



Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química – Campus Araraquara-SP



Thalita Maschk Staboli

**“Desenvolvimento de sistema de análise para valerato de estradiol
baseado em polímeros biomiméticos”**

Araraquara

2011

Thalita Maschk Staboli

**Desenvolvimento de sistema de análise para valerato de estradiol
baseado em polímeros biomiméticos**

Trabalho de Conclusão de Curso
Instituto de Química UNESP/ARARAQUARA

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Maria Del Pilar Taboada
Sotomayor - IQ/CAr

Araraquara

2011

Thalita Maschk Staboli

**Desenvolvimento de sistema de análise para valerato de estradiol
baseado em polímeros biomiméticos**

Monografia apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte do requisito de Trabalho de Conclusão de Curso.

Araraquara, 07 de Dezembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof^a. Dra. Raquel Fernandes Pupo Nogueira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof^a. Dra. Hideko Yamanaka
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Araraquara

2011

*Aos meus pais, Sérgio e Simone, por
todo amor e dedicação.*

*À minha irmã Isabela pelo carinho
e apoio.*

*Ao meu namorado Gabriel, por
fazer os meus dias mais felizes.*

*Aos meus grandes amigos por
estarem ao meu lado em todos os
momentos.*

*À Deus por iluminar meu caminho
sempre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à professora Maria Del Pilar Taboada Sotomayor pela paciência, amizade e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao doutorando Ademar Wong por sempre me ajudar e ensinar.

Ao grupo de Eletroanalítica, todos de alguma forma, me ajudaram e me motivaram.

Ao professor Marcos Lanza (USP-SC) por disponibilizar seus equipamentos.

À professora Raquel Fernandes Pupo Nogueira e Hideko Yamanaka por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

Ao Instituto de Química de Araraquara, por me deixar preparada não só para o mercado de trabalho, mas também para a vida.

À todos os meus familiares, amigos e namorado, por acreditarem em mim e por me dar forças sempre.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.”

Chico Xavier

RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande importância para uma melhor qualidade na determinação de espécies químicas, assim, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos. Com isso, o emprego e otimização das etapas de separação/concentração se faz necessário. O emprego de polímeros molecularmente impressos (do inglês - "Molecularly Imprinted Polymers" - MIPs) tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta analítica com grande potencialidade para minimizar as limitações das técnicas de separação/concentração tradicionalmente empregadas. Em linhas gerais, os MIPs são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde (*template*) a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do futuro analito ou de uma molécula com estrutura análoga. No caso do presente trabalho, o *template* utilizado é o valerato de estradiol (VE), hormônio usado na terapia de reposição hormonal (TRH) durante o climatério. Após a polimerização em *bulk* e em meio anaeróbio utilizando MAA, EGDMA, AIBN, acetonitrila e VE, o MIP obtido foi triturado, peneirado (<120 µm) e colocado em sistema soxhlet contendo etanol a 60° C, para remoção da molécula impressa, através de seis lavagens sucessivas em períodos de 24 h. Essas águas de lavagem foram analisadas utilizando HPLC e espectrofotometria UV/Vis. A seguir, 150 mg de desse MIP seco foram colocados em cartuchos SPE, para avaliar a eficiência do polímero na pré-concentração e extração do analito. Para isto, 100,0 mL de soluções padrão de VE (2 mg L⁻¹) foram pré-concentradas a 4,0 mL min⁻¹, e eluídas com 10,0 mL de etanol a 1,0 mL min⁻¹, obtendo-se, recuperações de 53%. Adicionalmente, foi preparado um NIP (*non-imprinting polymer*) para comparação dos resultados obtidos, obtendo-se recuperação de 80%. Assim como, foram realizados estudos usando cartucho comercial Strata™ - X, obtendo-se recuperação de 53%. Visto que os resultados obtidos não refletiram aquilo esperado, que diz respeito à eficiência do MIP na recuperação, foi realizada uma simulação computacional a fim de obter-se o melhor monômero para a síntese do MIP. Como previsto, o monômero utilizado (MAA) que foi sintetizado com base na literatura, não era o mais indicado para a síntese do polímero para o VE, o que justifica a baixa eficiência obtida. Desta forma, estudos da seletividade do MIP com compostos com estruturas análogas ao VE foram realizados, onde obtiveram-se para o α-estradiol uma recuperação de 91% e para o etinilestradiol de 95%, podendo-se concluir que o polímero sintetizado utilizando MAA, é mais eficiente para essa última molécula. A seletividade também foi avaliada para compostos com estrutura diferente à dos estradióis. Para isso, foram testados os corantes, verde de metila (VM) e cloridrato de pararosanilina (CP), obtendo-se recuperação de 1,5% para VM e nenhuma detecção para o CP. Demonstrando, a alta seletividade do MIP para estradióis. Foram feitas também aplicações do MIP em amostras de interesse ambiental e clínico, enriquecidas com VE, obtendo-se recuperações bastante satisfatórias.

