CNT/hemina/Nujol® (a) e CNT/Nujol® (b). Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Experimentos realizados em pH 7,0.

(a)



(b)



De acordo com o que foi mencionado, pode-se concluir que, o efeito mediador de elétrons da HQ foi insignificante no desempenho do sensor,

indicando que o sensor não age como eletrodo de segunda geração. Assim, foi decidido não usar H_2O_2 nas determinações de HQ.

A melhoria no desempenho do eletrodo de CNT na presença de hemina pode estar associada à baixa resistência do sensor e a elevada área eletroativa ($0,205 \text{ cm}^2$) comparada com a do eletrodo sem hemina ($0,124 \text{ cm}^2$). As áreas eletroativas dos eletrodos foram estimadas segundo a equação de Randles-Sevcik ($I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C$), onde I_p se refere ao pico de corrente anódico, n é o número de elétron, A é a área superficial do eletrodo, v é a velocidade de varredura e C a concentração de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. O $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi usado como uma molécula sonda, $n = 1$ e $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, usando o coeficiente angular de I_p vs $v^{1/2}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}/\text{cm}^3$ em $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.6. Determinação do coeficiente de difusão da hidroquinona

Para calcular o coeficiente de difusão da HQ, foi utilizada a técnica de cronoamperometria, variando-se a concentração de HQ de $0,025$ a $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em 60 s e $0,25 \text{ V}$ vs. $\text{Ag}/\text{Ag}/\text{KCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), conforme mostra o amperograma (Figura 1.10). Para HQ com coeficiente de difusão D , a corrente observada para a reação eletroquímica na condição limite de transporte de massa é descrita pela equação de Cottrell.⁴⁸ Os gráficos experimentais de I (μA) vs $t^{-1/2}$ ($\text{s}^{-1/2}$) foram usados para diferentes concentrações de HQ e o coeficiente de difusão médio de HQ ($6,34 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) foi obtido através da média dos coeficientes angulares das retas (Figura 1.11).

Figura 1.10. Cronoamperograma obtido para o eletrodo CNT/hemina/Nujol® em diferentes concentrações de hidroquinona (0,025 a 0,2 mmol L⁻¹). Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, t = 60 s e Epa = 0,25 V.

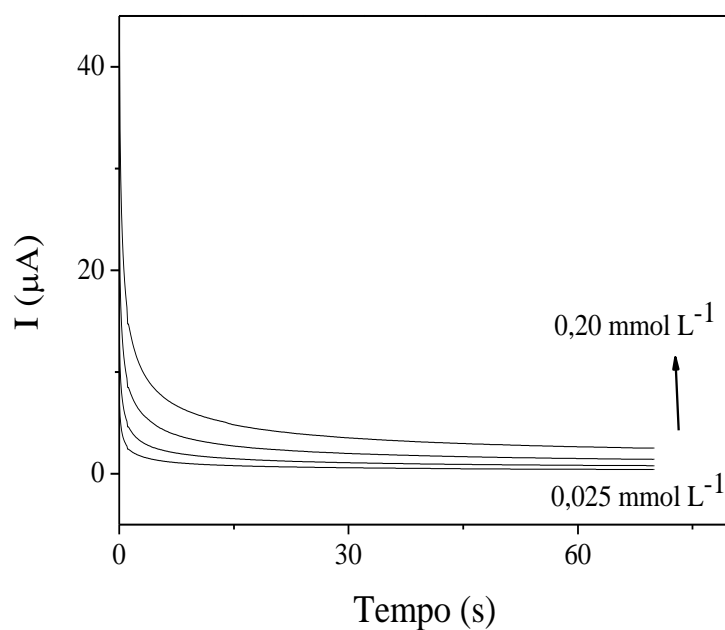
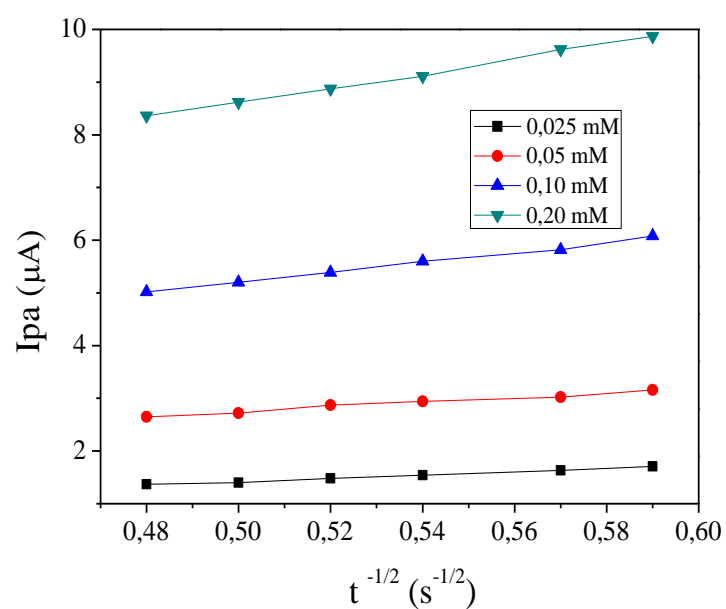


Figura 1.11. Gráficos de Ipa (µA) vs t^{-1/2} obtidos dos cronoamperogramas da Figura 10.

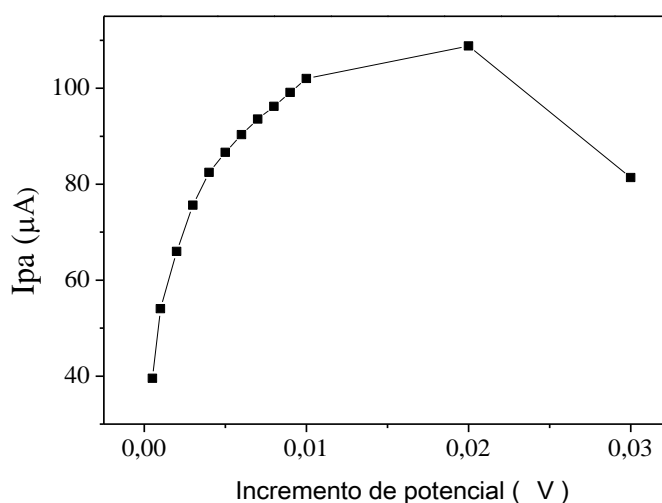


4.1.7. Estudo dos parâmetros relativos à técnica de voltametria de onda quadrada

A técnica de voltametria de onda quadrada (VOD) foi selecionada, pois foi a técnica que obteve melhor resposta analítica para HQ com este sensor proposto. Para obter os melhores parâmetros da voltametria de onda quadrada na oxidação do analito, primeiramente, variou-se o Incremento de potencial de 0,0005 a 0,04 V, mantendo-se constante as variáveis Amplitude (50 mV) e Frequência (50 Hz), conforme Figura 1.12.

Observando a Figura 1.12, à medida que se elevou o incremento de potencial, houve um aumento da corrente anódica da HQ até 0,02 V, com posterior decréscimo em 0,03 V. No entanto, observou-se que em 0,02 V, ocorreram alargamento e assimetria do pico⁴⁹, portanto, escolheu-se 0,01 V como incremento de potencial para dar continuidade aos experimentos.

Figura 1.12. Variação da I_{pa} de HQ (μA) em função do Incremento de potencial (V). Amplitude = 50 mV e Frequência = 50 Hz.



Após a escolha do incremento de potencial em 0,01 V, variou-se a frequência de 10 a 110 Hz e a amplitude de corrente permaneceu constante (50 mV), conforme Figura 1.13. Observa-se por meio da Figura 1.13, que a corrente de oxidação de HQ apresentou valor máximo em 70 Hz e em 90 Hz ocorre um decréscimo da mesma. Portanto, foi escolhida a frequência de 70 Hz para estudar a variação da amplitude.

Após verificar que os melhores resultados obtidos foram com incremento de potencial de 0,01 V e frequência de 70 Hz, variou-se a amplitude de 10 a 130 mV, conforme a Figura 1.14. Pode-se observar que à medida que se aumenta a amplitude, aumenta a corrente de oxidação da HQ até o máximo de 70 mV, após este valor, ocorreu um decréscimo na corrente. Este valor foi escolhido para dar continuidade aos próximos estudos

Figura 1.13. Variação da I_{pa} de HQ (μA) em função da Frequência. Amplitude = 50 mV e Incremento de potencial = 0,01 V.

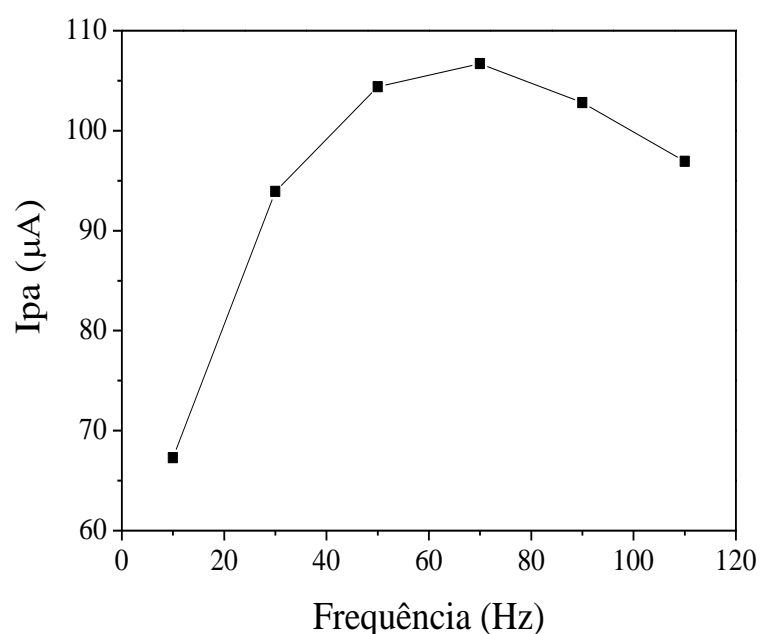
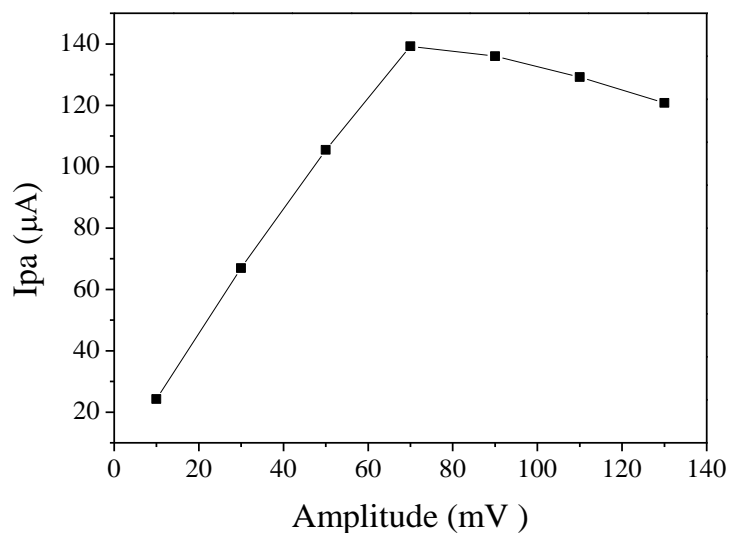


Figura 1.14. Variação da I_{pa} de HQ (μA) em função da Amplitude. Frequência = 70 Hz e Incremento de potencial = 0,01 V.



4.1.8. Estudo dos tampões e suas concentrações

Para avaliar o efeito do eletrólito suporte na oxidação da HQ, foram usados os tampões Tris-HCl, Hepes, Pipes e Fosfato, todos em pH 7,0, e na concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ sob as condições otimizadas (Tabela 1.2).

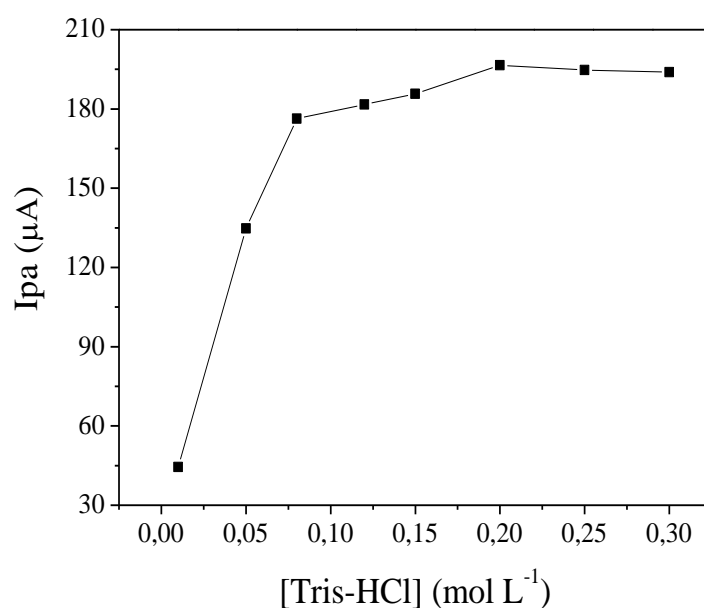
Tabela 1.2. Influência de diferentes tampões no potencial anódico, corrente anódica e largura de pico da HQ.

Tampão ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0)	E_{pa} (V)	I_{pa} (μA)	$W_{1/2 pa}$
Tris-HCl	0,313	151,10	0,231
Hepes	0,625	19,24	0,543
Fosfato	0,394	66,22	0,191
Pipes	0,374	163,90	0,221

Analisando a Tabela 1.2., a resposta de corrente anódica aumentou na seguinte ordem: Hepes (19,24) < Fosfato (66,22) < Tris-HCl (151,10) < Pipes (163,90). Como o potencial de oxidação foi menor no tampão Tris-HCl, este eletrólito foi escolhido para os próximos experimentos.

Após a escolha do tampão Tris-HCl, variou-se sua concentração de 0,01 a 0,30 mol L⁻¹ para estudar o efeito da concentração na oxidação da HQ. O sinal da corrente de pico anódico aumentou com o aumento da concentração do eletrólito até a concentração 0,20 mol L⁻¹, após este valor, a corrente teve uma queda em níveis de 0,25 e 0,30 mol L⁻¹, indicando que nesta faixa a migração dos íons chegou a um valor constante¹, como mostra a Figura 1.15. Entretanto, em 0,20 mol L⁻¹, o pico da corrente anódica não obteve boa resolução. Portanto, a concentração de 0,15 mol L⁻¹ foi selecionada.

Figura 1.15. Influência da concentração do eletrólito Tris-HCl (pH 7,0) na I_{pa} da HQ. [HQ] = 10⁻³ mol L⁻¹.



4.1.9. Características Analíticas do sensor de CNT/hemina/Nujol®

Para avaliar a linearidade do sensor preparado utilizando técnica de onda quadrada, foram variadas as concentrações de HQ, de 0 (branco analítico) a 120,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando os parâmetros descritos no item 4.1.7 (Amplitude = 70 mV, Frequência = 70 Hz e Incremento de potencial = 0,01 V) e tampão Tris-HCl 0,15 mol L^{-1} (pH 7,0), conforme Figura 1.16.

Através da curva analítica, Figura 1.17, foram obtidos os limites de detecção ($S/N = 3$)⁵⁰ de 0,78 $\mu\text{mol L}^{-1}$, quantificação ($S/N = 10$)⁵⁰ de 2,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e sensibilidade 0,145 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$.

A precisão do sensor em termos de repetibilidade ($n = 10$) avaliada como desvio padrão relativo (DPR) foi encontrada como sendo 1,33 e 1,08% para as respectivas concentrações de HQ, 3,0 e 110,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na Tabela 1.3, observa-se que o eletrodo desenvolvido apresentou baixo limite de detecção, apesar de outros eletrodos terem obtidos valores menores, mas apresenta a vantagem de usar CNT *in natura*, reduzido tempo na construção e baixo custo do mesmo, como descrito anteriormente.

Figura 1.16. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de hidroquinona (0,0 a 120,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos com o eletrodo CNT/hemina/Nujol®. [Tris-HCl] = 0,15 mol L^{-1} (pH 7,0), Amplitude = 70 mV, Frequência = 70 Hz e Incremento de potencial = 0,01 V.

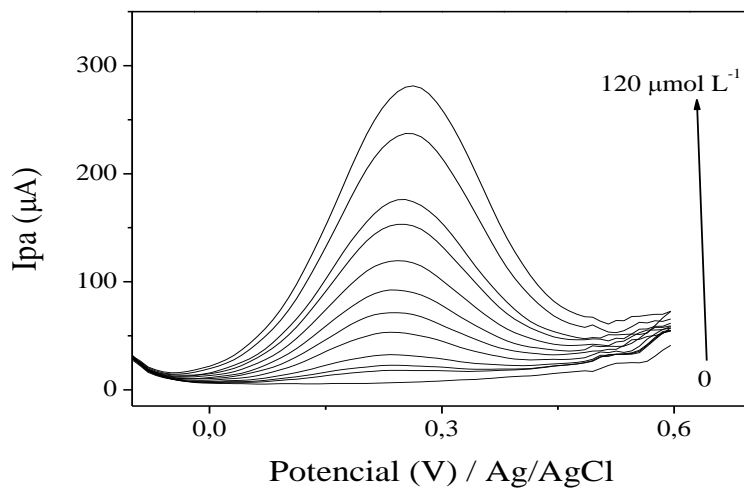


Figura 1.17. Curva analítica de HQ. [Tris-HCl] = 0,15 mol L^{-1} (pH = 7,0). Amplitude = 70 mV, Frequência = 70 Hz, Incremento de potencial = 0,01 V ($r = 0,996$).

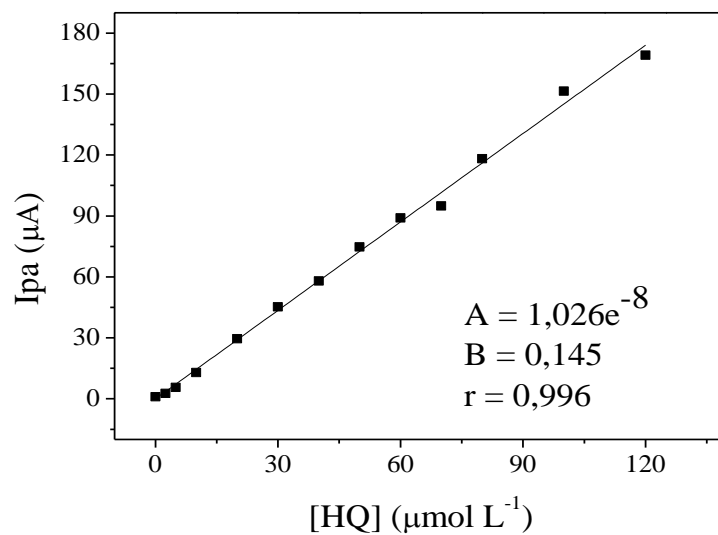


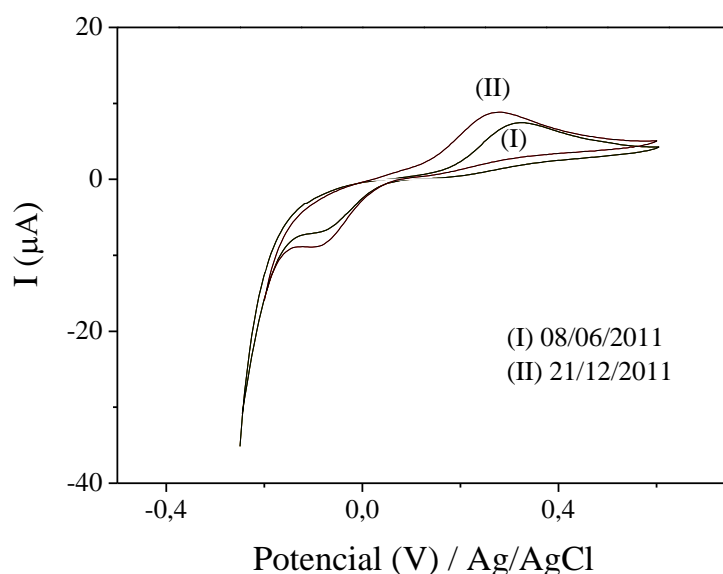
Tabela 1.3. Comparação do desempenho do eletrodo desenvolvido neste trabalho para HQ com outros eletrodos.

Eletrodo	Técnica	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
GCE/politionina	VPD	0,03	8
GS/MWCNT	VPD	0,75	42
Biossensor/poli(arginina)	VPD	0,57	51
Biossensor parafina/grafite	VOQ	8,10	1
Biossensor/quitosana	VOQ	2,60	52
Biossensor/quitosana	VOQ	2,00	53
MWCNT/OG/TT	VPD	$7,61 \times 10^{-3}$	54
CMG/ BMIMPF6	VPD	0,05	55
MWCNT/hemina/Nujol®	VOQ	0,78	Este trabalho

GCE = eletrodo de carbono vítreo; GS = folha de grafeno; MWCNT = nanotubo de carbono multi-paredes, OG = óxido de grafeno; TT = tertiofeno, CMG = carbono mesoporoso grafítico; BMIMPF6 = 1-butil 3-metilimidazólio hexafluorofosfato

A reprodutibilidade no preparo do sensor também foi verificada. Para isto, foram plotados voltamogramas cíclicos de pastas de CNT/hemina/Nujol® (20:10:70) feitas em 2 dias diferentes (08/06/11 (I) e 21/12/11 (II)), havendo apenas uma diferença de 2,5% no sinal de corrente anódica de um dia para outro, como mostra a Figura 1.18. Este sensor pode ser usado com a mesma pasta por aproximadamente 1 mês, podendo ser realizadas em torno de 200 medidas, com perda de 18% do valor inicial de corrente e guardado a temperatura ambiente.

Figura 1.18. Voltamogramas cíclicos usando o eletrodo de pasta de CNT/hemina/Nujol® (70:20:10) feita em 2 dias diferentes (08/06/11 e 21/12/11). [Tris-HCl] = 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,0), 50 mV s⁻¹ (3° ciclo).