Palavras chave: valerato de estradiol; MIP; sistemas de pré-concentração (SPE).

ABSTRACT

The development of analytic methods more selective and sensitive is of great importance for a better quality in the determination of chemical species, therefore increasing the reliability of the results. In this way, the optimization of separation/concentration is still necessary. The use of Molecularly Imprinted Polymers – MIPs have demonstrated to be an efficient tool of analysis with a great potential in minimizing limitations of separation/concentration techniques traditionally employed. In general, the MIPs are obtained by polymerization in the presence of a template to be imprinted so that a polymeric skeleton is formed around the future analyte. In the present work, the template used is Estradiol Valerate (EV), compound used in the hormone replacement therapy (HRT) during climacteric. After the polymerization in bulk and in an anaerobic environment using MAA, EGDMA, AIBN, acetonitrile and VE, the obtained MIP was powdered, sifted ($<120\ \mu\text{m}$) and placed in a soxhlet system containing ethanol at $60\ ^\circ\text{C}$, in order to remove the imprinted molecule through six successive washes in periods of 24 hours. The water used in the washings was analyzed using HPLC and spectrophotometry UV/Vis. Then, the obtained MIP was dried at room temperature and 150 mg was inset in SPE cartridges in order to evaluate the polymer's efficiency in the analyte pre-concentration and extraction. To do so, 100,0 mL of VE standard solution (2mg L^{-1}) were pre-concentrated at $4,0\ \text{mL min}^{-1}$ and eluted with 10,0 mL ethanol at $1,0\ \text{mL min}^{-1}$, obtaining recoveries of 53%. Additionally, a NIP (non-imprinting polymer) was prepared to compare the obtained results, in which the recovery was 80%. In the same way, studies were conducted using commercial Strata™-X cartridges, obtaining 53% recovery. Since, the results did not reflect that than was expected, in relation with the MIP efficiency in the recovery, a computational simulation was conducted, in order to obtain the best monomer for the MIP synthesis. As expected, the employed monomer (MAA) that was synthesized based on the literature, was not the best for the synthesis of the polymer of VE, justifying the low efficiency observed. In this way, MIP selectivity studies with compound with structures analog to the VE were conducted, obtaining for the α -estradiol a 91% recovery and a 95% recovery for the ethinylestradiol. Thus, is possible to infer that the polymer synthesized using MAA is more efficient to the last molecule. The selectivity was also evaluated for compounds with different structure from the estradiol compounds. To do so, the methyl green (MG) and the pararosaniline hydrochloride (PH) dyes were used, obtaining a 1,5% recovery for the MG e none for the PH. Thus, the MIP is mainly selective to the estradiol molecules. Finally, the MIP application was make in environmental and clinical samples enriched with VE, obtained satisfactory results.