4.1.10. Avaliação de interferentes na determinação de hidroquinona no sensor CNT/hemina/Nujol®

A determinação individual para cada composto fenólico foi realizada sob as melhores condições obtidas para técnica de onda quadrada, citadas no item 4.1.7, em uma solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de hidroquinona ($E_{pa} = 0,25$ V) e tampão Tris-HCl $0,15$ mol L⁻¹ (pH = 7,0), na faixa de -0,2 a 0,7 V. Os compostos estudados como possíveis interferentes foram guaiacol, catecol, N-acetil-p-aminofenol, ácido ascórbico e ácido úrico, cujos potenciais anódicos e porcentagem de sinal de corrente anódica estão apresentados na Tabela 1.4. O isômero catecol foi o que mais se aproximou do potencial da HQ. Estudos feitos simultaneamente com hidroquinona e com cada possível interferente, mostraram que apenas é possível separar os picos de ácido úrico e N-acetil-p-aminofenol. Porém, para guaiacol, catecol e ácido ascórbico

houve sobreposição de picos anódicos não sendo possível separá-los com o eletrodo desenvolvido neste trabalho. No entanto, o eletrodo CNT/hemina/Nujol® apresenta a vantagem de responder a outros compostos fenólicos, além da HQ, nesta faixa de potencial -0,2 a 0,7 V. Os compostos uréia, 2-nitrofenol e 4-nitrofenol não apresentaram potenciais de oxidação nesta faixa de potencial estudada, não interferindo, portanto, nas medidas de HQ.

Tabela 1.4. Potenciais de oxidação da HQ e dos interferentes estudados na faixa de potencial de -0,2 a 0,7 V e seus respectivos sinais.

Interferentes	Epa / V	% sinal Ipa
Hidroquinona	0,25	100,00
2-nitrofenol	-	-
4-nitrofenol	-	-
Guaiacol	0,66	7,23
N-acetil-p-aminofenol	0,50	116,90
<i>Catecol</i>	0,36	102,17
Ácido úrico	0,43	87,66
Ácido ascórbico	0,40	34,50
Uréia	-	-

4.1.11. Aplicação do Método Proposto e Exatidão

O sensor proposto foi utilizado para determinar HQ em cinco cosméticos usando o método voltamétrico. O preparo das amostras foi descrito no item 3.3.1. Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com o método de HPLC de acordo com a técnica de referência³⁷, descrita no item 3.4. A Tabela 1.5 mostra que os valores de HQ determinados pelo sensor em amostras reais foram muito semelhantes aos valores rotulados e não há diferença significativa no nível de confiança de 95% (teste-t pareado) quando comparado com o método cromatográfico (HPLC). A principal vantagem do método proposto comparado ao método

cromatográfico é a não utilização de solventes orgânicos e o tempo de análise. O método cromatográfico utiliza metanol na fase móvel e na dissolução da amostra, além do tempo de corrida ser em torno de 10 minutos. O método voltamétrico faz a determinação direta do analito em fase aquosa, após a solubilização dos cremes cosméticos em água, sem prévia filtração, e o tempo de análise é bastante rápido utilizando a voltametria de onda quadrada.

Tabela 1.5. Determinação de hidroquinona usando o sensor CNT/hemina/Nujol® em formulações farmacêuticas e validação em HPLC como técnica de referência.

Amostra	Voltametria (presente sensor) (g/100g HQ)	HPLC (g/100g HQ)	Erro relativo 1 (Er ₁) (%)	Erro relativo 2 (Er ₂) (%)
I (2g/100g)	1,92±0,07	1,98±0,11	-3,03	-4,00
II (4g/100g)	4,04±0,03	4,03±0,11	0,25	0,75
III (4g/100g)	4,03±0,02	4,18±0,29	-1,22	4,50
IV (4g/100g)	3,81±0,18	3,82±0,04	-0,25	-4,50
V (4g/100g)	4,07±0,07	4,05±0,04	0,49	1,25

Média seguida do desvio padrão, nível de confiança de 95% (teste t-pareado) N = 3.
Er₁ = voltametria (presente sensor) vs. cromatografia; Er₂ = voltametria (presente sensor) vs. valor rotulado.

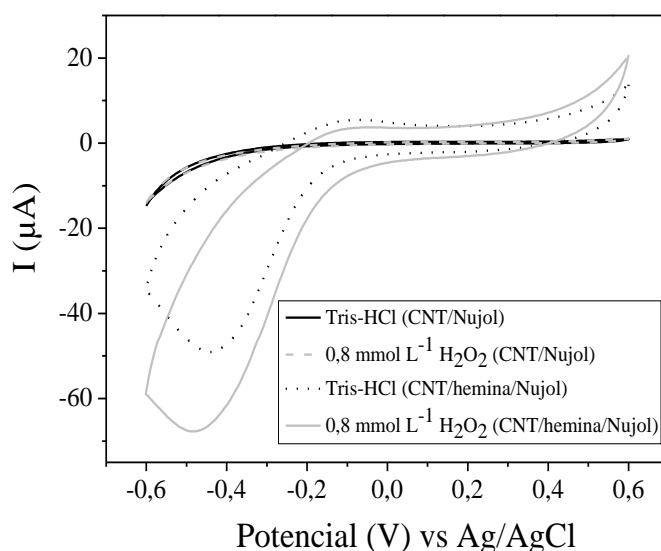
4. 2. SENSOR VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

4.2.1. Avaliação do desempenho do sensor voltamétrico para H₂O₂ e estudo da melhor composição da pasta CNT/hemina/Nujol®

Inicialmente, a importância da hemina no sensor para a determinação de H₂O₂ foi examinada. A Figura 1.19 mostra os voltamogramas cíclicos realizados no intervalo de -0,6 a 0,6 V em Tris-HCl

0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) para os sensores não modificado (CNT/Nujol®) e o modificado (CNT/hemina/Nujol®) em presença e ausência de H₂O₂.

Figura 1.19. Voltamogramas cíclicos realizados em Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) usando eletrodo não modificado de CNT/Nujol® e modificado CNT/hemina/Nujol® na ausência e presença de H₂O₂.



Na ausência de H₂O₂, usando o sensor modificado, observa-se um pequeno pico de oxidação em -0,125 V e um pico alto catódico em -0,4 V, que corresponde ao processo de oxidação de Fe(II)/Fe(III) e redução Fe(III)/Fe(II), respectivamente.³⁹ Nenhuma corrente de pico foi observada utilizando o sensor não modificado, mesmo na presença de H₂O₂. Por outro lado, na presença de 0,8 mmol L⁻¹ de H₂O₂, o pico de corrente observado em -0,4 V para o sensor modificado foi aumentado sugerindo que a hemina exibe propriedades catalíticas para a redução de H₂O₂ como observado nos biossensores baseados em peroxidase. O estudo da melhor composição da pasta foi realizado em diferentes proporções de CNT/hemina/Nujol®, tais

como 20:10:70, 35:35:30, 10:20:70% (m/m/m), como pode ser observado na Tabela 1.6.

Tabela 1.6. Correntes catódicas de peróxido de hidrogênio em diferentes proporções de pasta de CNT/hemina/Nujol®.

CNT/hemina/Nujol® % (m/m/m)	Corrente catódica de [H ₂ O ₂] 0,2 mmol L ⁻¹	Corrente catódica de [H ₂ O ₂] 0,4 mmol L ⁻¹
20:10:70	-2,08 μA	-5,04 μA
35:35:30	-0,95 μA	-3,48 μA
10:20:70	Não observada	Não observada

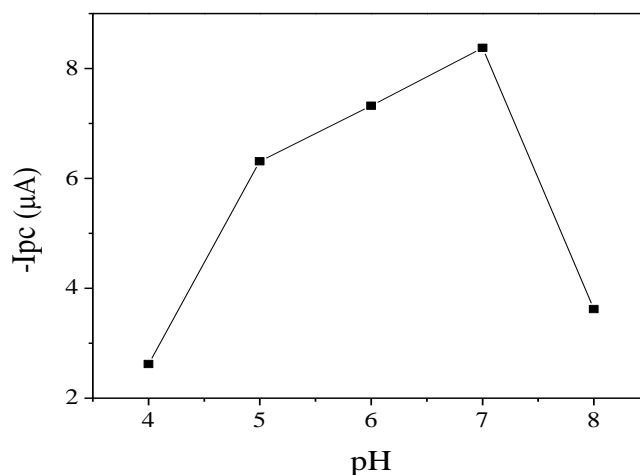
Observando a Tabela 1.6, nota-se que o aumento da quantidade de hemina na pasta diminui o sinal da corrente de redução do peróxido de hidrogênio, não havendo mais diferença entre o branco analítico e a adição de peróxido. Assim como no estudo da hidroquinona, quando se aumenta a quantidade de hemina, a mesma mascara o efeito do CNT diminuindo o sinal analítico. Assim, utilizou-se a composição de CNT/hemina/Nujol® de 20:10:70% (m/m/m) para o restante dos experimentos.

4.2.2. Estudo do pH

Para o estudo de pH, o mesmo foi variado de 4,0 a 8,0 em tampão Tris-HCl (0,05 mol L⁻¹) e H₂O₂ 0,6 mmol L⁻¹, como observado na Figura 1.20.

Observando a Figura 1.20, verifica-se que em pH 7,0 há um aumento do sinal da corrente catódica de H₂O₂, o qual corresponde ao pH ótimo das enzimas peroxidases.⁴² Em meio alcalino, a hemina é provavelmente inativada.⁴² Portanto, pH 7,0 foi escolhido para o restante dos experimentos.

Figura 1.20. Dependência do I_{pc} (μA) com pH para o eletrodo de CNT/hemina/Nujol®. $[Tris-HCl] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 0,6 \text{ mmol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , 3º ciclo.



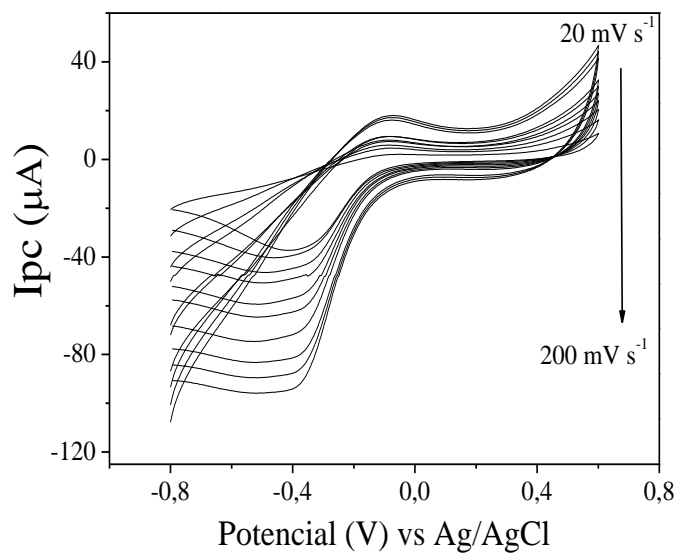
4.2.3. Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura no comportamento voltamétrico de H_2O_2 foi realizado no eletrodo modificado CNT/hemina/Nujol® em Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, como mostrado na Figura 1.21(a). Foram utilizadas velocidades de varredura de 20 a 200 mV s^{-1} .

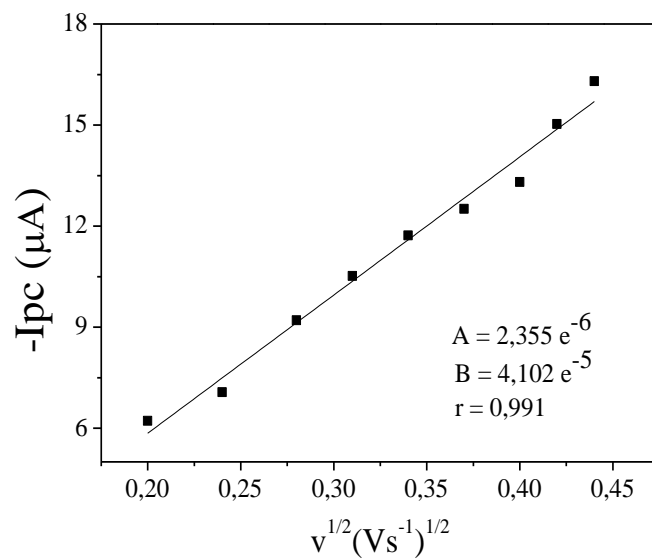
Observando a Figura 1.21(a), nota-se que à medida que a velocidade de varredura aumenta, há também um aumento no pico catódico de H_2O_2 . Na Figura 1.21(b), observa-se que há linearidade ($r = 0,991$) entre I_{pc} e $v^{1/2}$, mostrando que o processo de redução de H_2O_2 é controlado por difusão.

Figura 1.21. (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CNT/hemina/Nujol® na presença de $0,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ em diferentes velocidades de varredura. (b) Variação I_{pc} (μA) de H_2O_2 versus $v^{1/2}$ (mV s^{-1}) $^{1/2}$ ($r = 0,991$).

(a)



(b)



4.2.4. Otimização para determinação de H₂O₂ usando voltametria linear

Após otimização do pH e da composição da pasta do sensor usando voltametria cíclica, a voltametria linear foi usada para determinação de H₂O₂, devido à melhor resposta analítica para o sensor proposto. Assim, a influência da velocidade de varredura na redução de H₂O₂ por voltametria linear foi avaliada no intervalo de 20 a 120 mV s⁻¹ (Tabela 1.7). Como pode ser observado, o maior pico de corrente catódica de H₂O₂ foi obtido usando velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, a qual foi escolhida para a determinação de H₂O₂ em amostras reais. Velocidades de varredura superiores a 100 mV s⁻¹ provocam diminuição, alargamento e assimetria do pico.

Tabela 1.7. Correntes catódicas de peróxido de hidrogênio em diferentes velocidades de varredura na presença de 0,4 mmol L⁻¹ de H₂O₂.

Velocidade de Varredura (mV s ⁻¹)	I _{pc} (μA)
20	0,26
40	2,79
60	11,49
80	21,48
100	28,47
120	26,24

4.2.5. Características analíticas e aplicação do sensor voltamétrico

Os voltamogramas de voltametria linear obtidos aumentando-se a concentração de H₂O₂ de 0,2 - 1,4 mmol L⁻¹ estão apresentados na Figura 1.22(a). A equação linear encontrada foi I_{pc} = + 1,76 x 10⁻⁶ + 3,62x10⁻² [H₂O₂ mmol L⁻¹] e coeficiente de correlação (r = 0,999) (Figura 1.22(b)).

Os limites de detecção ($S/N = 3$)⁵⁰ e quantificação ($S/N = 10$)⁵⁰, bem como a sensibilidade foram de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $41,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $3,62 \times 10^{-2} \text{ mA mol}^{-1} \text{ L}$, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram superiores aos relatados em estudos anteriores.^{26,27,56} Contudo, a alta sensibilidade não é considerada um parâmetro fundamental para a determinação de peróxido de hidrogênio em enxaguantes bucais e clareadores dentais em gel.

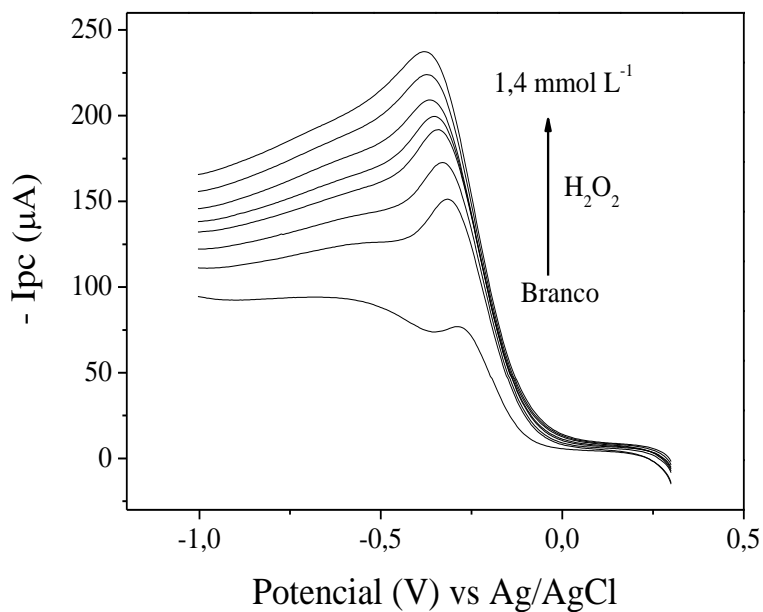
O sensor desenvolvido apresenta outras vantagens interessantes para o controle de qualidade destas formulações odontológicas, incluindo o uso do nanotubo de carbono *in-natura*, sem pré-purificação ou funcionalização; baixo custo e menor tempo de preparo do sensor, boas estabilidade e reprodutibilidade. O sensor CNT/hemina/Nujol® pode ser armazenado a temperatura ambiente, o tempo de vida médio é de um mês e pode ser aplicado em análises de amostras reais, tal como será demonstrado.

A precisão do sensor inter-dia em termos de reprodutibilidade ($n = 10$) avaliada como desvio padrão relativo (% RSD) foi de 3,24 e 1,31% para as respectivas concentrações de H_2O_2 de 0,4 e 1,2 mmol L^{-1} . A precisão intra-dia foi encontrada como sendo de 1,68 e 2,53% para as respectivas concentrações de H_2O_2 , 0,4 e 1,2 mmol L^{-1} .

A reprodutibilidade no preparo do sensor também foi verificada preparando-se pastas em dias diferentes e submetidas à voltametria linear para a determinação de H_2O_2 . A Figura 1.23 mostra o comportamento similar dos voltamogramas de H_2O_2 0,4 mmol L^{-1} usando o sensor preparado em dias diferentes.

Figura 1.22. (a) Voltamogramas de voltametria linear do eletrodo CNT/hemina/Nujol® em diferentes concentrações de H_2O_2 de 0,2 a 1,4 mmol L^{-1} . (b) Curva analítica de H_2O_2 . $[\text{Tris-HCl}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0), velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} .

(a)



(b)

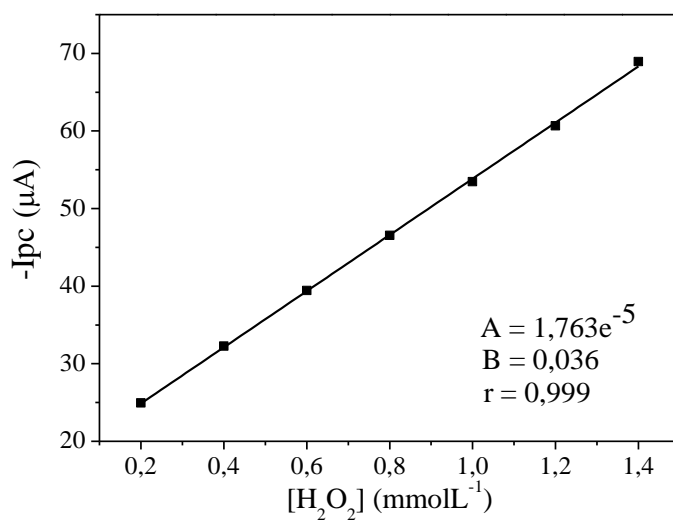
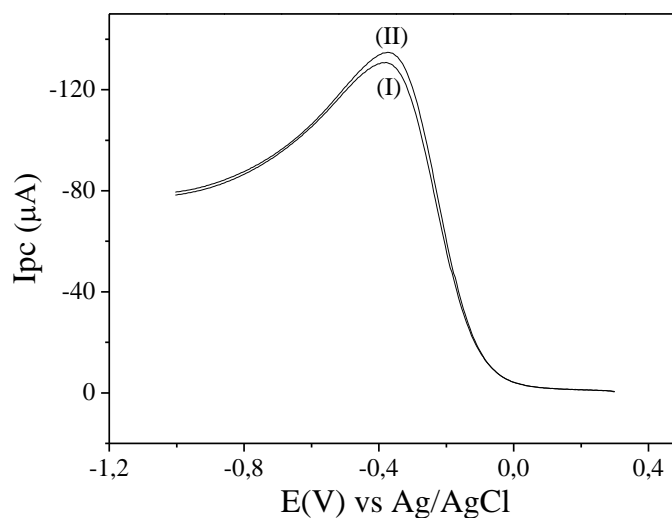


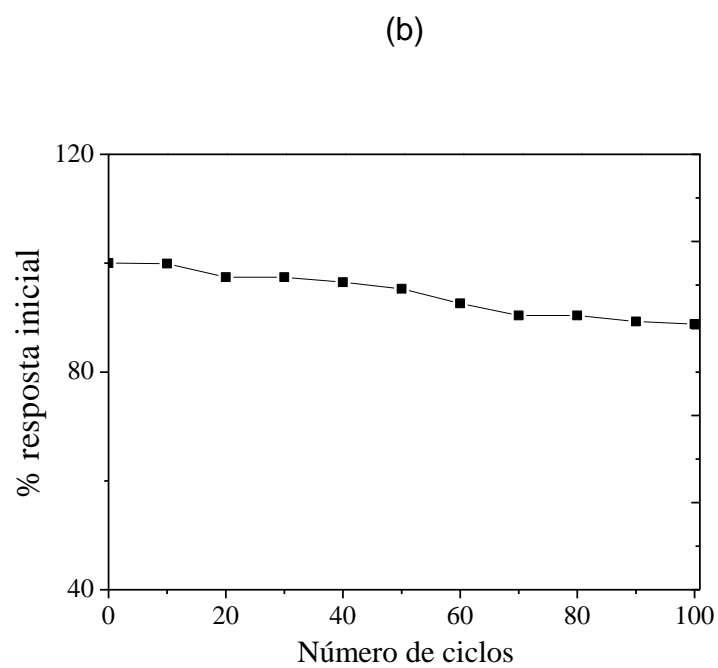
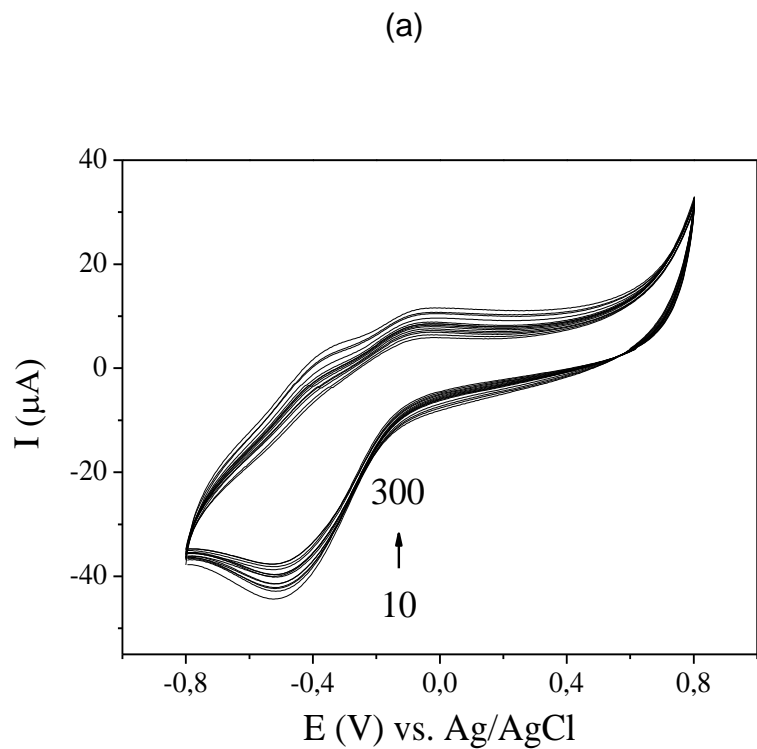
Figura 1.23. Voltamogramas lineares de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 usando pasta de CNT/hemina/Nujol® preparada em 2 dias diferentes (30/09/12 (I) e 21/12/12 (II)). $[\text{Tris-HCl}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0), 100 mV s^{-1} .



Houve uma pequena diferença de 3% no sinal de corrente, sugerindo assim a excelente reprodutibilidade na preparação do sensor. A estabilidade operacional do sensor CNT/hemina/Nujol® foi também investigada realizando-se 300 ciclos voltamétricos entre 0,8 e -0,8 V, a 50 mV s^{-1} , em tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 , Figura 1.24(a).

Observando a Figura 1.24(b), houve uma redução de 11,2% na corrente de pico no centésimo ciclo. Após 300 ciclos, houve perda de apenas 16% do valor inicial de corrente. Estes resultados podem ser considerados satisfatórios, tendo em vista que em outro estudo²⁶, usando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de CNT/Nujol®, a estabilidade operacional do sensor foi inferior (perda de 70% no sinal de corrente) ao final dos 300 ciclos voltamétricos.

Figura 1.24. (a) Estabilidade operacional realizada no sensor CNT/hemina/ Nujol® por voltametria cíclica por 300 ciclos consecutivos em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) e H₂O₂ 0,4 mmol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹; (b) % da resposta inicial versus o número de ciclos.



O sensor proposto foi aplicado em dois enxaguantes bucais (A e B) e em clareador dental em gel (C), conforme descrito no item 3.3.2. Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com o método volumétrico de oxidação-redução (Iodometria) de acordo com a técnica de referência.³⁸ Observando a Tabela 1.8, nota-se que as quantidades de H₂O₂ determinadas pelo sensor em amostras reais foram muito semelhantes quando comparadas ao método volumétrico, não havendo diferença significativa no nível de confiança de 95% (teste-t pareado). Portanto, o método proposto mostrou-se adequado para a determinação voltamétrica direta de H₂O₂ em formulações para uso odontológico, sem tratamento prévio da amostra.

Tabela 1.8. Determinação de peróxido de hidrogênio em antissépticos bucais e clareador dental em gel usando o método volumétrico e o método proposto.

Amostras	Sensor	Volumétrico	Erro relativo (Er ₁) (%)	Erro relativo (Er ₂) (%)
A (1,5%, m/v)	1,47 ± 0,04	1,45 ± 0,03	1,38	2,00
B (2,0%, m/v)	2,01 ± 0,10	2,03 ± 0,01	-0,98	0,50
C (6,0%, m/m)	6,03 ± 0,13	6,02 ± 0,01	0,33	0,50

Média seguida do desvio padrão, nível de confiança 95%, (Teste-t pareado), N = 3.
Er₁ = sensor proposto vs método volumétrico; Er₂ = sensor proposto vs valor do rótulo.

5. CONCLUSÕES

O sensor desenvolvido com base em nanotubos de carbono, sem prévios tratamentos, e hemina para a determinação de hidroquinona e peróxido de hidrogênio, mostrou-se mais efetivo que os eletrodos de carbono vítreo e o de MWCNT não modificado. Os estudos mostraram que a hemina apresenta efeito catalítico no processo de redução de peróxido de hidrogênio,

mas o efeito mediador por parte da HQ não foi observado para o eletrodo contendo hemina. As técnicas voltamétricas que apresentaram melhores respostas analíticas para HQ e H_2O_2 foram voltametria de onda quadrada e voltametria linear, respectivamente. O sensor proposto para ambos analitos estudados, mostrou-se simples, rápido de preparar, reproduzível, estável e preciso. Além disso, o método desenvolvido não necessita de tratamento prévio da amostra e pode ser aplicado em formulações farmacêuticas e de higiene oral com precisão e exatidão.

6. REFERÊNCIAS

1. Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*, v. 52, p. 681–689, 2000.
2. Costa, A.; Cordero, T.; Marmirori, J.; Moisés, T. A.; Alves, C. R. T. Association of emblica, licorice and belides as an alternative to hydroquinone in the clinical treatment of melisma. *An. Bras. Dermatol.*, v. 85, p. 613-20, 2010.
3. Ribas, J.; Cavalcante, M. S. M.; Schettini, A. P. M. Ocronose exógena induzida por hidroquinona: relato de quatro casos. *An. Bras. Dermatol.*, v.85. p. 699-703, 2010.
4. Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.*, v.16, p. 101–110, 2003.
5. <http://www.fda.gov/> acessado dia 31/07/2014.
6. <http://portal.anvisa.gov.br/> acessado dia 30/07/2014.
7. Toyoda, Y.; Katoh, N.; Kuwabara, K. Dependence of redox characteristics in Prussian blue-modified electrode on pH of electrolytic solution. *Mat. Sci. Engineering B*, v. 108, p. 271-277, 2004.
8. Ahammad, A. J. S.; Rahman, M. M.; Xu, G. R.; Kim, S.; Lee, J. J. Highly sensitive and simultaneous determination of hydroquinone and catechol at poly(thionine) modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta*, v. 56, p. 5266-5271, 2011.
9. Xie, T.; Liu, Q.; Shi, Y.; Liu, Q. Simultaneous determination of positional isomers of benzenediols by capillary zone electrophoresis with square wave amperometric detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1109, p. 317-321, 2006.
10. Timur, S.; Pazarlioglu, N.; Pilloton, R.; Telefonu, A. Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida*. *Talanta*, v. 61, p. 87-93, 2003.
11. Zhao, G.; Li, M.; Hu, Z.; Li, H.; Cao, T. Electrocatalytic redox of hydroquinone by two forms of L-Proline. *J. Mol. Catal. A*, v. 255, p. 86, 2006.

12. Wang, L. H.; Kuo, Y. P. Simultaneous quantitative determination of resorcinol and 1-naphthol in haircolor products by high-performance liquid chromatography. *Chromatography*, v., 49, p. 208-211, 1999.
13. Nagaraja, P.; Vasantha, R. A.; Sunitha, K. R. A new sensitive and selective spectrophotometric method for the determination of catechol derivatives and its pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 25, p. 417-424, 2001.
14. Silva, R. A. B.; Montes, R. H. O.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal usando um microdispositivo contendo partículas de Azul da Prússia. *Quim. Nova*, v. 6, p. 987-991, 2011.
15. Coldebellal, C. R.; Ribeiro, A. P. D.; Saconol, N. T.; Trindade, F. Z.; Hebling, J.; Costa, C. A. S. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz. Dent. J.*, v. 20, p. 267-274, 2009.
16. Gökyay, O.; Müjdeci, A.; Algin, E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J. Endod.*, v. 30, p. 887-889, 2004.
17. Hurdis, E. C.; Romeyn, H. Accuracy of Determination of Hydrogen Peroxide by Cerate Oxidimetry. *Anal. Chem.*, v. 26, p. 320-325, 1954.
18. Matsubara, C.; Kawamoto, N.; Takamura, K. Oxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium (IV) : An Ultra-high Sensitivity Spectrophotometric Reagent for Hydrogen Peroxide. *Analyst*, v. 117, p. 1781-1784, 1992.
19. Li, J.; Dasgupta, P. K. Measurement of Atmospheric Hydrogen Peroxide and Hydroxymethyl Hydroperoxide with a Diffusion Scrubber and Light Emitting Diode-Liquid Core Waveguide-Based Fluorometry. *Anal. Chem.*, v. 72, p. 5338-5347, 2000.
20. Nakashima, K.; Maki, K.; Kawaguchi, S.; Akiyama, S.; Tsukamoto, Y.; Kazuhiro, I. Flow-Injection Analysis with Chemiluminescence Detection of Glucose and Uric Acid Using Immobilized Enzyme Reactor. *Anal. Sci.*, v. 7, p. 715-718, 1991.
21. Ferapontova, E. E.; Grigorenko, V.; Egorov, A. M.; Borchers, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L. Mediatorless biosensor for H₂O₂ based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold. *Biosens. Bioelectron.*, v. 16, p. 147-157, 2001.
22. Sun, Y. X.; Zhang, J. T.; Huang, S. W.; Wang, S. F. Hydrogen peroxide biosensor based on the bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase

incorporated in a new hydrogel film. *Sens. Actuators B*, v. 124, p. 494-500, 2007.

23. Zhang, W. J.; Li, G. X. Third-generation biosensors based on direct electron transfer of proteins. *Anal. Sci.*, v. 20, p. 603-609, 2004.

24. Shumyantseva V. V.; Ivanov, Y. D.; Bistolas, N. F.; Scheller, W.; Archakov, A. I.; Wollenberger, U. Direct electron transfer of cytochrome p450 2b4 at electrodes modified with nonionic detergent and colloidal clay nanoparticles. *Anal. Chem.*, v. 76, p. 6046-6052, 2004.

25. Moody, G. J.; Sanghera, G. S.; Thomas, J. D. R. Amperometric enzyme electrode system for the flow injection analysis of glucose. *Analyst*, v. 111, p. 605-609, 1986.

26. Valentini, F.; Cristofanelli, L.; Carbone, M.; Palleschi, G. Glassy carbon electrodes modified with hemin-carbon nanomaterial films for amperometric H_2O_2 and NO_2^- detection. *Electrochim. Acta*, v. 63, p. 37-46, 2012.

27. Chen, J.; Zhao, L.; Bai, H.; Shi, G. Electrochemical detection of dioxygen and hydrogen peroxide by hemin immobilized on chemically converted graphene. *Electroanal. Chem.*, v. 657, p. 34-38, 2011.

28. Bian X.; Guo, K.; Liao, L.; Xiao, J.; Kong, J.; Ji, C.; Liu, B. Nanocomposites of palladium nanoparticle-loaded mesoporous carbon nanospheres for the electrochemical determination of hydrogen peroxide. *Talanta*, v. 99, p. 256-261, 2012.

29. Silva, R. A. B.; Montes, R. H. O.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal usando um microdispositivo contendo partículas de Azul da Prússia. *Quim. Nova*, v. 6, p. 987-991, 2011.

30. Kozan, J. V. B.; da Silva, R. P.; Serrano, S. H. P.; Lima, A. W. O.; Angnes, L. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L.) fibers. *Anal. Chim. Acta*, v. 591, p. 200-207, 2007.

31. Wang B.; Dong, S. Sol-gel-derived amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on methylene green incorporated in Nafion film. *Talanta*, v. 51, p. 565-572, 2000.

32. Wang J.; Musameh, M.; Lin, Y. Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors. *Am. Chem. Soc.*, v. 125, p. 2408-2409, 2003.

33. Nandini, S.; Nalini, S.; Manjunatha, R.; Shanmugam, S.; Melo, J. S.; Suresh, G. S. Electrochemical biosensor for the selective determination of hydrogen peroxide based on the co-deposition of palladium, horseradish

peroxidase on functionalized-graphene modified graphite electrode as composite. *J. Electroanal. Chem.*, v. 689, p. 233-242, 2013.

34. Chattopadhyay, K.; Mazumdar, S. Direct electrochemistry of heme proteins: effect of electrode surface modification by neutral surfactants. *Bioelectrochemistry*, v. 53, p. 17 – 24, 2000.

35. Liu, S.; Dai, Z.; Chen, H.; Ju, H.; Liu, S.; Dai, Z.; Chen, H.; Ju, H. Immobilization of hemoglobin on zirconium dioxide nanoparticles for preparation of a novel hydrogen peroxide biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, v.19, p. 963-969, 2004.

36. Chen, H.; Dong, S. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in sol-gel-derived ceramic-carbon nanotube nanocomposite film. *Biosens. Bioelectron.*, v. 22, p. 1811-1815, 2007.

37. García, P. López; M. I. Rocha; Miritello Santoro; E.R.M. Kedor-Hackman; A. Kumar Singh. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, p. 764-768, 2005.

38. Vogel, A. I., G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, and R. C. Denney. 1992. *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro, BR: Guanabara Koogan.

39. Ma, Q.; Ai, S.; Yin, H.; Chen, Q.; Tang, T. Towards the conception of an amperometric sensor of l-tyrosine based on Hemin/PAMAM/MWCNT modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta*, v. 55, p. 6687-6694, 2010.

40. Kang, T. F.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. Voltammetric behaviour of dopamine at nickel phthalocyanine polymer modified electrodes and analytical applications. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 354, 343.

41. Liu, X.; Ding, Z.; He, Y.; Xue, Z.; Zhao, X.; Lu, X. Electrochemical behavior of hydroquinone at multi-walled carbon nanotubes and ionic liquid composite film modified electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 27–32, 2010.

42. Guibault, G. G.; Lubrano, G. J. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta*, v. 64, p. 439-455, 1973.

43. Liu, Z.; Wang, Z.; Cao, Y.; Jing, Y.; Liub, Y. High sensitive simultaneous determination of hydroquinone and catechol based on graphene/BMIMPF6 nanocomposite modified electrode. *Sens. Actuators B*, v. 157, p. 540– 546, 2011.

44. Teófilo, R. F.; Reis, E. L.; Reis, C.; Da Silva, G. A.; Kubota, L. T. Experimental Design Employed to Square Wave Voltammetry Response Optimization for the Glyphosate Determination. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 15, p. 865-871, 2004.
45. Gosser, D. K.; *Cyclic Voltammetry*, VCH: New York 1994.
46. Rosatto, S. S.; Kubota, L. T.; Neto, G. O. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilizing on silica-titanium. *Anal. Chim. Acta*, v. 390, p. 65-72, 1999.
47. Gong, K.; Yan, Y.; Zhang, M.; Su, L.; Xiong, S.; Mao, L. *Electrochemistry and Electroanalytical Applications of Carbon Nanotubes: A Review*. *Analytical Sciences*, v. 21, p. 1383-1393, 2005.
48. Bard, A. J.; L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods Fundamentals and Application*, 2nd e., Wiley, New York, 2001.
49. Furlanetto, S.; Orlandini, S.; Aldini, G.; Gotti, R.; Dreassi, E.; Pinzauti, S. Designing experiments to optimise and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide. *Anal. Chem. Acta*, v. 413, p. 229-239, 2000.
50. Long, G. L.; Winefordner, J. D. Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, v. 55, p. 712-724, 1983.
51. Raghua, P.; Reddya, T. M.; Reddaiaha, K.; Jaidevb, L. R.; Narasimhab, G. A novel electrochemical biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on Ag-nanoparticles/poly(l-arginine) modified carbon paste electrode toward the determination of pyrogallol/hydroquinone. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 377– 385, 2013.
52. Oliveira, I. R. W. Z.; Vieira, I.C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Quim. Nova*, v. 29, p. 932-939, 2006.
53. Oliveira I. R. W. Z.; I.C. Vieira. Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*). *Enzy. Microb. Technol.*, v. 38, p. 449-456, 2006.
54. Han, H. S.; You, J.-M.; Seol, H.; Jeong, H.; Jeon, S. Electrochemical sensor for hydroquinone and catechol based on electrochemically reduced GO–terthiophene–CNT. *Sens. Actuators B*, v. 194, p. 460– 469, 2014.
55. Hong, Z.; Zhou, L.; Li, J.; Tang, J. A sensor based on graphitic mesoporous carbon/ionic liquids composite film for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Electrochim. Acta*, v. 109, p. 671– 677, 2013.

56. Turdean, G. L.; Popescu; I. C.; Curulli; A.; Palleschi, G. Iron (III) protoporphyrin IX—single-wall carbon nanotubes modified electrodes for hydrogen peroxide and nitrite detection. *Electrochim. Acta*, v. 51, p. 6435-6441, 2006.

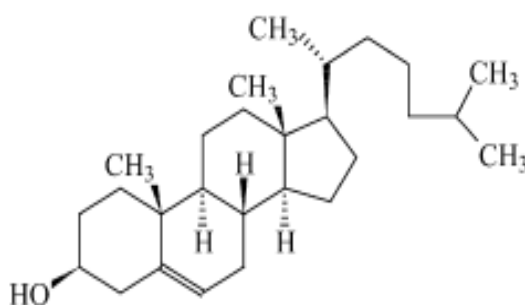
CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA EXTRAÇÃO DE COLESTEROL EM ALIMENTOS

1. INTRODUÇÃO

O colesterol (CHO, Figura 2.1) é um esteroide metabólito encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. É um componente estrutural essencial das membranas das células de mamíferos, para estabelecer a permeabilidade da membrana adequada e fluidez. Além disso, este composto é um importante componente para a fabricação de ácidos biliares, hormônios esteroides, e diversas vitaminas solúveis em gordura¹.

Figura 2.1. Estrutura do colesterol.



Este composto é essencial para o corpo humano em baixas quantidades por ser importante em diversas funções biológicas como a manutenção de hormônios.^{2,3} No entanto, o colesterol em altos níveis no sangue, aumenta o risco de doenças cardíacas por estar envolvido no desenvolvimento de arterosclerose, uma doença que provoca um acúmulo de placas de gorduras nas artérias ao longo dos anos impedindo a passagem do sangue. As causas da arterosclerose podem ser de origem genética, mas o principal motivo para o acúmulo é comportamental, ou seja, além do colesterol alto, a obesidade,

sedentarismo, tabagismo, hipertensão e consumo excessivo de álcool são as principais razões para a ocorrência de entupimentos das artérias.⁴

O maior número de mortes de indivíduos adultos no mundo se dá pela doença cardiovascular. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 29,4% de todas as mortes registradas no País em um ano. Isso significa que mais de 308 mil pessoas faleceram principalmente de infarto e acidente vascular cerebral (AVC). Estudos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia mostram que 60% dessas vítimas são homens, com média de idade de 56 anos. A alta frequência do problema coloca o Brasil entre os 10 países com maior índice de mortes por doenças cardiovasculares.⁵

Vários estudos têm demonstrado a relação de níveis aumentados do colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) com o risco de desenvolvimento da doença.⁶ O V Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias estratifica faixas de valores de LDL-C para avaliação do risco para o desenvolvimento da doença arterial coronariana: desejável abaixo de 130 mg/dL, limítrofe entre 130-159 mg/dL, e alto a partir de 160 mg/dL⁷. Estas faixas de valores são bastante estreitas, de modo que o *National Cholesterol Education Program – NCEP* estabeleceu que os laboratórios clínicos devem utilizar metodologias para a dosagem do LDL-C com um erro analítico total que não exceda 12%, com imprecisão < 4% e inexatidão < 4%.⁸

O colesterol provém de duas fontes no nosso organismo: produzido em sua maioria no fígado e a outra fonte é proveniente dos alimentos. Este composto é encontrado em alimentos de origem animal tais como ovos, carnes, manteiga, peixes, frutos do mar, leite e seus derivados.⁶ Os seres

humanos absorvem perfeitamente o colesterol contido na dieta. A maioria das pessoas ocidentais ingerem entre 400 e 600 mg de colesterol por dia e absorvem 300 a 400 mg/dia. Essa absorção de colesterol só é reduzida com eficiência, se diminuir a ingestão em torno de 100 a 300 mg/dia, através de restrições alimentares, pois a ingestão diária de carnes, ovos e laticínios fornecem cerca de 500 mg/dia desse composto.

O uso das informações nutricionais obrigatórias nos rótulos dos alimentos e bebidas embaladas está regulamentado no Brasil desde 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁹ sentindo a necessidade de estabelecer ações para orientar o consumo de alimentos com vistas a uma alimentação saudável estabeleceu, através da Resolução RDC nº 40, de 21 de março de 2001, a rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embalados, para fins de apresentação da informação nutricional em percentuais de Valores Diários. Os Valores Diários de Referência – VRD, com base numa dieta de 2.500 calorias, são os seguintes:

Carboidratos – 375 gramas

Gorduras Totais – 80 gramas

Gorduras Saturadas – 25 gramas

Colesterol – 300 miligramas

Fibra alimentar – 30 gramas

Sódio – 2.400 miligramas

Entretanto, para atender as necessidades dos países integrantes do Mercado Comum do Sul – Mercosul, foi feita uma revisão das normas brasileiras e sua adequação com relação ao avanço deste tema no contexto mundial. As porções indicadas nos rótulos de alimentos e bebidas foram

determinadas com base em uma dieta de 2000 kcal considerando uma alimentação saudável e foram harmonizadas com os outros países do Mercosul. Elas estão publicadas na Resolução ANVISA RDC 359/03 – Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para fins de Rotulagem Nutricional. Segundo o Manual de Orientação às Indústrias de Alimentos (2ª versão), da ANVISA, 2005, as informações do conteúdo de colesterol não são obrigatórias, no entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária incentiva os fabricantes de alimentos e bebidas a dispor nos rótulos as informações referentes ao conteúdo deste composto, assim como de cálcio e ferro.⁹ Portanto, a determinação de colesterol em matrizes alimentícias é muito importante para selecionar uma dieta balanceada.