Keywords: *Estradiol Valerate; MIP, Pre-concentrations systems(SPE).*

Lista de Figuras

Figura 1: Disponibilidade de água no mundo e porcentagem da população mundial em cada continente	14
Figura 2: Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.	17
Figura 3: Representação do sistema endócrino humano	20
Figura 4: Estrutura química do núcleo ciclopentano – fenantreno.....	21
Figura 5: Estrutura molecular dos estradióis naturais e sintéticos.....	22
Figura 6: Representação esquemática do processo de impressão molecular.	25
Figura 7: Esquema representativo da síntese de MIP por “bulk”.	26
Figura 8: Estruturas moleculares dos iniciadores radicalares empregados na síntese do MIP.	30
Figura 9: Estruturas moleculares dos reagentes de ligação cruzada empregados na síntese do MIP.	31
Figura 10: Número de publicações científicas sobre MIP a partir de 1989.....	33
Figura 11: Síntese da mistura reacional para o MIP.	36
Figura 12: Síntese da mistura reacional para o NIP.	36
Figura 13: Processo de síntese do MIP e NIP.....	37
Figura 14: Esquema de remoção da molécula molde no MIP através do sistema soxhlet.....	38
Figura 15: Esquema de pré-concentração.	39
Figura 16: Esquema de filtração à vácuo da água do rio Jacaré-Guaçu.....	43
Figura 17: Polimerização da mistura reacional para o MIP e NIP.	45
Figura 18: Medidas realizadas em espectrofotômetro UV-Vis.....	46
Figura 19: Medidas realizadas em HPLC	48
Figura 21: Concentração de VE em função do número de lavagens, comparação dos dois métodos de análise.....	49
Figura 22: Resultados das simulações realizadas para avaliar a energia da interação do VE com os 20 monômeros propostos.....	52
Figura 23: Estrutura molecular dos três monômeros acusados na simulação como os mais indicados para síntese do MIP para VE.....	52
Figura 24: Cromatogramas do estudo de seletividade do MIP e NIP para os estradióis.....	54
Figura 25: Estrutura molecular do corantes verde de metila e cloridrato de pararosanilina.....	55
Figura 26: Cromatogramas da solução de passagem da pré-concentração (2 mg L ⁻¹) e da eluição com álcool metílico/ácido acético (9:1 v/v) para os corantes	56

Lista de Tabelas

Tabela 1: Monômeros tipicamente utilizados na síntese dos MIPs.	28
Tabela 2: Comparação das porcentagens de recuperação dos materiais adsorventes, MIP, NIP e Strata™-X.	49
Tabela 3: Monômeros comumente utilizados na síntese de MIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais.	51
Tabela 4: Valores de recuperação para 2 mg L ⁻¹ , vazão pré-concentração 4 mL min ⁻¹ ; vazão de eluição: 1 mL min ⁻¹ ; pré-concentração de 10x. Usando MIP e NIP para cada molécula.	53
Tabela 5: Valores de recuperação para 2 mg L ⁻¹ vazão pré-concentração 4 mL min ⁻¹ ; vazão de eluição: 1 mL min ⁻¹ ; pré-concentração de 10x. Usando MIP para cada corante.	57
Tabela 6: Valores de recuperação obtidos para VE em diversos tipos de amostras. Vazão pré-concentração 4 mL min ⁻¹ ; vazão de eluição: 1 mL min ⁻¹ . Usando MIP sintetizado com MAA.	57

Siglas e abreviações

AIBN 2-2'- azo-*bis*-iso-butironitrila

BCPs bifenilas policloradas

CP cloridrato de pararosanilina

EDs disruptores endócrinos (do inglês- *endocrine disruptors*)

EGDMA etileno glicol dimetacrilato

ETAs Estações de tratamento de água

ETEs Estações de Tratamento de esgoto

HPAs hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC Cromatografia Líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

MAA ácido metacrílico

MIP Polímero Molecularmente Impresso (do inglês - *Molecularly Imprinted Polymers*)

NIP Polímero não Impresso (do inglês - *Nom-Imprinted Polymers*)

pH potencial hidrogeniônico

SPE sistema de extração em fase sólida (do inglês – *Solid Phase Extraction*)

TRH Terapia de reposição hormonal

TRIM trimetilpropanotrimetacrilato

USEPA United States Environmental Protection Agency

VE valerato de estradiol

VM verde de metila

VP 4-vinilpiridina

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 FÁRMACOS NO AMBIENTE.....	15
1.1.1 DISRUPTORES ENDÓCRINOS.....	18
1.1.1.1 SUBSTÂNCIAS ESTROGÊNICAS.....	20
1.1.1.1.1 VALERATO DE ESTRADIOL.....	22
1.2 POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS OU DE IMPRESSÃO MOLECULAR	24
1.2.1 ESCOLHA DOS REAGENTES NA SÍNTESE DOS MIPs	26
1.2.2. BREVE HISTÓRICO DOS MIPs	32
2. OBJETIVO	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	35
3.2 SÍNTESES DO MIP e NIP	35
3.3 REMOÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE DO MIP	37
3.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRÉ- CONCENTRAÇÃO	38
3.5 ANÁLISES DE ACOMPANHAMENTO.....	40
3.5.1 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	40
3.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	40
3.5.2.1 EQUIPAMENTO DE HPLC UTILIZADO PARA ACOMPANHAMENTO DA EFICIÊNCIA DAS LAVAGENS DE MIP E NIP	40
3.5.2.2 HPLC UTILIZADO PARA ESTUDO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO MIP E APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS	41
3.5.2.3 HPLC UTILIZADO PARA ANÁLISES DE α-ESTRADIOL E ETINILESTRADIOL	41
3.5.2.4 HPLC UTILIZADO PARA SELETIVIDADE DO POLÍMERO COM OS CORANTES	42
3.6 ESTUDO DE SELETIVIDADE	42
3.7 ANÁLISE DE AMOSTRA ENRIQUECIDA	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 SÍNTESE DO MIP E NIP.....	45
4.2 REMOÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE DO MIP	45
4.2.1 RESULTADOS OBTIDOS USANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	46
4.2.2 RESULTADOS OBTIDOS USANDO HPLC	47
4.3 EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRÉ- CONCENTRAÇÃO	49