Como a amostra alimentícia é uma matriz complexa, faz-se necessário um pré-tratamento da amostra. Este tratamento consiste na saponificação, uma reação dos triacilgliceróis com álcalis promovendo o rompimento das ligações ésteres na matriz lipoprotéica. O álcali utilizado tem sido o hidróxido de potássio (KOH) por produzir sabão mole, o que determina a não solidificação dos extratos obtidos à temperatura ambiente. Quando se saponifica um tecido animal que contenha colesterol, grande parte das proteínas, fosfolípidios e gorduras são convertidos em produtos insolúveis em solventes orgânicos e solúveis em água. A extração dos insaponificáveis vai separar o colesterol total solúvel em solvente orgânico dos triacilgliceróis e ácidos graxos, os quais permanecem na fase alcoólica ou aquosa. Neste sentido, o processo de saponificação é de suma importância para liberar a quantidade de colesterol total da massa total de lípidos.¹⁰

Os principais métodos encontrados na literatura para determinação de colesterol são colorimétricos¹¹, enzimáticos¹² e cromatográficos.^{6,10,13-16}

Os métodos colorimétricos apresentam a desvantagem por superestimar os teores de colesterol quando na presença de interferentes como fitoesteróis, ácidos graxos insaturados, vitamina A e proteínas.¹¹

Outro método para determinação de colesterol em amostras de sangue e adaptado para quantificá-lo em amostras alimentícias é o enzimático. Esta técnica baseia-se na degradação de colesterol pela enzima colesterol-oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, que produz cor através de uma reação secundária. A quantidade de colesterol obtida na amostra é proporcional a intensidade de cor produzida.¹² No entanto, Saldanha e colaboradores¹⁴ relataram que esta metodologia também superestima os teores de colesterol em alimentos, principalmente os que contêm óleo vegetal, pois pode haver interação entre a enzima colesterol-oxidase e os esteróis presentes nos óleos vegetais. Ulberth & Reich¹⁵ obtiveram valores mais elevados de colesterol por cromatografia gasosa (CG) do que pelo método enzimático ao analisarem massas com ovos.

Um dos métodos mais utilizados para extração e quantificação de colesterol por cromatografia gasosa foi publicado por Al-Hasani, Hlavac & Carpenter.¹³ Nesta técnica é necessário a derivação do colesterol e para estes autores, a derivação não é somente demorada, mas também contribui para o aumento de ruído e decréscimo da linearidade devido ao depósito sobre o detector de ionização em chama. Tarley e colaboradores¹⁶ utilizaram esta técnica da quantificação de colesterol em sardinhas enlatadas com óleo de soja e molho de tomate.

Saldanha e colaboradores¹⁴ desenvolveram um método de cromatografia líquida para determinação de colesterol em carnes e leite. Estes autores obtiveram boas recuperações para estas amostras. Para quantificar o colesterol nestes alimentos, o extrato saponificado foi injetado diretamente no cromatógrafo líquido. No entanto, neste trabalho foi observado a ausência de uma etapa de limpeza da amostra, o que diminui o tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

Com base nestas informações, após a saponificação é oportuno realizar uma etapa de extração em fase sólida a fim de realizar a limpeza do extrato e eluir seletivamente o composto^{6,10,17}, para posteriormente ser quantificado por técnicas cromatográficas.^{6,10}

Neste contexto, tem-se destaque para os MIP como adsorventes para SPE¹⁸⁻¹⁹, os quais são capazes de reter seletivamente o analito de uma matriz complexa.¹⁹⁻²⁰

Como já mencionado nesta Tese, a maioria dos estudos relatados na literatura para extrair colesterol por MIP utiliza polímeros orgânicos^{10,21-23} e inorgânicos preparados pelo processo sol-gel.²⁴ No entanto, polímeros híbridos orgânicos-inorgânicos tem atraído a atenção por formar materiais com propriedades complementares não encontradas em um único composto, além da estabilidade e baixo custo de síntese, o que os tornam materiais passíveis para aplicações industriais.²⁵

Apesar das vantagens destes materiais híbridos, não há na literatura polímero híbrido orgânico-inorgânico para extração de colesterol em alimentos. Portanto, o presente trabalho destaca o desenvolvimento de um polímero híbrido de poli(ácido metacrílico)/sílica com impressão molecular

para colesterol para ser usado como adsorvente em extração em fase sólida para posterior aplicação em matriz alimentícia.

2. OBJETIVOS GERAIS

O Capítulo 2 visa explorar o desempenho de polímeros híbridos orgânico-inorgânicos como materiais extratores seletivos de colesterol.

2.1. Objetivos Específicos

Sintetizar materiais híbridos em diferentes razões molares de ácido metacrílico/tetraetoxissilano. Avaliar qual a melhor proporção viável para ser usada como adsorvente em SPE para extração de colesterol em matrizes alimentícias e detectado por HPLC-UV, além de avaliar a estabilidade da coluna frente a vários ciclos de extração/eluição.

Caracterizar os polímeros molecularmente impressos híbridos por técnicas como infravermelho, termogravimetria, microscopia eletrônica de varredura e de áreas superficiais.

Avaliar a capacidade de adsorção dos polímeros híbridos através de isotermas de adsorção e a seletividade, comparando-se os polímeros sintetizados na ausência da molécula modelo.

Determinação das figuras de mérito tais como, limite de detecção, quantificação, precisão, exatidão e recuperação.

Aplicação do método em amostras de leite bovino integral.

3. METODOLOGIA

3.1. Equipamentos

As determinações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido modelo LC-20AT, Shimadzu, operando isocraticamente, com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ utilizando fase móvel constituída de metanol e água (90:10, v/v) e a detecção foi feita a 208 nm. Uma coluna CLC-ODS(M) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μm de tamanho de partícula) foi usada. O HPLC operou a 25°C . Para as análises de infravermelho dos polímeros híbridos sintetizados foi utilizado o espectrômetro FTIR 8300 (Shimadzu) com Transformada de Fourier. Os experimentos foram realizados usando pastilhas de KBr para preparar as amostras e a faixa espectral variou de 4000 a 400 cm^{-1} . A morfologia de todos os polímeros foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando um microscópio JEO JSM 6360-LV equipado com microscopia de energia dispersiva. As análises térmicas foram realizadas em um analisador termogravimétrico (TGA 4000 Perkin Elmer), onde os polímeros foram aquecidos de 30 a 700°C com uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de N_2 . As análises texturais das amostras foram obtidas em um equipamento Quantachrome modelo Nova 1200. À partir das isotermas de N_2 (a 77,3 K) obteve-se a área superficial segundo o modelo de BET e o tamanho e volume de poros conforme o modelo BJH.

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e usados sem purificação prévia: Colesterol (Sigma, 95%), Metanol (Sigma-

Aldrich, grau HPLC $\geq 99,9\%$), Clorofórmio (Sigma-Aldrich, $\geq 99,8\%$), Hexano (Sigma-Aldrich, $\geq 95,0\%$), Ácido Metacrílico (Acros Organics, 99,5%), Tetraetoxisilano (Aldrich, 98,0%), 3 - metacrilato propil trimetoxisilano (Sigma, 95,0%), Dimetilsulfóxido (Fmaia, 99,5%), 2,2'-azoisobutilnitrila (Sigma-Aldrich, 98,0%), Ácido Clorídrico (Panreac, 37,0%), Ácido Acético (J.T.Baker, 99,9%), Isopropanol (Sigma-Aldrich, 99,9%), Etanol (J.T.Baker, 99,7%), 5- α -colestano (Sigma-Aldrich, 95,0%), 7-dehidrocolesterol (Sigma-Aldrich, $\geq 98,0\%$, HPLC). A água usada no preparo da fase móvel foi ultrapura Milli Q (Millipore) e a fase móvel foi filtrada em membrana de nylon de 0,45 μm (GVS), diariamente.

3.3. Síntese dos polímeros híbridos para colesterol

Foram sintetizados dois polímeros híbridos para colesterol em proporções diferentes de ácido metacrílico (MAA)/tetraetoxisilano (TEOS). As razões molares MAA/TEOS foram 6:1 e 1:5. O ácido metacrílico foi usado como monômero funcional orgânico, o tetraetoxisilano como precursor inorgânico e o 3 - metacrilato propil trimetoxisilano (KH 570) como agente de acoplamento.

Na síntese do polímero híbrido para colesterol na razão molar MAA/TEOS 6:1 (Síntese I), dissolveu-se 0,320 g de colesterol em 7,0 mL de clorofórmio/dimetilsulfóxido (DMSO) (3:1, v/v). Misturou-se com 5,0 mL de ácido metacrílico (54,5 mmol). A mistura foi deixada a temperatura ambiente por 1 h. Adicionou-se 1,0 mL de 3 - metacrilato propil trimetoxisilano (KH 570, 4,21 mmol) e 0,20 g de 2,2'-azoisobutilnitrila (AIBN, 1,22 mmol). Sonicou-se por 2 minutos. A mistura foi deixada sob agitação a 60°C por 2 horas.

Separadamente, dissolveu-se 2,0 mL de tetraetoxisilano (TEOS, 8,93 mmol) em 7,0 mL de $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$ (3:1, v/v), sob agitação por 1 h. Esta solução foi adicionada a anterior e foram adicionados 2,0 mL do catalisador HCl 3%. Foi borbulhado N_2 por 10 minutos. A mistura foi deixada sob agitação a 60°C por 24 h. Após a retirada do polímero do frasco, o mesmo foi seco a temperatura ambiente por 24 h, macerado e passado em peneiras de 150, 106 e 63 μm , sendo esta última granulometria utilizada nos próximos estudos.

A síntese do polímero de colesterol na razão molar MAA/TEOS 1:5 (Síntese II) foi preparada da mesma maneira que a síntese anterior, entretanto foram utilizados 0,414 mL de ácido metacrílico (MAA, 4,52 mmol) e 5,0 mL de tetraetoxisilano (TEOS, 22,3 mmol). Para ambas as sínteses, os polímeros sem impressão (NIP) foram sintetizados nas mesmas condições dos MIP, exceto a não adição da molécula molde, neste caso, o CHO. O excesso de reagentes nos polímeros não impressos e o colesterol presente nos polímeros impressos foram extraídos com 200,0 mL de MeOH/HAc (10%, v/v) através do sistema de Soxhlet por 48 h. Para acompanhar a extração do analito e a retirada de excesso de reagentes, retirou-se do eluato duas alíquotas de 2,0 mL cada, tanto do MIP quanto do NIP, e as mesmas foram evaporadas a temperatura de 40°C e redissolvidas em 2,0 mL na fase móvel MeOH/ H_2O (9:1, v/v). Ambas foram filtradas em 0,22 μm e acompanhadas por HPLC-UV nas condições cromatográficas citadas acima.

3.4. Estudo cinético em batelada

O efeito do tempo de agitação sobre a adsorção de colesterol foi estudado pelo método em batelada variando o tempo de 1 a 20 minutos e de

5 a 60 minutos para os polímeros híbridos das sínteses I e II, respectivamente, utilizando uma solução de 1000 mg L⁻¹ de colesterol em clorofórmio, 50,0 mg de cada polímero híbrido (com e sem impressão) e as suspensões foram agitadas a 150 rpm. Ao final de cada tempo, a solução foi separada do adsorvente por filtração em 0,22 µm, o sobrenadante foi seco a 40°C e recuperado com a fase móvel e analisado por HPLC-UV.

3.5. Construção das isotermas de adsorção

Para o estudo das isotermas de adsorção, analisou-se, em batelada, o efeito do aumento da concentração na adsorção do colesterol, no qual 50,0 mg dos polímeros nas razões molares MAA/TEOS 6:1 e 1:5 e seus respectivos NIP, foram adicionados a 10,0 mL de solução de colesterol em clorofórmio em concentrações crescentes de 100 a 1600 mg L⁻¹, submetendo-se essa mistura a agitação constante de 150 rpm, nos tempos de equilíbrio de 12 e 20 minutos, respectivamente. Seus sobrenadantes foram evaporados até a secura, recuperados na fase móvel e analisados por HPLC-UV.

3.6. Avaliação do efeito de impressão

Para avaliar o efeito de impressão no MIP das duas sínteses, ou seja, a seletividade para as moléculas de colesterol foram realizados estudos de adsorção de solução binária de colesterol/5-α-colestano e colesterol/7-dehidrocolesterol no MIP e no NIP. Estes experimentos foram realizados a temperatura ambiente, nos quais 50 mg dos polímeros foram adicionados a

um frasco de polietileno e agitados durante 12 minutos para o MIP e NIP na síntese I e 20 minutos para o MIP e NIP na síntese II, com 10,0 mL de uma solução binária contendo 1000 mg L⁻¹ de colesterol e 200 mg L⁻¹ de 5- α -colestano, e no outro experimento 1000 mg L⁻¹ de colesterol e 1000 mg L⁻¹ de 7-dehidrocolesterol. Após esta etapa, os sobrenadantes foram evaporados a 40°C e recuperados com a fase móvel e a quantidade de colesterol e de 5- α -colestano foi analisada por HPLC-UV com fase móvel MeOH:H₂O (80:20, v/v), no comprimento de onda de 208 nm, vazão de 0,5 mL min⁻¹ e tempo de corrida de 10 min.

Para os experimentos entre colesterol e 7-dehidrocolesterol, os sobrenadantes foram evaporados a 40°C e recuperados com a fase móvel metanol e a quantidade de colesterol e de 7-dehidrocolesterol foi analisada por HPLC-UV com fase móvel MeOH, no comprimento de onda de 208 nm, vazão de 1,5 mL min⁻¹ e tempo de corrida de 14 min.

3.7. Procedimento de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)

Foram pesados 200 mg do MIP e NIP e acondicionados em cartuchos de SPE cobertos com discos de polietileno poroso na parte superior e inferior. Após o condicionamento com 5,0 mL de hexano, 5,0 mL de leite bovino integral UHT, previamente saponificado e extraído com hexano, foram percolados através dos cartuchos a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Em seguida, os cartuchos foram lavados com 5,0 mL de hexano. O CHO foi eluído com 5,0 mL de etanol. As soluções recolhidas foram secas a 40°C e os resíduos foram redissolvidos na fase móvel e analisadas por HPLC-UV a 208 nm.

3.8. Extração do colesterol no leite bovino integral

Amostras de leite bovino integral UHT foram adquiridas em supermercado local, na cidade de Londrina. Foram misturados 5 litros de leite (da mesma marca) e 10,0 g foram pesados e colocados num frasco de 50 mL, na sequência foram adicionados 8 mL de solução de hidróxido de potássio aquoso a 50% e 12,0 mL de etanol. O frasco foi colocado num banho de óleo sob agitação, até dissolução completa durante 10 minutos a 40°C. Após, 10,0 mL de água e 3x10,0 mL de hexano foram adicionados ao sobrenadante saponificado. A mistura foi misturada e separada num funil de decantação¹⁴. A fase orgânica foi submetida ao MISPE. As extrações de colesterol foram realizadas em triplicata. O teor de colesterol foi analisado por HPLC-UV e as condições cromatográficas foram às mesmas citadas no item 3.1.

3.9. Otimização do protocolo MISPE

Foram aplicados 5,0 mL de extrato hexânico de leite bovino ao MIP e NIP, de modo a otimizar o protocolo MISPE. O hexano foi utilizado para condicionar a coluna, uma vez que este solvente foi utilizado para extrair o colesterol do leite bovino. Os solventes utilizados no procedimento de lavagem foram hexano, tolueno, hexano: tolueno (1:9 v/v) e hexano: etanol (1:4 v/v). Os solventes utilizados no protocolo de eluição foram clorofórmio, etanol, acetonitrila:H₂O (9:1 v/v), hexano:etanol (4:1 v/v), etanol:ácido acético:clorofórmio (1:1:3 v/v/v) e metanol. Todas as frações foram coletadas e detectadas por HPLC-UV. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

3.10. Estudo da capacidade exaustiva do polímero híbrido sob condições dinâmicas (curva de ruptura)

Para a construção da curva de ruptura, a coluna de MISPE contendo 200,0 mg de poli(ácido metacrílico)/sílica, foi primeiramente ativada com hexano e na sequência alíquotas de 5,0 mL de uma solução contendo 100 mg L⁻¹ de colesterol foram percoladas através desta coluna a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, até alcançar a saturação.

3.11. Parâmetros Analíticos

A curva de calibração foi construída de 0 a 250 mg L⁻¹ de colesterol. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) foram calculados usando a equação da IUPAC²⁶. A precisão intra e inter-dia do método, foi determinada calculando o desvio padrão relativo (DPR) para dez réplicas autênticas de amostras submetidas ao procedimento MISPE.

3.12. Aplicação do método proposto e validação

O polímero híbrido proposto de ácido metacrílico/sílica (6:1) foi utilizado para extração do colesterol em quatro tipos diferentes de leite bovino integral UHT e determinado pelo método cromatográfico. As amostras de A a D são marcas comerciais e foram adquiridas no supermercado de Londrina. A extração de colesterol a partir da matriz de leite bovino foi realizada de acordo com a seção 3.8.

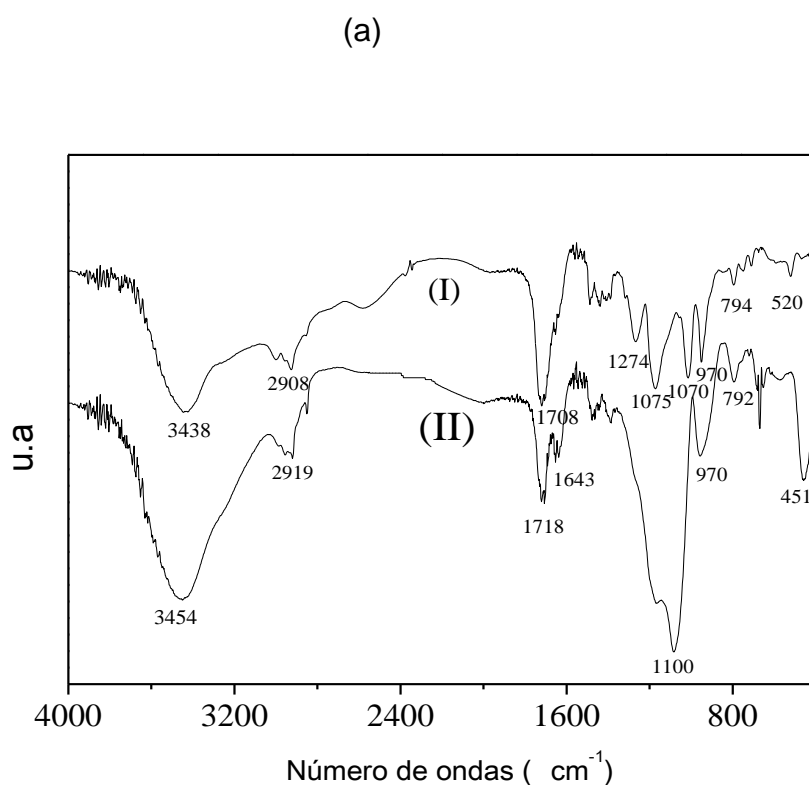
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos Polímeros Híbridos

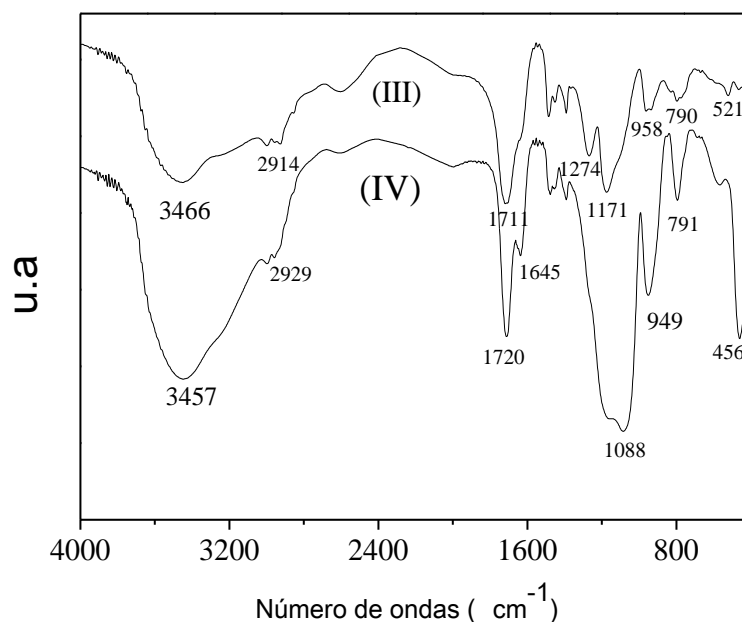
4.1.1. Análises de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR dos polímeros híbridos MIP e NIP nas razões molares MAA/TEOS 6:1 e 1:5, estão demonstrados nas Figuras 2.2(a) e 2.2(b), respectivamente.

Figura 2.2. Espectros de IV dos polímeros (a) com impressão: MIP 6:1 (I) e MIP 1:5 (II), (b) sem impressão: NIP 6:1 (III) e NIP 1:5 (IV).



(b)



As bandas ao redor de 1171, 1100, 1088, 1075, 1070 cm⁻¹ estão relacionadas ao estiramento da ligação de Si-O-Si, ao passo que as vibrações O-H podem ser observadas em 3438, 3454 e 3457 cm⁻¹. As bandas ao redor de 451, 456, 520, 521, 790, 791, 792 e 794 cm⁻¹ são características das vibrações de Si-O, e os picos em 949, 958 e 970 cm⁻¹ podem ser atribuídos ao grupo silanol (Si-OH). As bandas de absorção para as ligações C-H estão em 2908, 2914, 2919 e 2929 cm⁻¹.²⁵ As bandas em 1708 e 1718 cm⁻¹ podem ser atribuídas às vibrações da carboxila do ácido metacrílico. Na Figura 2.2 (I-a) e 2.2 (b-III), uma banda mais intensa relacionada ao grupo C=O pode ser observada devido a uma maior quantidade de monômero funcional orgânico acrescentado durante a síntese I, ao passo que na Figura 2.2 (a-II) e 2.2 (b-IV), a banda mais intensa é atribuída a ligação Si-O-Si e pode ser observada a 1100 cm⁻¹ devido a uma proporção molar mais elevada de TEOS em comparação ao monômero orgânico.