4.4 ESTUDO DA SELETIVIDADE	53
4.4.1 SUBSTÂNCIAS COM ESTRUTURA ANÁLOGA AO VE	53
4.4.2. SUBSTÂNCIAS COM ESTRUTURA DIFERENTE AO DO VE	55
4.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS ENRIQUECIDAS COM VE	57
5. CONCLUSÕES.....	59
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A água é um elemento essencial para a manutenção da vida dos seres vivos, encontra-se disponível em diversas formas sendo uma das substâncias mais abundantes na natureza (OTOMO, 2010).

Nosso planeta é constituído por 265.400 trilhões de toneladas de água, onde apenas 0,003% dessa massa, ou seja, 7,692 trilhões de toneladas representa a porção explorável. Esta está distribuída em aquíferos, rios e lagos (BRAGA, 2002).

Um corpo d'água pode ser utilizado tanto para o abastecimento como pode ser um receptor de efluentes urbanos e industriais. Através do consumo acelerado de produtos industrializados e com o crescimento populacional, foi notada uma alteração na disponibilidade de água potável e na sua qualidade (OTOMO, 2010). A Figura 1 é um exemplo da porcentagem populacional nos continentes e a disponibilidade de água. Pode-se notar a partir desta figura, que em algumas partes do planeta a porcentagem da população é bem maior do que a de água própria para consumo.