4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura e análises texturais

As características morfológicas dos MIP e NIP nas razões molares de 6:1 (Figura 2.3 (a) e (b)) e 1:5 (Figura 2.4 (a) e (b)), respectivamente, foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observa-se claramente que há diferenças morfológicas entre os polímeros sintetizados em diferentes razões molares. Quando a razão molar de MAA/TEOS foi 6:1 para ambos MIP e NIP, os polímeros exibiram partículas esféricas muito bem definidas com distribuição de tamanho bastante uniforme. Além disso, quando comparados com os polímeros na razão molar 1:5, as partículas apresentaram maiores diâmetros de poro, mostrando ser menos coesivo e com menor grau de agregação, proporcionando assim maior diâmetro médio de poros para estes materiais (Tabela 2.1). Como as partículas têm uma superfície mais hidrofílica devido à elevada quantidade de ácido metacrílico, os seus agregados se assemelham a um cacho de uvas. As partículas esféricas bem definidas, com distribuição de tamanho bastante uniforme observado para o MIP e NIP preparados na síntese I, também pode ser atribuída a uma maior solubilidade do ácido metacrílico em reações de crescimento da cadeia de poli(ácido metacrílico) e menor solubilidade no solvente porogênico.²⁷

Para os MIP e NIP sintetizados com uma quantidade inferior de ácido metacrílico (síntese II), observou-se que estes polímeros apresentaram partículas com diâmetros de poros inferiores e com um maior grau de agregação. Este resultado pode indicar um diâmetro de poro médio baixo, tipicamente de materiais microporosos [poros <2 nm]²⁸, e uma alta área superficial, como observado na Tabela 2.1. A maior área superficial dos

polímeros sintetizados na proporção molar 1:5, isto é, contendo uma quantidade mais elevada de TEOS, foi de certa forma esperado, uma vez que o precursor inorgânico é empregado para melhorar as propriedades texturais e morfológicas do material, enquanto o polímero orgânico funcional desempenha um papel muito importante na criação do grupo ativo da cavidade da molécula molde.

A partir da análise textural, foi observada para os polímeros preparados na razão molar 6:1, um maior diâmetro médio de poro no MIP quando comparado com NIP, sendo assim um indicativo das cavidades complementares da molécula molde formadas no MIP.

Figura 2.3. Micrografias do MEV do MIP (a) e do NIP (b) na razão molar MAA/TEOS 6:1 em ampliação de 13000x.

(a)

(b)

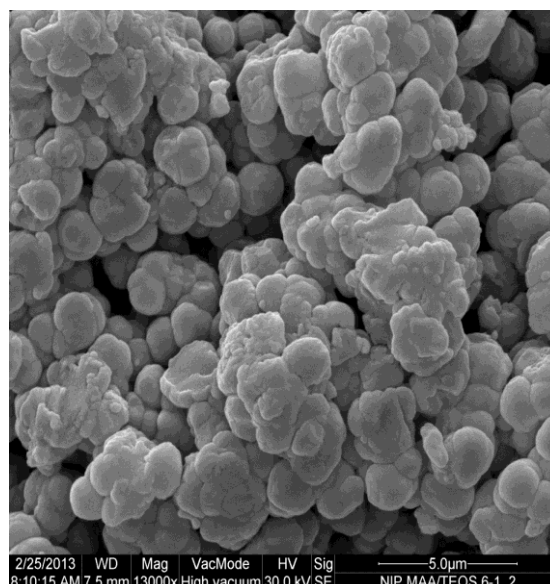
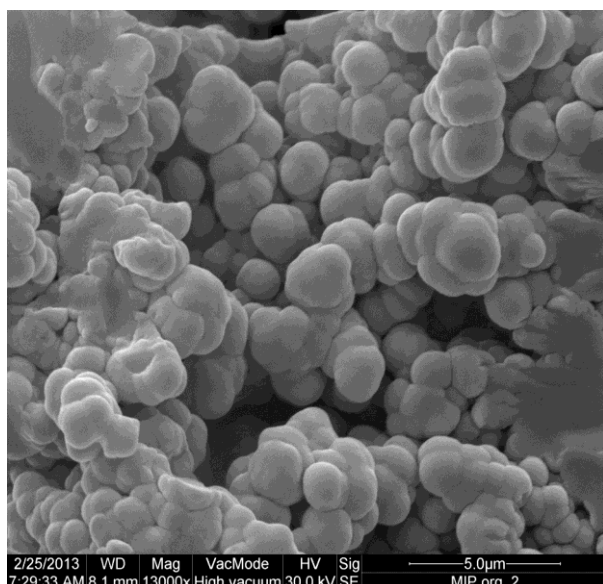


Figura 2.4. Micrografias do MEV do MIP (a) e do NIP (b) na razão molar MAA/TEOS 1:5 em ampliação de 13000x.

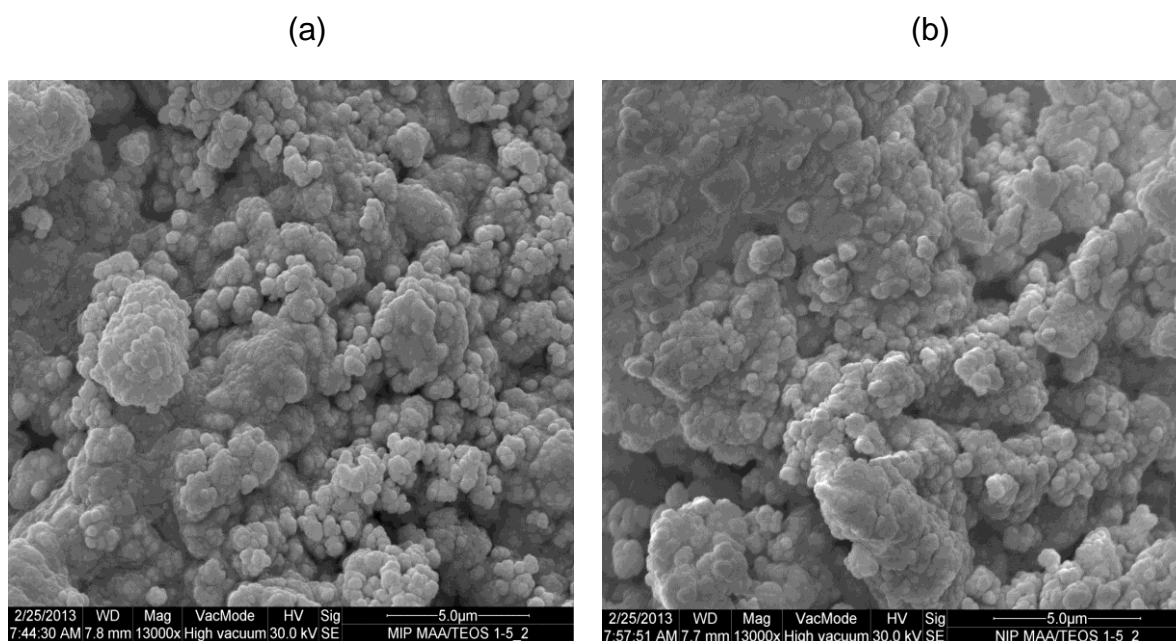


Tabela 2.1. Parâmetros texturais dos polímeros híbridos com e sem impressão sintetizados nas proporções molares de MAA/TEOS 6:1 e 1:5.

Adsorvente	Volume de poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Área Superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro médio de poro (nm)
MIP 6:1	0,22	42,44	5,47
NIP 6:1	0,01	2,23	1,65
MIP 1:5	0,13	178,50	1,51
NIP 1:5	0,11	203,20	1,57

4.1.3. Análise Termogravimétrica

Os termogramas (TG), e suas respectivas derivadas (DTG), dos polímeros sintetizados nas sínteses I e II estão representados nas Figuras 2.5 e 2.6, respectivamente. Na Figura 2.5, pode ser observado que os polímeros que contêm quantidades mais elevadas de ácido metacrílico, apresentaram três eventos bem definidos de perda de massa. O primeiro

evento ocorreu por volta de 70°C, com de perda de massa em torno de 14%, que pode ser atribuída à perda de água residual adsorvida no material. Um segundo evento com sutil perda de massa (em torno de 9%) pode ser observado no intervalo de temperatura de 200 - 350°C e provavelmente pode ser atribuído a uma reação de desidratação formando ácido metacrílico anidro. O terceiro evento ocorreu na temperatura máxima ($T_{m\acute{a}x}$) em torno de 460°C e mostra ser a principal etapa de decomposição do ácido metacrílico com perfil de curva bastante característico devido à extensa fragmentação do polímero.²⁹

A Figura 2.6 mostra os perfis térmicos dos polímeros com e sem impressão na proporção de MAA/TEOS 1:5. Pode ser observado que para esses polímeros os termogramas apresentaram dois eventos térmicos de decomposição. O primeiro evento ocorreu numa faixa de temperatura de 30 - 200°C e corresponde à volatilização da molécula de água adsorvida no material (em torno de 14% de perda de massa). O segundo evento ocorre na faixa de temperatura de 350 - 550°C com perda de massa em torno de 30%. Nessa etapa a temperatura máxima de decomposição é de 448°C e mostra ser a principal etapa de decomposição do ácido metacrílico.²⁹

Os polímeros (MIP e NIP) contendo maior quantidade de precursor inorgânico (síntese II) apresentaram maior estabilidade térmica e expressivo rendimento cerâmico, devido ao fortalecimento das ligações químicas na cadeia principal entre o TEOS e o ácido metacrílico.

Figura 2.5. Termogramas do polímero híbrido com impressão (a) e sem impressão (b) na razão molar MAA/TEOS 6:1.

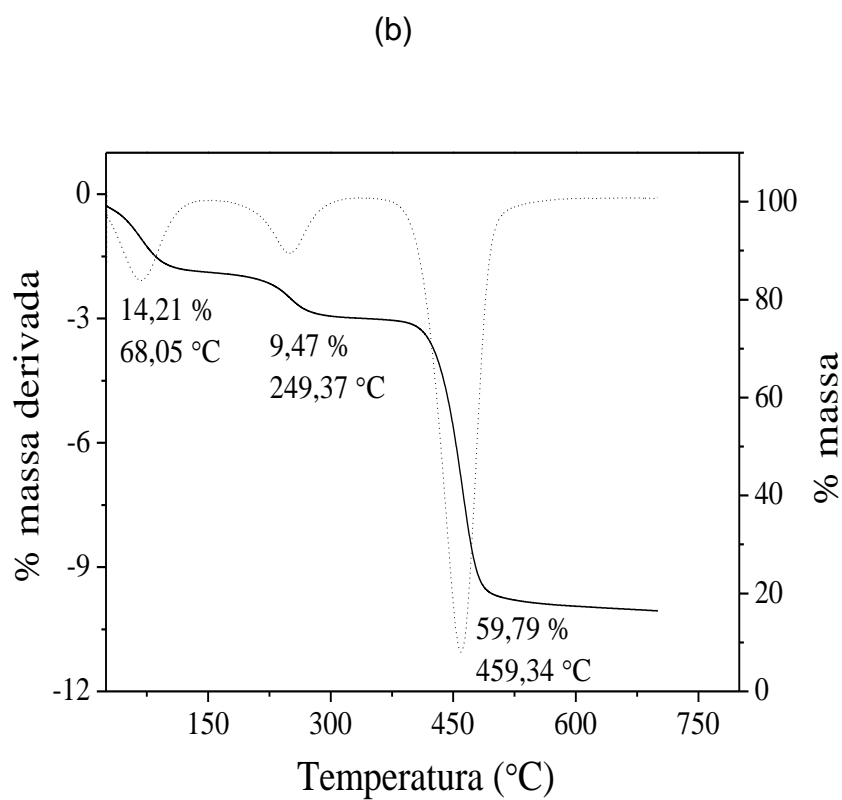
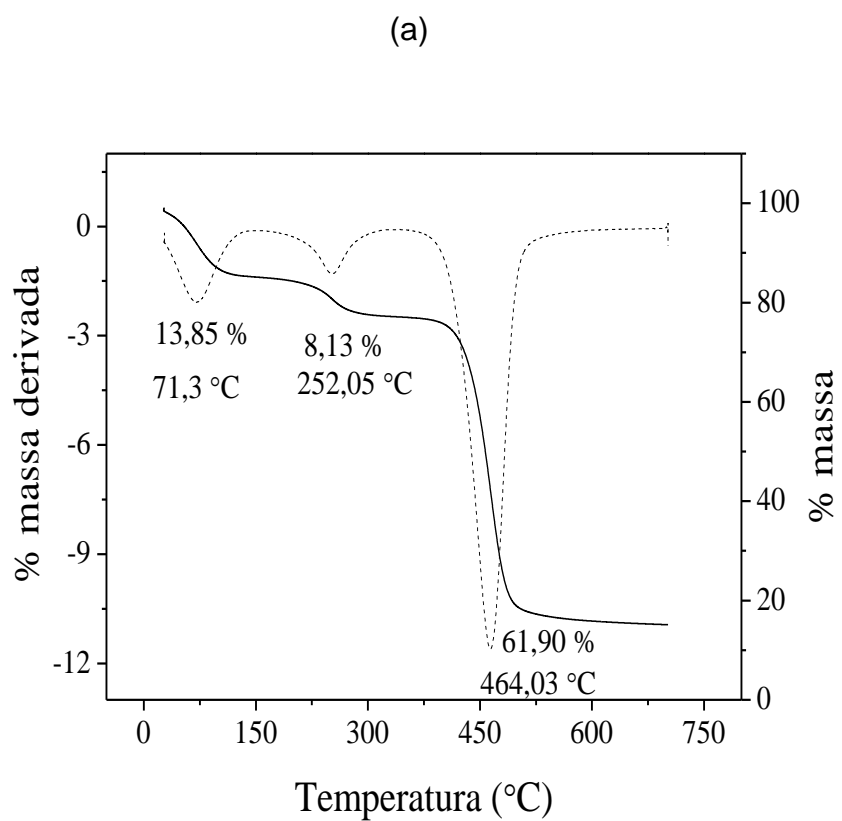
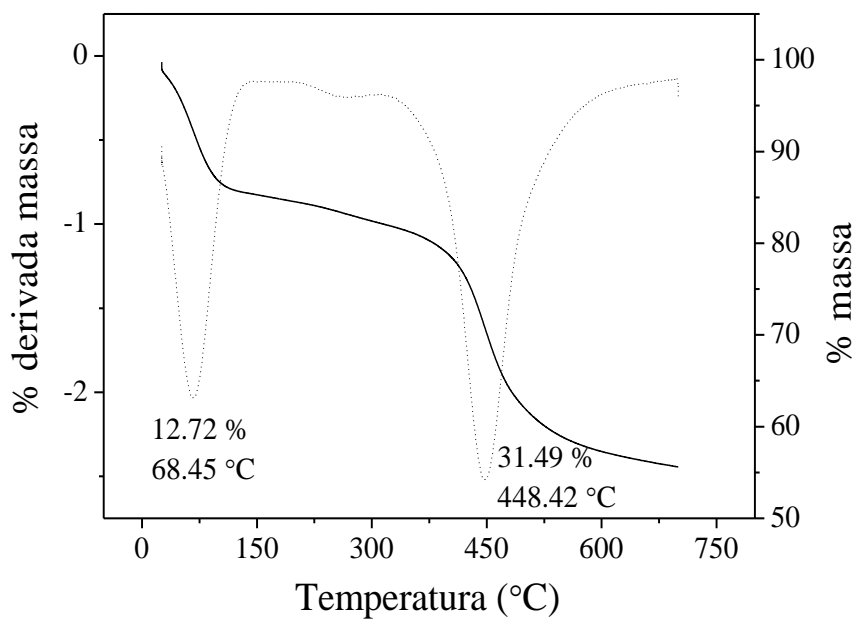
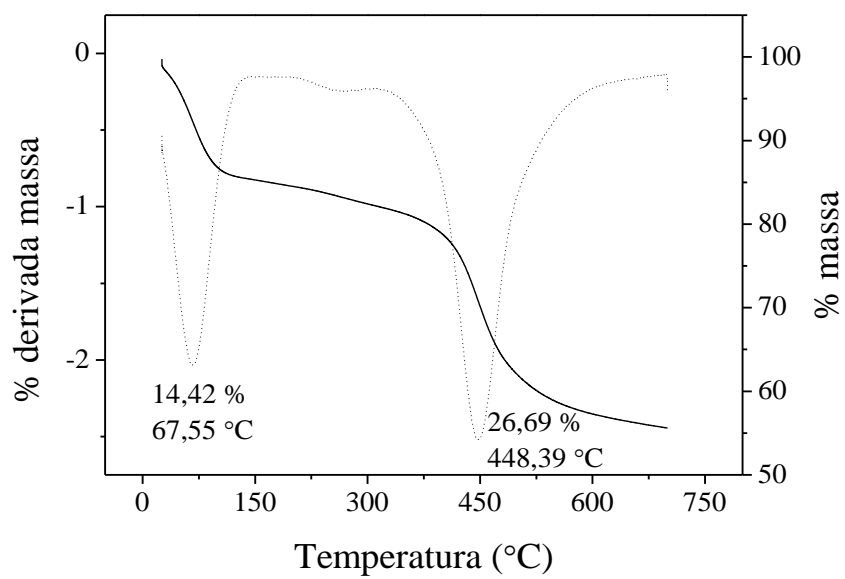


Figura 2.6. Termogramas do polímero híbrido com impressão (a) e sem impressão (b) na razão molar MAA/TEOS 1:5.

(a)



(b)



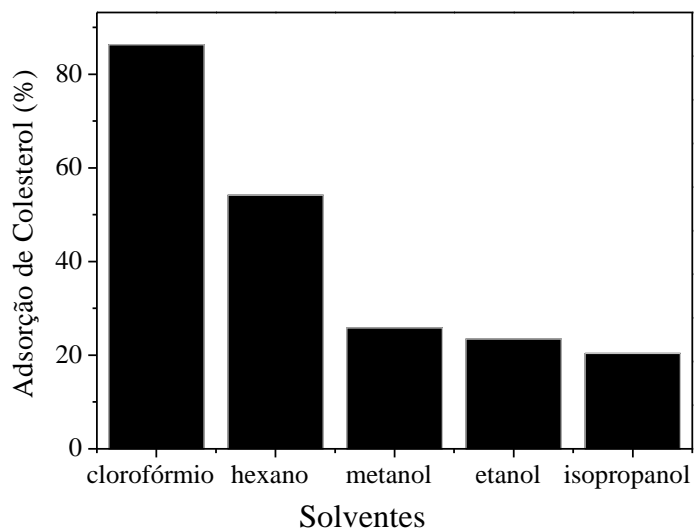
4.1.4. Adsorção de colesterol: efeito de diferentes solventes

Para estudar o efeito de diferentes solventes na adsorção do colesterol pelos MIP híbridos preparados nas proporções molares MAA/TEOS 6:1 e 1:5, foram testados os seguintes solventes: hexano, isopropanol, clorofórmio, metanol e etanol. Como mostrado na Figura 2.7, percentuais de adsorção de colesterol mais elevados foram alcançadas com o uso de solventes menos polares. Tal resultado mostra que os sítios de ligação dos MIP têm propriedades hidrofílicas, sugerindo que a interação do colesterol com os sítios de ligação dos MIP se dá por ligação de hidrogênio, atribuída ao grupo carboxila do ácido metacrílico e do grupo hidroxila do colesterol, conforme ilustrado na Figura 2.8.

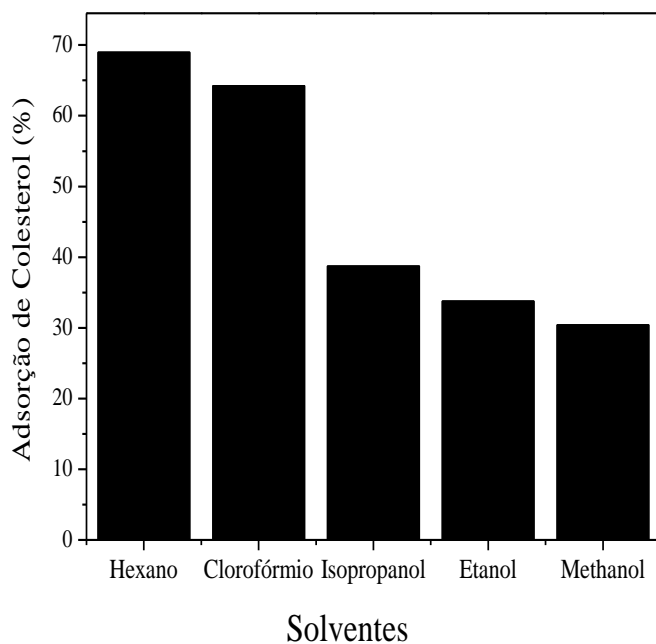
Além disso, também pode ser observado a partir da Figura 2.7(a), que a adsorção de colesterol no MIP preparado a partir de síntese I foi maior em clorofórmio, devido a melhor solubilidade do colesterol em hexano. Por outro lado, para o MIP contendo menor teor de ácido metacrílico (síntese II), há uma diminuição das propriedades de hidrofiliabilidade, e apenas uma pequena diferença na adsorção do colesterol na presença de clorofórmio e hexano foi observada. O perfil de adsorção semelhante pode ser explicado tanto pela solubilidade do colesterol em hexano e também devido a ligação do colesterol por ligações de hidrogênio com o ácido metacrílico. Como o clorofórmio se mostrou um solvente adequado para a adsorção de colesterol em ambos MIP, este solvente foi selecionado para realizar os estudos cinéticos e isotérmicos.

Figura 2.7. Percentual (%) de adsorção de colesterol pelos polímeros híbridos sintetizados nas proporções molares MAA/TEOS 6:1 (a) e 1:5 (b) em diferentes solventes: clorofórmio, metanol, hexano, etanol e isopropanol.

(a)



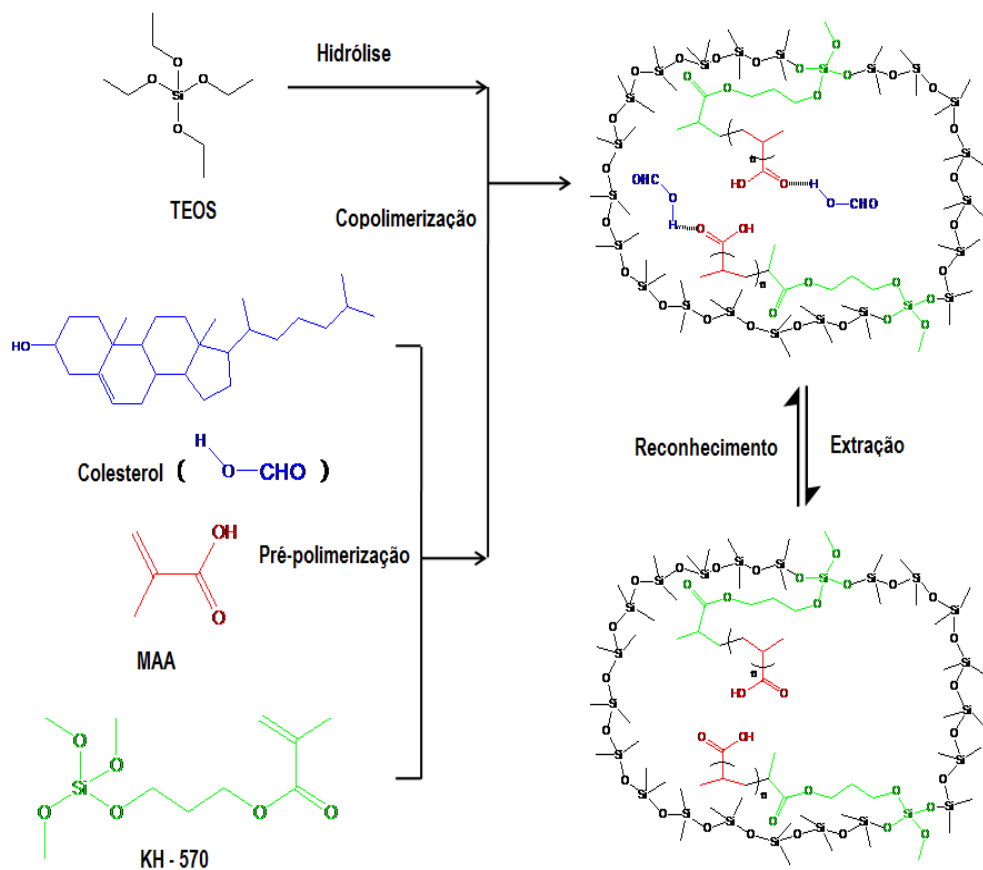
(b)



4.1.5. Estudo cinético de adsorção

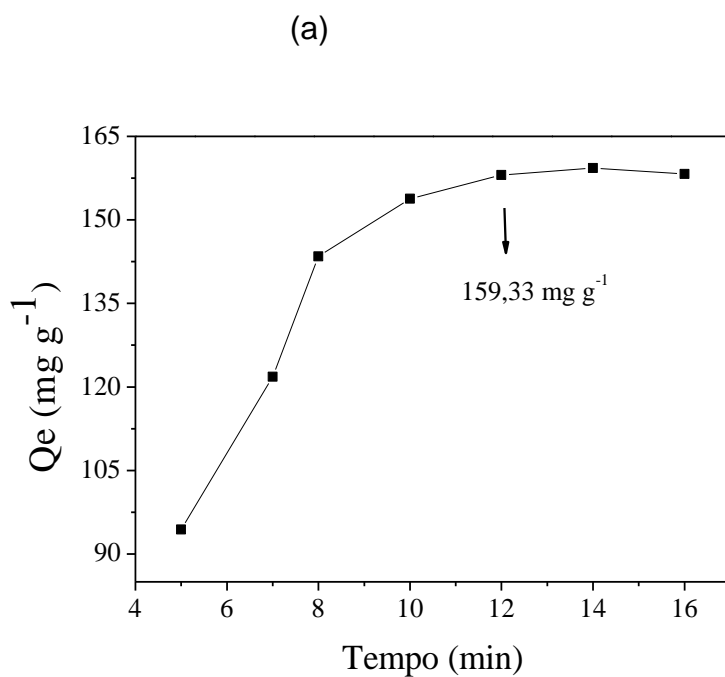
Estudos cinéticos de adsorção fornecem informações valiosas sobre o mecanismo do processo de adsorção³⁰. A influência do tempo de contato do colesterol sobre a adsorção dos polímeros híbridos com (a) e sem impressão (b) na razão molar de 6:1 e 1:5, está apresentada nas Figuras 2.9 e 2.10, respectivamente.

Figura 2.8. Proposta de mecanismo para a síntese do polímero híbrido.



A partir do efeito do tempo de contato sobre a adsorção do colesterol pelos polímeros híbridos, observou-se que o tempo de equilíbrio de colesterol com os polímeros (MIP e NIP) obtidos das sínteses I e II, foi cerca de 12 e 20 min, respectivamente. Esta pequena diferença no tempo de contato para atingir rapidamente o equilíbrio, indica que os polímeros apresentaram baixa resistência à transferência de massa.

Figura 2.9. Influência do tempo de contato na quantidade adsorvida de colesterol nos polímeros híbridos com (a) e sem impressão (b) nas razões molares MAA/TEOS 6:1.



(b)

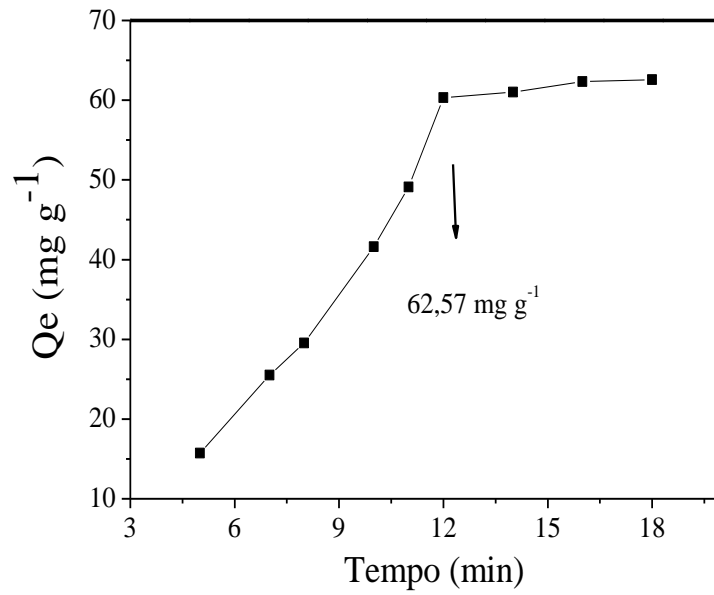
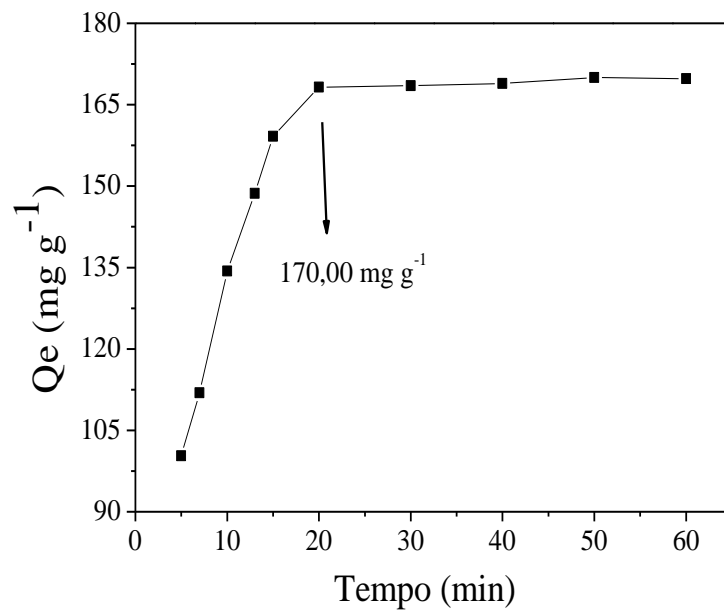
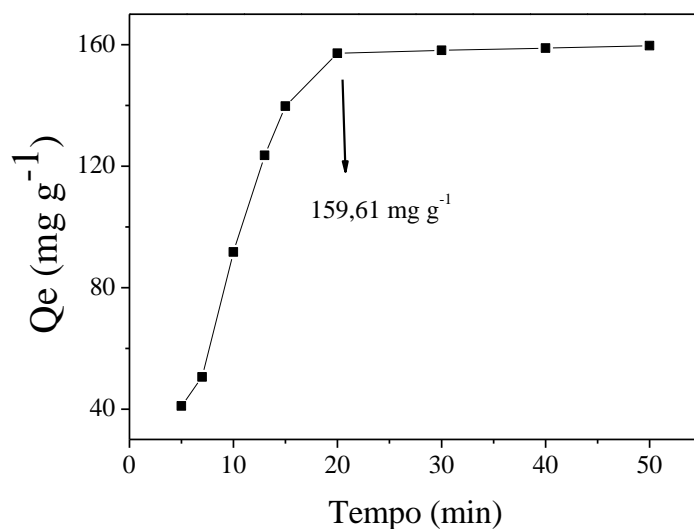


Figura 2.10. Influência do tempo de contato na quantidade adsorvida de colesterol nos polímeros híbridos com (a) e sem impressão (b) nas razões molares MAA/TEOS 1:5.

(a)



(b)



A quantidade máxima adsorvida (Q_e) foi calculada de acordo com a equação (1), descrita no item 3.4.1. (Revisão Bibliográfica). Observou-se para os polímeros obtidos a partir da síntese I, que a adsorção de colesterol foi 2,5 vezes mais elevada para o MIP em relação ao NIP, o que pode ser atribuído aos dados texturais já mencionados e a presença do efeito de impressão. Ao contrário da síntese I, não foi observada diferença significativa na adsorção de colesterol para os polímeros (MIP e NIP) sintetizados com menor teor de ácido metacrílico. Este resultado pode ser atribuído à semelhança estrutural destes polímeros e também aos baixos sítios de reconhecimento seletivos formados no MIP. Portanto, o MIP sintetizado na razão molar 6:1 pode ser potencialmente utilizado para extrair colesterol devido ao maior teor de ácido metacrílico acrescentado durante a síntese, uma vez que o monômero funcional orgânico controla o grupo ativo da cavidade da molécula molde, enquanto que o precursor inorgânico melhora a resistência estrutural, morfológica e mecânica do polímero híbrido.²⁵ Na tentativa de descrever a

cinética de adsorção do colesterol utilizando os polímeros, quatro modelos cinéticos³¹ foram investigados, como mostrado nas Tabelas 2.2 e 2.3.

A Tabela 2.2 mostra os parâmetros cinéticos dos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem e a Tabela 2.3 de Elovich e Difusão intrapartícula do processo de adsorção do colesterol pelos polímeros híbridos com e sem impressão nas razões molares 6:1 e 1:5, os quais foram obtidos através das regressões lineares de cada modelo.

Através dos dados das Tabelas 2.2 e 2.3, foi feita uma avaliação quantitativa dos modelos, comparando-se os valores dos coeficientes de determinação (R^2) e dos Q_e calculados vs Q_e obtidos experimentalmente para os modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.

Tabela 2.2. Parâmetros cinéticos estimados para a adsorção de colesterol nos polímeros híbridos com e sem impressão usando os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem.

Adsorvente	Pseudo-primeira ordem				Pseudo-segunda ordem			
	$\log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - \frac{k_1}{2.303} t$				$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t$			
	k_1 (min^{-1})	$Q_{e\text{calc}}$ (mg g^{-1})	$Q_{e\text{exp}}$ (mg g^{-1})	R^2	k_2 ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$Q_{e\text{calc}}$ (mg g^{-1})	$Q_{e\text{exp}}$ (mg g^{-1})	R^2
MIP 6:1	0,41	450,05	159,33	0,88	$8,27 \times 10^{-4}$	206,40	159,33	0,97
NIP 6:1	0,32	335,66	62,57	0,92	$3,67 \times 10^{-4}$	87,26	62,57	0,94
MIP 1:5	0,07	43,27	170,00	0,65	$1,64 \times 10^{-3}$	180,18	170,00	0,99
NIP 1:5	0,09	81,21	159,61	0,80	$8,72 \times 10^{-4}$	184,16	159,61	0,98

Os resultados mostraram que o modelo cinético que melhor se ajustou ao processo de adsorção do colesterol nestes polímeros híbridos (MIP e NIP), preparados a partir das sínteses I e II, foi o de pseudo-segunda ordem, no qual o valor de Q_e calculado foi próximo ao valor de Q_e experimental e também se obteve coeficientes de determinação (R^2) $\geq 0,94$, indicando um

processo de quimissorção e a presença de dois sítios de adsorção³². Estes diferentes sítios de adsorção presentes nos materiais podem ser atribuídos ao ácido carboxílico do monômero orgânico e ao grupo silanol (Si-OH) proveniente do precursor inorgânico.

Tabela 2.3. Parâmetros cinéticos estimados para a adsorção de colesterol nos polímeros híbridos com e sem impressão usando os modelos de Elovich e Difusão Intrapartícula.

Adsorvente	Difusão Intrapartícula			Elovich		
	$Q_t = k_{id} t^{1/2} + C$			$Q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t$		
	β (g mg ⁻¹)	α (min ⁻¹ mg g ⁻¹)	R ²	K _{di} (mg g ⁻¹ min ^{-1/2})	C (mg g ⁻¹)	R ²
MIP 6:1	(1ªreta) 0,01	50,33	0,97	(1ªreta) 81,92	90,97	0,98
	(2ªreta) 0,07	136581,12	0,91	(2ªreta) 7,45	131,09	0,89
NIP 6:1	(1ªreta) 0,02	0,01	0,96	(1ªreta) 30,50	54,25	0,97
	(2ªreta) 0,16	314,77	0,95	(2ªreta) 3,13	49,48	0,99
MIP 1:5	(1ªreta) 0,02	0,02	0,99	(1ªreta) 36,55	17,39	0,99
	(2ªreta) 0,60	1,98x10 ⁴²	0,85	(2ªreta) 0,56	165,56	0,87
NIP 1:5	(1ªreta) 0,01	0,01	0,99	(1ªreta) 68,04	123,03	0,99
	(2ªreta) 0,37	2,46x10 ²⁴	0,99	(2ªreta) 0,96	152,80	0,99

Para o modelo de Elovich, foram obtidos dois segmentos lineares com satisfatórios valores de R², confirmando assim, que a natureza química da adsorção do colesterol envolve duas fases no processo de adsorção. A primeira fase está relacionada com a adsorção do adsorbato aos sítios externos facilmente disponíveis e a segunda fase é atribuída à difusão lenta dentro e fora dos poros.³³ A presença de segmentos multi-lineares no modelo de Elovich pode indicar a presença de diferentes locais de ligação.^{32,34}

Um resultado muito interessante foi observado para o modelo de difusão intrapartícula. Neste caso, a presença de dois segmentos lineares também foi obtida, mostrando uma rápida adsorção na camada externa em um curto tempo (primeira etapa linear), seguindo-se de uma fase de adsorção mais lenta e gradual descrita por difusão intrapartículas. Além disso, a constante

de difusão intra-partícula (K_{di}) para o MIP preparado a partir da síntese I foi muito mais elevada do que a obtida para seu respectivo NIP, sugerindo que a resistência à transferência de massa é ainda mais baixa para o colesterol no MIP. Estes dados também corroboram com os dados texturais já mencionados e torna possível inferir que a maioria dos sítios de ligação seletivos está localizado sobre a superfície externa do MIP. Por outro lado, para os materiais preparados a partir da síntese II, a constante de difusão intrapartículas foi muito menor para o MIP do que para seu respectivo NIP. Isso também poderia explicar o comportamento muito semelhante para a adsorção de colesterol sob condições não saturadas utilizando MIP e NIP.

4.1.6. Isotherma de adsorção

Os dados de adsorção podem ser representados por uma isoterma de adsorção, a qual é construída pela relação entre a concentração de equilíbrio do analito e a quantidade deste adsorvido por unidade de grama de adsorvente.³⁵ Neste trabalho, a quantidade máxima de colesterol adsorvida por massa dos MIP e NIP, ou seja, a capacidade máxima de adsorção foi determinada pelo emprego dos modelos de isotermas não lineares de Langmuir, Freundlich e o modelo duplo de Langmuir-Freundlich para um e dois sítios (Tabela 2.4, síntese I e Tabela 2.5, síntese II).

As isotermas de adsorção experimentais para o colesterol obtidas para os quatro polímeros estão apresentadas na Figura 2.11. Para os polímeros contendo maior teor de MAA (síntese I), os modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich para um sítio não foram devidamente ajustados, apresentando valores de R^2 variando de 0,68-0,93. O modelo duplo de

Langmuir-Freundlich para dois sítios apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais apresentando valores de R^2 de 0,99. Este modelo admite que a adsorção ocorre em sítios homogêneos e heterogêneos na superfície do material, corroborando com os dados cinéticos de pseudo-segunda ordem. Em baixas concentrações de adsorbato este modelo se reduz eficazmente a uma isoterma de Freundlich, enquanto que o processo de adsorção pode ocorrer preferencialmente em sítios de energia mais altos formados pelos grupos carboxilas do monômero ácido metacrílico, enquanto que em concentrações elevadas prevê uma capacidade característica de monocamada de adsorção da isoterma de Langmuir atribuída pela adsorção em outros sítios, como no grupo silanol (Si-OH) do precursor inorgânico.³⁶

A soma das capacidades máximas de adsorção (b_1 e b_2) para o MIP e NIP foi de 214,80 e 94,54 mg g⁻¹, respectivamente, valores próximos aos dados obtidos experimentalmente.

Quanto aos MIP e NIP preparados a partir da síntese II (razão molar MAA/TEOS de 1:5), os modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich para um sítio também foram poucos ajustados aos dados experimentais com valores de R^2 variando de 0,90 a 0,96. Portanto, assim como para a síntese I, o modelo de Langmuir-Freundlich para dois sítios, também apresentou o melhor ajuste para os polímeros preparados a partir da síntese II. Os valores mais altos de R^2 foram de 0,99 e 0,98, e a soma das capacidades máximas de adsorção (b_1 e b_2) foram 166,45 e 142,20 mg g⁻¹, respectivamente, para o MIP e NIP, o que significa que Q_e foi próximo do Q_e medido experimentalmente.

É importante enfatizar que o MIP que apresenta maior quantidade de MAA possui capacidade máxima adsorptiva (214,80 mg g⁻¹) quase 30% maior que o MIP com quantidade superior de precursor inorgânico TEOS (166,45 mg g⁻¹), mostrando que, conforme já mencionado, o monômero orgânico é responsável pelo controle do grupo ativo da cavidade da molécula molde.

A Tabela 2.6 mostra uma comparação das capacidades máximas adsorptivas de colesterol nos MIP sintetizados neste trabalho com aqueles obtidos a partir de outros polímeros molecularmente impressos anteriormente relatados. Como se pode observar, uma capacidade máxima adsorptiva maior foi alcançada, especialmente para o MIP preparado a partir da síntese I.