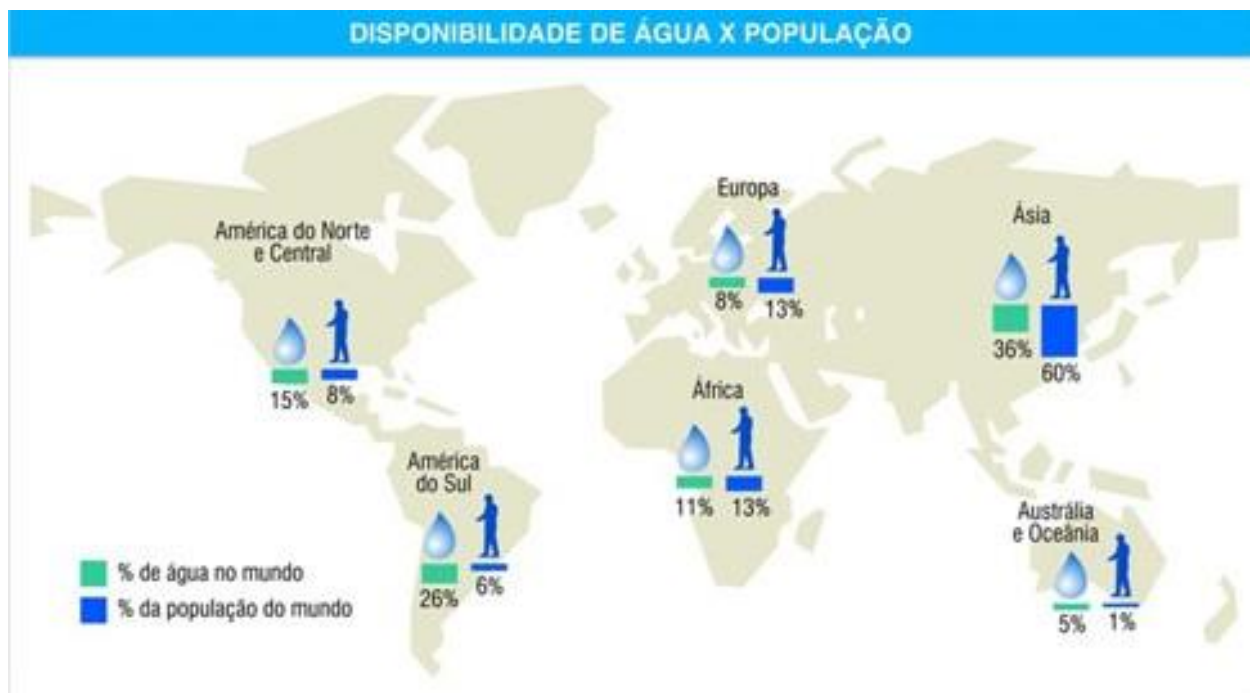


Figura 1: Disponibilidade de água no mundo e porcentagem da população mundial em cada continente (Fonte: UNESCO, 2002).

De acordo com previsões do Programa Ambiental das Nações Unidas, caso os hábitos de desperdícios e degradação dos recursos hídricos não se modifiquem, até 2025 dois terços da população mundial viverá em condição de escassez de água (SCARE, 2003).

Desta forma, é imprescindível o uso consciente da água e o desenvolvimento de alternativas para reutilizá-la.

O desenvolvimento de medicamentos, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas e aditivos alimentares, entre outros, trouxe muitos benefícios para os seres humanos. Entretanto, um aspecto que deve ser considerado é que após o seu uso, ou mesmo nas etapas associadas à sua produção, esses acabam atingindo o meio ambiente, seja na forma de resíduos sólidos, efluentes líquidos, emissões gasosas e, até mesmo, durante a sua utilização ou pelo lançamento acidental ou indiscriminado no meio ambiente (PROSAB, 2009).

A situação se torna preocupante quando se analisa a questão dos grandes centros urbanos, isto porque a variedade e quantidade de produtos químicos utilizados diariamente são significativas, tendo como destino final os cursos d'água próximos, seja através dos esgotos tratados nas estações ou pelo lançamento direto. Por esta razão, é necessário avaliar as implicações da presença de certas substâncias químicas no meio ambiente, principalmente nos mananciais de água que recebem esgotos tratados, ou *in natura*, drenagem de águas pluviais e efluentes industriais e que ainda são utilizados para abastecimento público (PROSAB, 2009).

1.1 FÁRMACOS NO AMBIENTE

Atualmente, princípios ativos farmacêuticos são empregados em grande escala na medicina humana e veterinária. Os fármacos são desenvolvidos para ser persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. Porém, segundo Mulroy, 50% a 90% de uma dose do fármaco típico é excretado inalterado, e persiste no meio ambiente (MULROY, 2001). Tornando-se assim um fator de contaminação para o ambiente. Seus resíduos chegam ao esgoto e às instalações de tratamento via excreções urinárias e fecais, podendo também ser de descargas hospitalares e industriais (HOVERSTAD, 1986).

Stumpf e colaboradores relatam em seus estudos, que a presença de fármacos residuais em águas superficiais pode ser um indicativo de contaminação por esgoto das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), como já mencionado, muitas dessas substâncias podem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas ETEs, com isso, alguns fármacos residuais resistem aos processos de tratamento convencional de água (STUMPF, 1999).

Diversas substâncias podem ser encontradas em esgotos domésticos, águas superficiais e de subsolo, tais como analgésicos, antibióticos, hormônios, anestésicos, antilipêmicos, antiinflamatórios, componentes de filtros solares entre outros (BILA, 2003).

De acordo com a Figura 2, fármacos utilizados na medicina humana e veterinária, assim como resíduos industriais, têm como destino final as Estações de Tratamento de Águas (ETAs) e de Esgoto (ETEs). Nesses locais e em águas naturais, a concentração de fármacos varia entre ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.

Pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no meio ambiente. Um provável caminho de fármacos residuais no ambiente aquático deve-se ao esterco ser usado como fertilizantes, contaminando assim águas subterrâneas. Outro exemplo de contaminação pode ser devido ao uso de lodo digestivo proveniente das ETEs na agricultura.

Já os antibióticos usados como promotores de crescimento na produção avícola e de gado são intensivamente utilizados na criação de porcos e nos aditivos de alimento de peixe na aquicultura. Estes fármacos podem contaminar águas subterrâneas e superficiais e o solo (BILA e DEZOTTI, 2003).

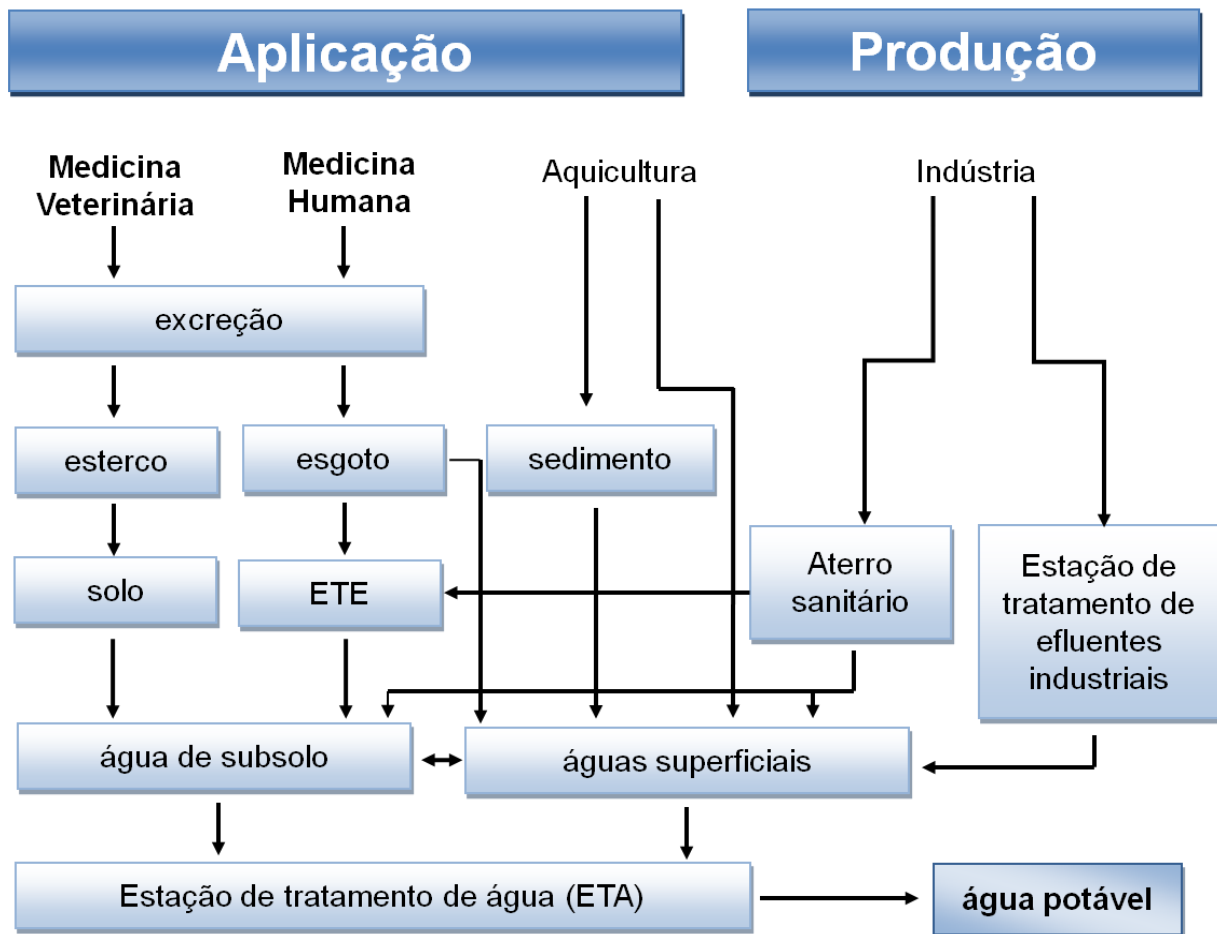


Figura 2: Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente. (Fonte: Adaptação BILA e DEZOTTI, 2003)

Como há uma grande variedade de fármacos no meio ambiente, os efeitos desses são adversos em organismos aquáticos e terrestres, o que é preocupante. Alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na ordem de ng L^{-1} (JORGENSEN, 2000).

McKeon e colaboradores constataram que a bactéria *Escherichia coli*, isolada de águas de subsolo de uma região rural, mostrou-se resistente frente a 16 antibióticos (MCKEON, 1995).

Outro trabalho focado em investigar a incidência de resistência microbiana foi realizado por Miranda e Castillo, onde uma espécie de aeromonas foi isolada de ambientes aquáticos, constatando que a resistência ocorreu com vários antibióticos testados, dentre esses, cloranfenicol, trimetropim, sulfametoxazol e tetraciclina (MIRANDA, 1998).