Tabela 2.4. Parâmetros isotérmicos da adsorção de colesterol pelos MIP e NIP preparados pela síntese I. Q_{exp} para o MIP = 224,04 mg g⁻¹, Q_{exp} para o NIP = 93,21 mg g⁻¹

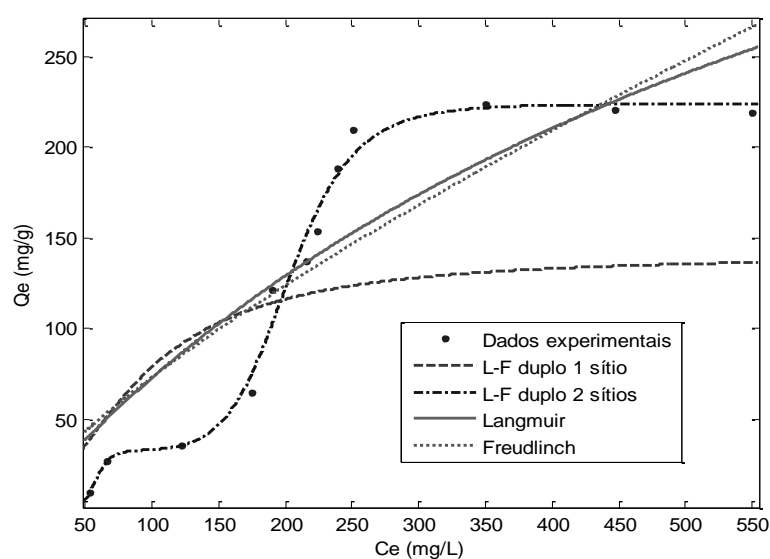
Modelos	Parâmetros	MIP	NIP
Langmuir $Q_{eq} = k_L b C_{eq} / (1 + k_L C_{eq})$	k_L (L g ⁻¹)	0,01	1,01x10 ⁴
	b (mg g ⁻¹)	570,70	8,97x10 ⁻⁶
	R^2	0,79	0,93
Freundlich $Q_{eq} = k_F C_{eq}^{1/n}$	k_F (L g ⁻¹)	2,22	0,06
	n	0,76	1,05
	R^2	0,76	0,96
Langmuir-Freundlich (um sítio) $Q_{eq} = K b C_{eq} / (1 + K C_{eq})^n$	k_1 (L g ⁻¹)	0,01	2,14x10 ⁻⁸
	b_1 (mg g ⁻¹)	140,70	1,27 x10 ⁴
	n_1	1,90	0,48
	R^2	0,68	0,76
Langmuir-Freundlich (dois sítios) $Q_{eq} = \frac{b_1(k_1 C_{eq})^{n_1}}{1+(k_1 C_{eq})^{n_1}} + \frac{b_2(k_2 C_{eq})^{n_2}}{1+(k_2 C_{eq})^{n_2}}$	k_1 (L g ⁻¹)	0,02	0,01
	b_1 (mg g ⁻¹)	23,90	17,23
	n_1	10,59	10,10
	k_2 (L g ⁻¹)	0,01	0,01
	b_2 (mg g ⁻¹)	190,90	77,31
	n_2	8,35	6,86
	R^2	0,99	0,99

Tabela 2.5. Parâmetros isotérmicos da adsorção de colesterol pelos MIP e NIP preparados pela síntese II. Q_{exp} para o MIP = 155,94 mg g⁻¹, Q_{exp} para o NIP = 141,81 mg g⁻¹

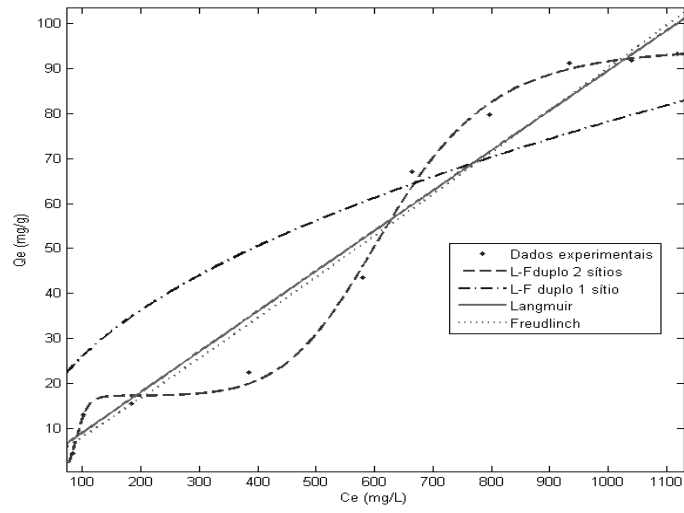
Modelos	Parâmetros	MIP	NIP
Langmuir $Q_{eq} = k_L b C_{eq} / (1 + k_L C_{eq})$	k_L (L g ⁻¹)	0,01	0,01
	b (mg g ⁻¹)	565,00	94,75
	R^2	0,90	0,94
Freundlich $Q_{eq} = k_F C_{eq}^{1/n}$	k_F (L g ⁻¹)	0,25	1,67
	n	0,99	0,52
	R^2	0,90	0,95
Langmuir-Freundlich (um sítio) $Q_{eq} = K b C_{eq} / (1 + K C_{eq}) n$	k_1 (L g ⁻¹)	0,01	0,01
	b_1 (mg g ⁻¹)	185,60	107,30
	n_1	4,05	0,98
	R^2	0,95	0,95
Langmuir-Freundlich (dois sítios) $Q_{eq} = \frac{b_1 (k_1 C_{eq})^{n_1}}{1 + (k_1 C_{eq})^{n_1}} + \frac{b_2 (k_2 C_{eq})^{n_2}}{1 + (k_2 C_{eq})^{n_2}}$	k_1 (L g ⁻¹)	0,01	0,23
	b_1 (mg g ⁻¹)	121,20	25,21
	n_1	1,28	0,77
	k_2 (L g ⁻¹)	0,01	0,01
	b_2 (mg g ⁻¹)	45,25	109,85
	n_2	19,21	1,02
	R^2	0,99	0,97

Figura 2.11. Isotermas de adsorção de colesterol no MIP (a) e no NIP (b) da síntese I e dos MIP (c) e NIP (d) da síntese II e ajuste dos dados empregando modelos não lineares de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich.

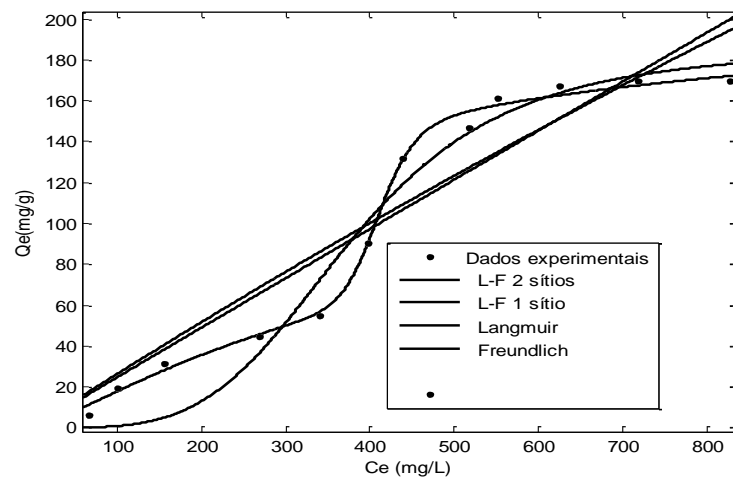
(a)



(b)



(c)



(d)

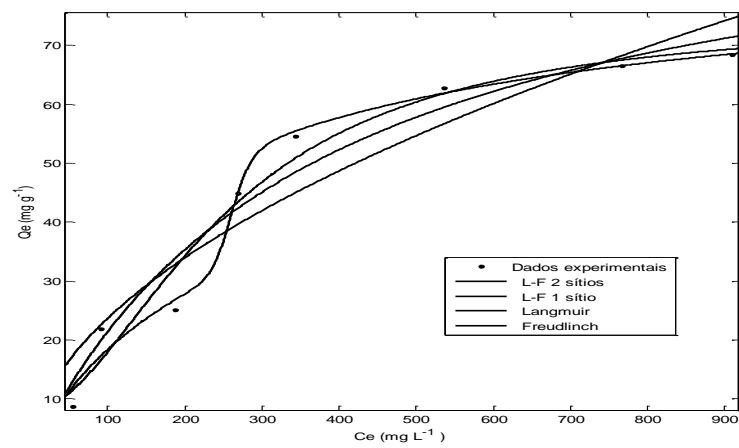


Tabela 2.6. Comparação entre as capacidades máximas adsortivas de colesterol nos materiais híbridos molecularmente impressos poli(ácido metacrílico)/sílica (PMAA-SiO₂) com outros adsorventes.

Adsorventes	Estratégia de Síntese	Capacidade Máxima Adsorvida (mg g ⁻¹)	Meio de adsorção	Referências
Polímero Orgânico- colesterol HEMA na presença de EGDMA	Método de impressão covalente e não covalente usando o método espaço sacrificial	113,24	Hexano	[37]
Polímero Orgânico - Organic polymer- Poli(2-hidroxietil metacrilato- <i>N</i> - metacrilóil-(l)-tirosina metilester)	Método em Bulk	23,21	Metanol	[38]
Polímero Orgânico com Sistema à base de metal	Método em Bulk	14,48	Diclorometano	[39]
Polímero Orgânico- Metilmetacrilato-co- ácido acrílico copolímero	Método de Precipitação	115,40	Meio aquoso (pH 6,9)	[4]
Polímero Orgânico	Método em Bulk	18,90	Mistura Água/THF (5:6 v/v)	[40]
Polímero Orgânico- Polímero molecularmene impresso com nanopartículas superparamagnéticas de Fe ₃ O ₄	Método de Dispersão	23,90	Tolueno	[41]
Polímero Híbrido (MAA/TEOS razão molar 6:1)	Método em Bulk	214,80	Clorofórmio	Este trabalho
Polímero Híbrido (MAA/TEOS razão molar 1:5)	Método em Bulk	166,45	Clorofórmio	Este trabalho

4.1.7. Estudos de Seletividade

O estudo de seletividade tem como finalidade avaliar o efeito de impressão criado no MIP durante a etapa de síntese, por meio de

comparação com o material controle, NIP. A seletividade das partículas dos MIP para o colesterol (Figura 2.12(a)) foi calculada a partir da adsorção competitiva realizada em estudos de batelada usando 5- α -colestano (Figura 2.12(b)) e 7-deidrocolesterol (Figura 2.12(c)), como compostos estruturalmente análogos ao colesterol. Com base nos experimentos citados na seção 3.6., foram determinados os parâmetros relacionados ao desempenho da seletividade do adsorvente, tais como coeficiente de distribuição (K_d), coeficiente de seletividade (k) e coeficiente de seletividade relativo (k'). Estes coeficientes do colesterol, 5- α -colestano e 7-deidrocolesterol foram calculados a partir das equações citadas na seção 3.5. (Revisão Bibliográfica) e os dados constam nas Tabelas 2.7 e 2.8.

Uma comparação entre os valores de K_d para os MIP preparados a partir das sínteses I e II, com aqueles obtidos para os NIP mostra que os MIP adsorvem mais colesterol do que 5- α -colestano e 7-deidrocolesterol. Como na molécula 5- α -colestano os grupos hidroxilas não estão presentes em sua estrutura (Figura 2.12 (b)), sua adsorção foi menor como observado pelos baixos valores de K_d .

Os valores de k' refletem a magnitude do efeito de impressão no MIP. Assim, verificou-se que, para o sistema colesterol/5- α -colestano, os MIP preparados a partir das sínteses I e II, foram de 5,08 e 1,72 vezes, respectivamente, mais seletivos para as moléculas de colesterol do que os seus correspondentes NIP.

Por outro lado, os valores de k' obtidos para o sistema colesterol/7-deidrocolesterol foram 6,08 e 0,10, respectivamente, para os MIP preparados a partir das sínteses I e II. Este resultado revela que o MIP

sintetizado com menor teor de MAA (razão molar MAA/TEOS de 1:5) não foi capaz de reconhecer o sítio de ligação de colesterol na presença de 7-deidrocolesterol, uma molécula com estrutura muito semelhante à do colesterol (Figura 2.12(c)). Assim, podemos enfatizar mais uma vez que o monômero funcional orgânico realmente controla os grupos ativos da cavidade da molécula molde.

Figura 2.12. Estruturas do (a) colesterol, (b) 5- α -colestano e (c) 7-deidrocolesterol.

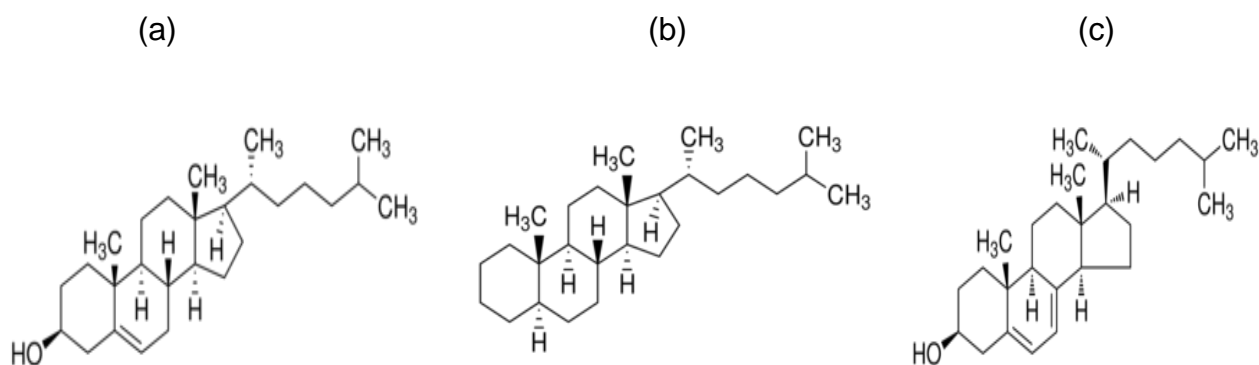


Tabela 2.7. Parâmetros relacionados ao efeito de impressão (K_d , k , k') para colesterol e 5- α -colestano.

Adsorvente	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		K_d (mL g ⁻¹)		k	$k' = \frac{K_{\text{Impressão}}}{K_{\text{Sem impressão}}}$
	colesterol	5- α -colestano	colesterol	5- α -colestano		
MIP 6:1	1000	200	711,78	2,02	352,36	5,08
NIP 6:1			121,25	1,75	69,28	
MIP 1:5			921,20	27,69	33,27	
NIP 1:5			319,77	16,55	19,32	

Tabela 2.8. Parâmetros relacionados ao efeito de impressão (K_d , k , k') para colesterol e 7-dehidrocolesterol (7-DHCHO).

Adsorvente	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		K_d (mL g ⁻¹)		k	k' MIP/NIP
	colesterol	7-DHCHO	colesterol	7-DHCHO		
MIP 6:1	1000	1000	262,43	108,14	2,43	6,08
NIP 6:1			11,14	79,22	0,14	
MIP 1:5			92,18	77,13	0,12	0,10
NIP 1:5			40,38	28,65	1,41	

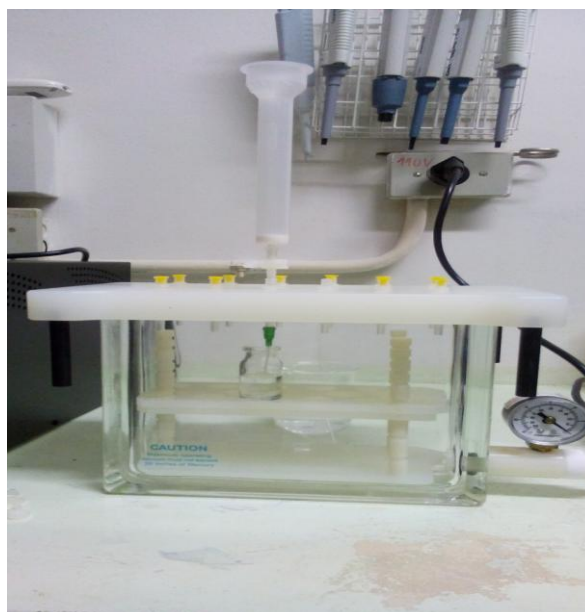
4.2. Utilização do material híbrido molecularmente impresso como sorvente em extração em fase em fase sólida (MISPE) para extração de colesterol total

Após verificar que o polímero híbrido na proporção 6:1, preparado na síntese I, foi o mais seletivo para colesterol, este material foi escolhido para fazer a extração seletiva de colesterol e também o *clean-up* do extrato hexânico da amostra de leite. Para o preparo do MISPE foram colocados 200 mg do polímero híbrido em um cartucho de 5,0 mL. Primeiramente, foi feito o condicionamento do material adsorvente com 5,0 mL de hexano, o qual foi usado na extração do colesterol total do leite, e na sequência foram percolados 5,0 mL do extrato de leite saponificado, preparado de acordo com o item 3.8. Para as etapas de lavagem e eluição do colesterol foi realizada uma otimização dos melhores solventes.

4.2.1. Otimização do protocolo MISPE para extração de colesterol em leite bovino

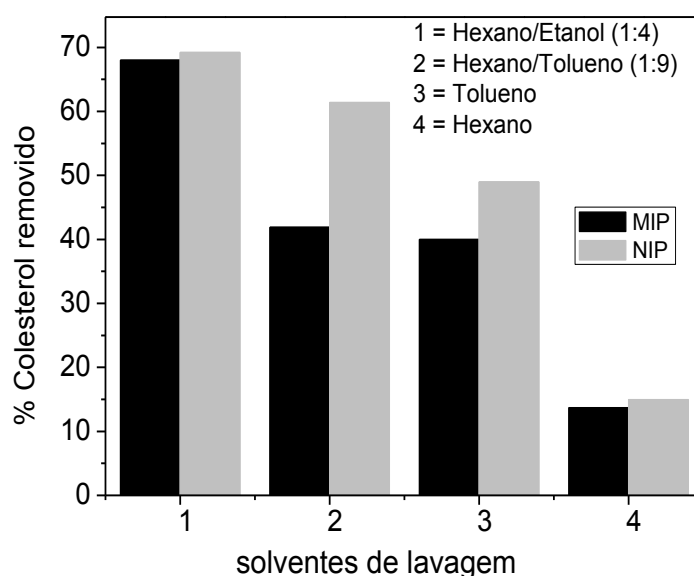
Para otimização do protocolo MISPE, o cartucho contendo o adsorvente híbrido, foi colocado num sistema manifold à vácuo, conforme mostra Figura 2.13. Após o condicionamento da coluna com hexano, foi realizada a percolação do extrato hexânico do leite saponificado, rendendo um percentual de adsorção de 88,3%. Posteriormente, com intuito de eliminar interferentes, foi realizada a etapa de lavagem e os seguintes solventes n-hexano e tolueno ou mistura de solventes como hexano:tolueno (1:9 v/v) e hexano:etanol (1:4 v/v), foram testados como solventes de lavagem. Foram utilizados 5,0 mL de cada um dos solventes de lavagem e 5,0 mL de etanol para eluição do colesterol.

Figura 2.13. Sistema manifold à vácuo utilizado na otimização do protocolo MISPE para extração de colesterol.



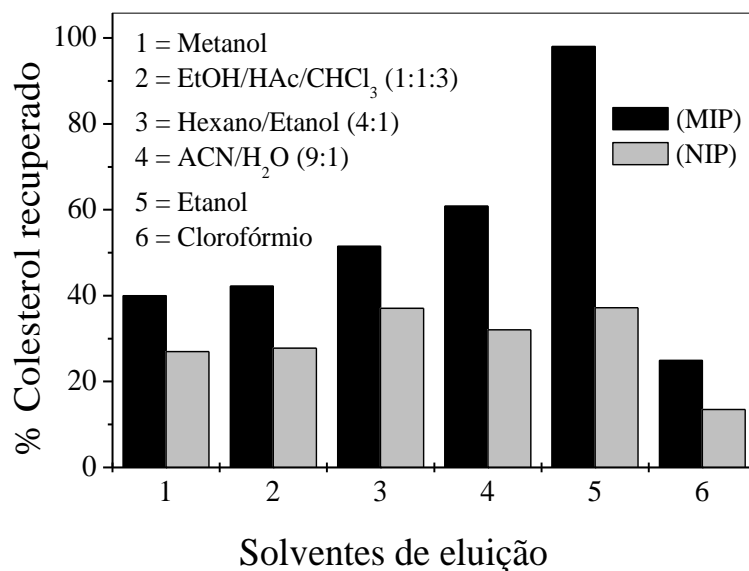
Todas as frações da etapa de lavagem foram recolhidas em frascos, secas a 40°C, redissolvidas em 5,0 mL na fase móvel e injetadas no HPLC-UV, e cada ensaio foi realizado em duplicata. Como se observa na Figura 2.14, hexano foi o melhor solvente de lavagem para reter satisfatoriamente o CHO no MIP. Este solvente não polar, também foi capaz de eliminar possíveis moléculas interferentes a partir da amostra e melhorar as interações específicas entre CHO e os sítios de ligação do MIP.

Figura 2.14. Percentual de remoção colesterol (%) em cartuchos de MIP usando diferentes solventes de lavagem.



Assim, 5,0 mL de hexano foi escolhido como solvente de lavagem. Para a etapa de eluição foram investigados os seguintes solventes: clorofórmio, etanol, acetonitrila:H₂O (9:1 v/v), hexano:etanol (4:1 v/v), etanol:ácido acético:clorofórmio (1:1:3 v/v/v) e metanol. A partir da Figura 2.15, nota-se que o CHO foi eluído quantitativamente do MIP utilizando 5,0 mL de etanol, sendo esta condição adotada como eluente no procedimento MISPE.

Figura 2.15. Percentual de recuperação de colesterol (%) em cartuchos de MIP utilizando diferentes solventes de eluição.



De acordo com os resultados obtidos a partir do procedimento MISPE, em que o hexano e etanol foram escolhidos nas etapas de lavagem e eluição, respectivamente, podemos inferir que a interação do CHO com os sítios de ligação do MIP ocorre por meio da formação da ligação de hidrogênio atribuída ao grupo carboxila do ácido metacrílico e do grupo hidroxila da molécula de CHO.

A Figura 2.16 mostra os cromatogramas de leite do extrato hexânico não purificados por SPE e aqueles em que a amostra foi aplicada para a limpeza no MIP e NIP. A Figura 2.17 mostra o cromatograma do extrato hexânico de leite submetido a SPE empregando C₁₈. Observa-se que, um cromatograma muito limpo pode ser obtido para as amostras de leite submetidas ao procedimento MISPE. A semelhança dos cromatogramas para extrato de leite hexânico e dos procedimentos de NIP e C₁₈ indicam, como esperado, a baixa eficiência de NIP e C₁₈ para a limpeza da amostra.

Figura 2.16. Cromatogramas do extrato hexânico de leite após saponificação e submetidos a procedimento SPE usando MIP ou NIP.

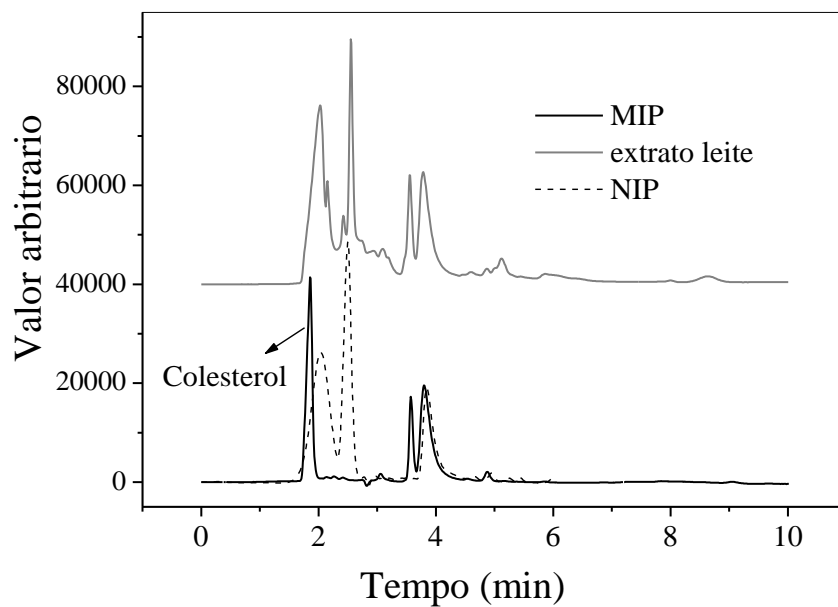
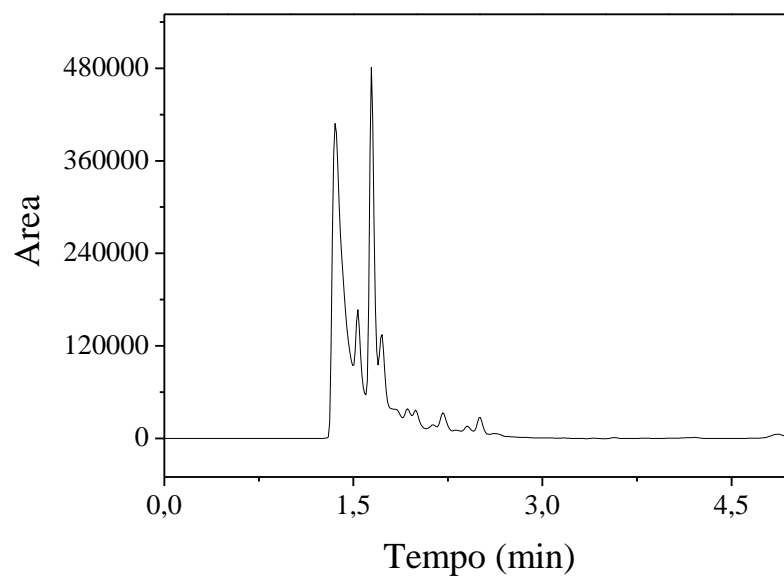


Figura 2.17. Cromatograma do extrato hexânico de leite após saponificação e submetido ao procedimento SPE usando C₁₈.