Recentemente, alguns pesquisadores investigaram um grupo específico de compostos químicos presentes no meio ambiente que são responsáveis por causar perturbações no sistema endócrino (hormonal) de organismos humanos e animais, conhecidos como disruptores endócrinos. Entre essas perturbações pode-se citar a feminização de peixes machos expostos a hormônios lançados nos rios através dos efluentes de ETEs (SUMPTER, 1998).

1.1.1 DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Muitas definições têm sido propostas para um disruptor endócrino. Entretanto, para todas elas existe um ponto em comum; trata-se de uma substância química (como, ftalatos, fenóis, HPAs, BCPs, pesticidas, hormônios sintéticos) que interfere no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies de animais, incluindo os humanos. Essa substância pode ser de origem antrópica, que pode ser denominada xenoestrogênios, ou de origem natural, como por exemplo, os fitoestrogênios. Podendo causar câncer, prejudica os sistemas reprodutivos (reduzindo a produção de espermatozóides) e causando efeitos adversos. Por esse motivo, tais substâncias são mundialmente denominadas "*endocrine disruptors*" (EDs) ou ainda "*endocrine disrupting compounds or chemicals*" (EDCs) (GHISELLI, 2007).

A definição de disruptor endócrino amplamente utilizada por pesquisadores foi publicada pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) sendo: "*disruptores endócrinos são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação do equilíbrio interno), reprodução, desenvolvimento e comportamento*" (USEPA, 1998; OTOMO, 2010).

Segundo Goettlich, os disruptores endócrinos são produtos químicos sintéticos ou naturais que atuam sobre o sistema endócrino humano e dos animais, mimetizando, bloqueando e/ou interferindo de alguma forma as instruções naturais dos hormônios nas células (GOETTLICH, 2006).

Em linhas gerais, o sistema endócrino (Figura 3) é responsável pelo controle do metabolismo, reprodução e crescimento do ser humano, fazendo esse controle através de glândulas, hormônios e células (OTOMO, 2010).

No ser humano, este sistema é constituído por três partes distintas:

- Glândulas especializadas: exemplo, hipotálamo, glândulas pituitárias, timo, tireóide, paratireóide, adrenais, pâncreas, pineal e as gônadas;
- Hormônios: são mensageiros químicos, sintetizados e segregados nas glândulas;
- Células-alvo: recebem os hormônios e desta forma respondem às necessidades corporais.

A hipófise ou pituitária é a principal glândula do sistema endócrino e é o hipotálamo que a controla. A hipófise influi direta ou indiretamente na produção e liberação de outros hormônios e está sob controle do sistema nervoso central. As paratireóides secretam o hormônio responsável pelo equilíbrio metabólico de cálcio e fósforo no organismo. A tireóide regula o metabolismo, ou seja, a proporção e a maneira pela qual os alimentos são transformados em energia. É responsável também pela produção de calor corporal e energia muscular, pelo crescimento e desenvolvimento, e pela distribuição e reserva de água e sais no corpo. Secreta os hormônios tiroxina e tri-iodo-tironina. As glândulas adrenais (supra-renais) são responsáveis por secretar, na corrente sanguínea, os hormônios adrenalina e noradrenalina. Também prepara o corpo para a ação em uma situação de perigo ou estresse. São também responsáveis pela produção de hormônios corticoides como a aldosterona, que mantém o equilíbrio de água e sais nos rins (íons K^+ e Na^+), os glucocorticóides, que aceleram o metabolismo e atuam no armazenamento dos açúcares, proteínas e gorduras, e também auxilia a produção de hormônios sexuais. O timo é a glândula associada ao sistema linfático, responsável por colher os detritos da atividade celular, pela distribuição de nutrientes (principalmente gorduras), e pelo transporte dos glóbulos brancos (leucócitos) (GHISELLI, 2007). O pâncreas secreta hormônios que controlam o sistema digestivo, o glucagon, a insulina e outras substâncias reguladoras dos níveis de glicose, lipídeos e glicogênio. A glândula pineal produz o hormônio melatonina, que é responsável pela regulação do sono e do ritmo biológico em humanos. E por fim as gônadas (ovários e testículos) que controlam as funções sexuais características, o comportamento e os hormônios sexuais. Nos ovários, o estrogênio (17β – estradiol) e nos testículos, o androgênio (testosterona) (LEANDRO, 2006).