4.3. Estudo da capacidade exaustiva do polímero híbrido (Síntese I) sob condições dinâmicas (curva de ruptura)

O estudo da capacidade exaustiva dos polímeros foi realizado para determinar a capacidade máxima de adsorção do colesterol no polímero híbrido. A quantidade em massa adsorvida de colesterol no polímero poli(ácido metacrílico)/sílica foi determinada pela Equação 1, seção 3.4.1.

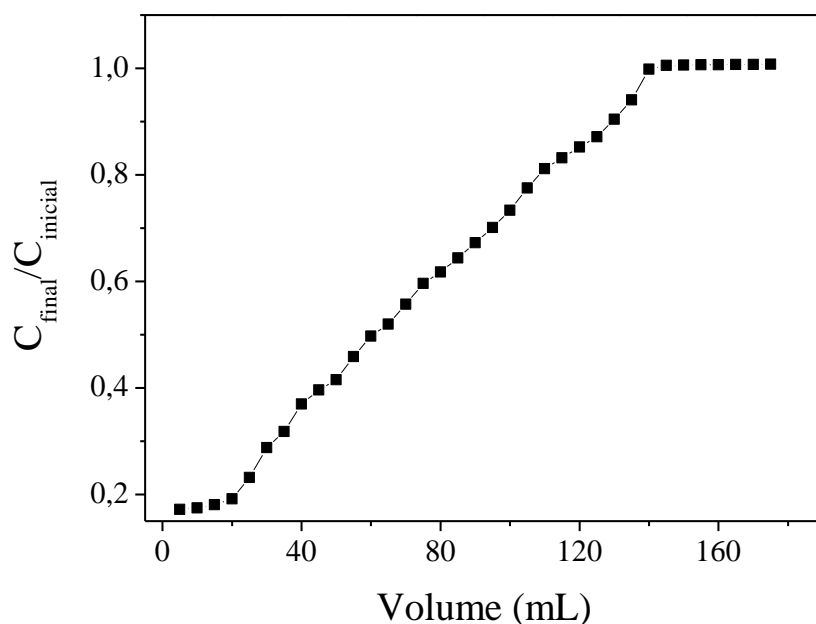
Alíquotas de 5,0 mL de solução de colesterol 100,0 mg L⁻¹, sob as condições previamente otimizadas, foram aplicadas através da coluna que continha 200,0 mg de MIP. As alíquotas foram recolhidas e a quantidade de colesterol foi determinada por HPLC-UV.

A curva de ruptura representada na Figura 2.18, mostrou que o volume de ruptura foi de 15,0 mL, o qual em massa corresponde a 7,49 mg g⁻¹. A saturação da coluna foi atingida com 140,0 mL de 100,0 mg L⁻¹ de solução de colesterol, o que reflete numa capacidade máxima adsorviva (CMA) de 29,51 mg g⁻¹ em condições dinâmicas.

4.4. Validação e aplicação do método proposto

No método MISPE otimizado para amostras de leite a percentagem de colesterol adsorvido no MIP na etapa de percolação da amostra foi de 88,3%, a eluição do colesterol foi de 13% na etapa de lavagem e a eluição quantitativa do colesterol foi 100%. Assim sendo, com intuito de avaliar a necessidade ou não de construir curvas com adição de padrão, soluções padrões de colesterol preparadas em meio hexânico foram submetidas ao protocolo MISPE.

Figura 2.18. Curva de ruptura do MIP 6:1 usando $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de colesterol a um fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. C: concentração de colesterol do efluente da coluna e C_0 : concentração inicial de colesterol de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$.



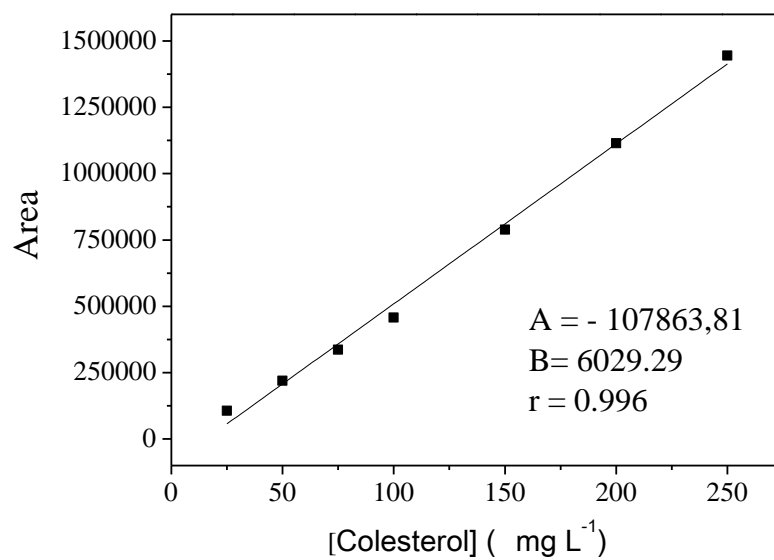
A quantificação do colesterol foi realizada usando curva analítica com calibração externa. Portanto, a utilização do método de adição de padrão, em que o padrão de colesterol é adicionado diretamente às amostras de leite, não foi necessária no método proposto.

A curva de calibração foi linear na faixa de $25,0$ (branco) – $250,0 \text{ mg L}^{-1}$, com coeficiente de correlação de $r = 0,996$ (Figura 2.19(a)), a qual foi obtido submetendo as soluções padrões de colesterol através do protocolo de MISPE. A Figura 2.19(b) mostra os cromatogramas relacionados a curva analítica.

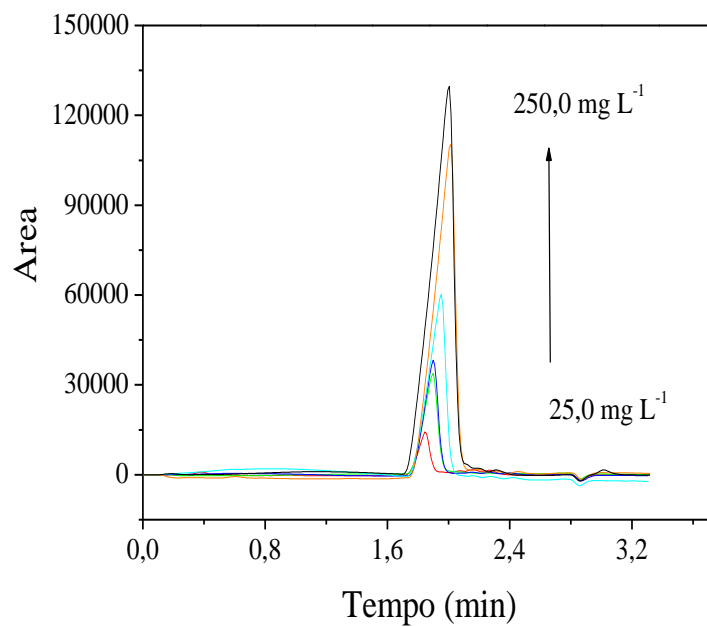
Os limites de detecção ($1,21 \text{ mg L}^{-1}$) e quantificação ($3,75 \text{ mg L}^{-1}$), foram calculados de acordo com a recomendação da IUPAC²⁶, ou seja, 3std/s e 10std/s , respectivamente, onde std é o desvio padrão de dez medições do branco, e s é a inclinação da curva de calibração.

Figura 2.19. (a) Curva analítica de colesterol e (b) cromatogramas relacionados à curva analítica.

(a)



(b)



A precisão do protocolo MISPE foi avaliada em termos de precisão intra-dia por meio das análises ($n = 10$) das concentrações de colesterol de 75,0 mg L⁻¹ e 150,0 mg L⁻¹, obtendo desvios padrões relativos (DPR) de 1,70 e 1,91%, respectivamente. Além disso, a precisão inter-dia (dois dias úteis consecutivos), utilizando dez medidas, também foram avaliadas para os mesmos níveis de concentrações de colesterol usados nas análises intra-dia. O DPR observado inter-dia variou de 4,10 até 3,50%.

A fim de verificar a aplicabilidade do protocolo MISPE para a análise de amostras de leite, diferentes marcas de leite integral UHT foram submetidas ao método desenvolvido. A quantidade indicada no rótulo de colesterol para a marca B foi de 27,0 mg 200 mL⁻¹, muito semelhante ao determinado pelo método proposto (26,79 mg 200 mL⁻¹). Após as análises das amostras, os testes de adição e recuperação foram realizados a fim de verificar a exatidão do método (Tabela 2.9). Os dados obtidos para as amostras com adição de colesterol apresentaram boas recuperações (96,6 -102,2%), atestando assim que o MISPE promove satisfatoriamente a limpeza da amostra e quando associado ao HPLC-UV, o método foi bastante adequado para a determinação de colesterol em amostras de leite.

É importante salientar também que vários ciclos de extração/eluição podem ser realizados utilizando apenas um cartucho sem redução da resposta analítica. A otimização, os estudos de seletividade, bem como a aplicação do método proposto, foram realizados utilizando o mesmo cartucho para mais de 100 ciclos de extração/eluição. Este valor é maior do que o obtido para outros polímeros, em que a capacidade de reutilização é de cerca

de 5 e 2 vezes para polímeros orgânico³⁸ e inorgânico²⁴ por processo sol-gel, respectivamente.

Tabela 2.9. Recuperação do colesterol em diferentes amostras de leite bovino integral após extração com MISPE (n = 2).

Leite bovino	Colesterol adicionado (mg L ⁻¹)	Concentração de colesterol encontrada (mg L ⁻¹) (amostra saponificada)	Recuperação (%)
	0	136,50 ± 0,52	-
A	35	168,38 ± 1,38	98,2
	70	200,65 ± 0,61	97,2
	0	133,95 ± 0,35	-
B	35	172,66 ± 0,18	102,2
	70	207,42 ± 0,76	101,7
	0	134,15 ± 0,53	-
C	35	172,21 ± 0,12	101,8
	70	204,76 ± 1,24	100,3
	0	137,20 ± 0,16	-
D	35	166,39 ± 0,45	96,6
	70	202,64 ± 0,94	97,8

5. CONCLUSÕES

O polímero híbrido contendo mais ácido metacrílico na rede polimérica apresentou maior capacidade máxima adsortiva para o colesterol, em comparação com o polímero preparado a partir da síntese II (MAA/TEOS 1:5). Os dados dos estudos cinéticos e isotérmicos, mostraram que a adsorção de colesterol pode ocorrer em sítios homogêneos e heterogêneos do material híbrido, ou seja, atribuída ao ácido carboxílico do monômero orgânico e ao grupo silanol (Si-OH) do precursor inorgânico. No que se refere a seletividade dos polímeros, observou-se que a maior seletividade foi

observada para o material que contém uma maior quantidade de MAA (síntese I), indicando assim, que o monômero orgânico controla os grupos ativos da cavidade da molécula molde. O polímero híbrido molecularmente impresso (razão molar MAA/TEOS 6:1) sintetizado ofereceu várias vantagens para limpeza e extração seletiva de colesterol em amostras de leite. Pode-se salientar as características morfológicas satisfatórias deste MIP em processo de adsorção que fornecem capacidade máxima de adsorção elevada ($29,51 \text{ mg g}^{-1}$) em condições dinâmicas e de alta capacidade de reutilização do material, porque apenas um cartucho recheado com este polímero híbrido foi empregado em todo método desenvolvido, sem perdas de eficiência de adsorção.

6. REFERÊNCIAS

1. Noppe, H.; Bizec, B. L.; Verheyden, K.; De Brabander. Novel analytical methods for determination of steroids hormones in edible matrices. *Anal. Chim. Acta*, v. 611, p. 1-16, 2008.
2. Adányi, N.; Váradi, M. Development of organic phase amperometric biosensor for measuring cholesterol in food samples. *Europ. Food Res. Technol.*, v. 218, p. 99-104, 2003.
3. Rozner, S.; Garti, N. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids & Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects*, v. 282, p. 435-456, 2006.
4. Ciardelli, G.; Borrelli, C.; Silvestri, D.; Cristallini, C.; Barbani, N.; Giusti, P. Supported imprinted nanospheres for the selective recognition of cholesterol. *Biosens. Bioelectron.*, v. 21, p. 2329-2338, 2006.
5. Ministério da Saúde. Informações de saúde: estatísticas vitais/mortalidade geral [homepage na Internet]. [citado em 31 julho 2014]. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/>
6. Puoci, F.; Curcio, M.; Cirillo, G.; Iemma, F.; Spizzirri, U. G.; Picci, N. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. *Food Chemistry*, v. 106, p. 836–842, 2008.
7. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. [homepage na Internet]. [citado em 31 julho 2014]. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/>
8. Cordova, C. M. M., Schneider, C. R., Juttel, I. D., Cordova, M. M. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2004, 83.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [homepage na Internet]. [citado em 31 julho 2014]. Disponível em: <http://www.portal.anvisa.org.br/alimentos/rotulos>.
10. Shi, Y.; Zhang, J. H.; Shi, D.; Jiang, M.; Zhu, Y.X.; Mei, S.R.; Zhou, Y. K.; Dai, K.; Lu, B. Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 16, p. 549-555, 2006.
11. Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. B. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 36, p. 237–251, 1993.
12. Pasin, G.; Smith, G.M.; O'Mahony, M. Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent. *Food Chemistry*, v. 61, p. 255-259, 1998.

13. Al-Hasani, S. M.; Hlavac, J.; Carpenter, M. W. Rapid determination of cholesterol in single and multicomponent prepared foods. *J. AOAC Int.*, v. 76, p. 902-906, 1993.
14. Saldanha, T.; Mazalli, M. R.; Bragagnolo, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, p. 109-112, 2004.
15. Ulberth, F.; Reich, H. Gas chromatographic determination of cholesterol in processed foods. *Food Chemistry*, v. 43, p. 387–391, 1992.
16. Tarley, C. R. T.; Visentainer, J. V.; Matsushita, M.; Souza, N. E. Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato sauce. *Food Chemistry*, v. 88, p. 1–6, 2004.
17. Zengin, A.; Yildirim, E.; Tamer, U.; Caykara, T. Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol. *Analyst*, v. 138, p. 7238-7245, 2013.
18. Pereira, L. A.; Rath, S. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 1063-1072, 2009.
19. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T. Polímeros biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. *Quim. Nova*, v. 28, p. 1076-1086, 2005.
20. 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. *Braz. J. Pharmac. Sciences*, v. 44, p. 361-375, 2008.
21. Hwang, C.-C.; Lee, W.-C. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. *J. Chromatogr. A*, v. 962, p. 69-78, 2002.
22. Hsu, C.-H.; Yang, M.-C. Enhancement of the imprinting effect in cholesterol-imprinted microporous silica. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 354, p. 4037–4042, 2008.
23. Zhong, N.; Byun; H.-S.; Bittman, R. Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers. *Tetrahedron Letters*, v. 42, p. 1839-1841, 2001.

24. Gupta, R.; Kumar, A. Synthesis and characterization of sol–gel-derived molecular imprinted polymeric materials for cholesterol recognition. *J. of Sol-Gel Science and Technology*, v. 58, p. 182-194, 2011.
25. Lv, Y.K.; Wang, L.-M.; Yang, L.; Zhao, C.-X.; Sun, H.-W. Synthesis and application of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)–silica hybrid composite material for selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of oxytetracycline residues in milk. *J. Chromatogr. A*, v. 1227, p. 48– 53, 2012.
26. Long, G. L.; Winefordner, J. D. Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, v. 55, p. 712-724, 1983.
27. Renkecz, T.; Mistlberger, G.; Pawlak, M.; Hováth, V.; Bakker, E. Molecularly imprinted polymer microspheres containing photoswitchable spiropyran based binding sites. *App. Mater. Interfaces*, v. 5, p. 8537 – 8545, 2013.
28. Corma, A. From microporous to mesoporous molecular sieve materials and their use in catalysis. *Chem. Rev.*, v. 97, p. 2373-2419, 1997.
29. Jamieson, A.; McNeill, I. C. The thermal degradation of copolymers of methyl methacrylate with methacrylic acid. *Eur. Polym. J.*, v. 10, p. 217-247, 1974.
30. Duran, D.; Ozdes, D.; Gundogdu, A.; Imamoglu, M.; Senturk, H. B. Tea-industry waste activated carbon, as a novel adsorbent, for separation, preconcentration and speciation of chromium. *Anal. Chim. Acta*, v. 688, p. 75-83, 2011.
31. Li, Y.; Yue, Q.; Gao, B. Adsorption kinetics and desorption of Cu(II) and Zn(II) from aqueous solution onto humic acid. *J. Hazard. Mater.*, v. 178, p. 455-461, 2010.
32. Diniz, K. M.; Segatelli, M. G.; Tarley, C. R. T. Synthesis and adsorption studies of novel hybrid mesoporous copolymer functionalized with protoporphyrin for batch and on-line solid-phase extraction of Cd²⁺ ions. *React. Funct. Polym.*, v. 73, p. 838-846, 2013.
33. Cáceres, L.; Escudey, A. M.; Fuentes, E.; Báez, M. E. Modeling the sorption kinetic of metsulfuron-methyl on Andisols and Ultisols volcanic ash-derived soils: Kinetics parameters and solute transport mechanisms. *J. Hazard. Mater.*, v. 179, p. 795–803, 2010.
34. Wang, Z.; Ainsworth, C.C.; Friedrich, D. M.; Gassman, P. L.; Joly, A. G. Kinetics and mechanism of surface reaction of salicylate and alumina in colloidal aqueous suspension. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v. 64, p. 1159-1172, 2000.

35. Carvalho, T. E. M.; Fungaro, D. A.; Izidoro, J. C. Adsorção do corante reativo laranja 16 de soluções aquosas por zeólita sintética. *Quím. Nova*, v. 33, p. 358-363, 2010.
36. Praus, P.; M. Turicová. A physico-chemical study of the cationic surfactant adsorption on montmorillonite. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 18, p. 378-383, 2007.
37. Wang, S.; Xu, J.; Tong, Y.; Wang, L.; He, C. Cholesterol-imprinted polymer receptor prepared by a hybrid imprinting method. *Polym Int.*, v. 54, p. 1268-1274, 2005.
38. Yavuz, H.; Karakoc, V.; Türkmen, D.; Say, R.; Denizli, A. Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles. *Int. J. Biological Macromol.*, v. 41, p. 8-15, 2007.
39. Sreenivasan, K.; Sivakumar, R. Ferric Iron-containing Molecularly Imprinted Polymer as an Adsorbent for Cholesterol. *Adsorpt. Sci. Technol.*, v. 21, p. 261-268, 2003.
40. Shengzu, Z.; Min, Z.; Fan, D.; Qi, X.; Xiao, M. Preparation of cholesterol imprinted polymerized organogel and selectivity adsorption ability. *Acta Polym. Sin.*, v. 4, p. 390-394, 2011.
41. Zengin, A.; Yildirim, E.; Tamer, U.; Caykara, T. Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol. *Analyst*, v. 138, p. 7238-7245, 2013.

CONCLUSÕES GERAIS

No Capítulo 1, a utilização da pasta de nanotubo de carbono *in natura* modificado com hemina, mostrou-se eficiente no preparo de sensor voltamétrico conferindo maiores picos de correntes anódicas e catódicas frente aos compostos hidroquinona e peróxido de hidrogênio, respectivamente, quando comparado aos sensores de pasta de nanotubo de carbono na ausência de hemina e também de carbono vítreo. Em adição aos efeitos positivos da não funcionalização ou pré-tratamento do CNT, a pasta CNT/hemina mostrou ser muito estável frente à várias medidas, além de ser aplicado com sucesso na determinação de hidroquinona e peróxido de hidrogênio em formulações farmacêuticas e odontológicas.

No Capítulo 2, destaca-se a síntese de polímeros híbridos de poli(ácido metacrílico)sílica preparados pela polimerização em bulk em duas proporções diferentes de ácido metacrílico e sílica. Podem-se destacar suas características morfológicas satisfatórias em processo de adsorção proporcionando alta capacidade máxima de adsorção frente aos polímeros desenvolvidos até o momento para colesterol, como esperado para materiais híbridos, pois a adição do precursor inorgânico na síntese é melhorar as características morfológicas dos materiais. Conforme foi apresentado, o polímero híbrido molecular poli(ácido metacrílico)/sílica na proporção MAA/TEOS 6:1 apresentou elevada seletividade para o colesterol na presença de moléculas estruturalmente análogas. Além disso, mostrou a limpeza e extração seletiva deste composto em amostras de leite. Possui a vantagem da reutilização do material, porque apenas um cartucho foi empregado em todo método desenvolvido, sem perdas de eficiência de adsorção (cerca de

100 análises). A síntese de material híbrido pode ser considerada promissora para a melhora do desempenho dos polímeros de impressão molecular e também pode ser expandida para outros analitos.

Por fim, conclui-se que tanto os nanotubos de carbono modificados como os polímeros híbridos molecularmente impressos, figuram-se como materiais interessantes no que se refere ao desenvolvimento de sensores voltamétricos e como adsorventes em extração em fase sólida para determinação de compostos de interesse farmacêutico e alimentício.