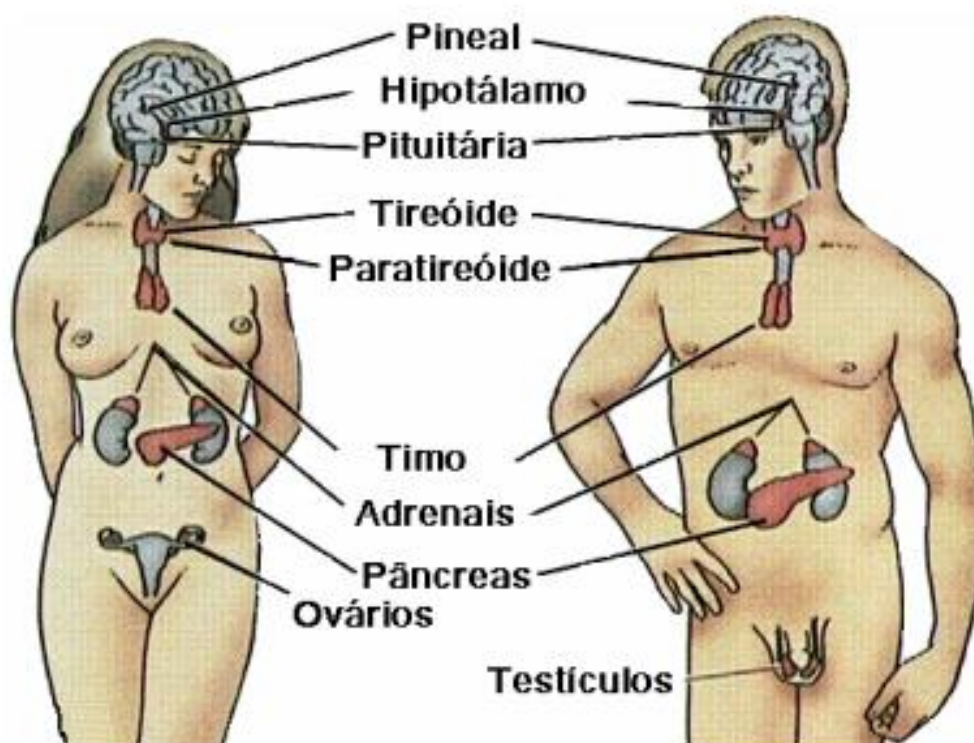


Figura 3: Representação do sistema endócrino humano (Fonte: SODRÉ, 2007)

1.1.1.1. SUBSTÂNCIAS ESTROGÊNICAS

Como já mencionado, os estrogênios são importantes disruptores endócrinos. Nos mamíferos, os hormônios estrógenos são sintetizados principalmente nos ovários, e em outros tecidos como placenta, tecido adiposo, cérebro, hipotálamo e tecido dos testículos. Estes hormônios derivam do colesterol e pregnenolona, que são transformados em androstenediona e testosterona, estes são precursores diretos dos três principais estrógenos naturais: estradiol, estrona e estriol (COMBALBERT, 2010).

Estrógenos (Figura 4) são constituídos por 18 átomos de carbono, distribuídos em três anéis hexagonais, denominados A, B e C, e um pentagonal (D). O que diferencia as moléculas estrogênicas é a posição dos substituintes hidroxílicos no núcleo ciclopentano-fenantreno (GAMA, 2010).

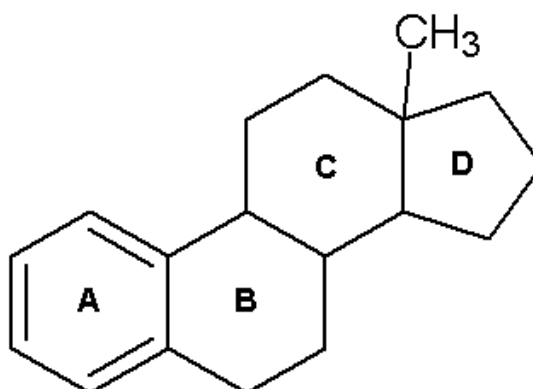


Figura 4: Estrutura química do núcleo ciclopentano – fenantreno.

Além de estrógenos naturais, como, estrona, estriol e 17 β -estradiol, há também os sintéticos, 17 α -estradiol, 17 α -etinilestradiol e valerato de estradiol (Figura 5), este último estudado neste trabalho é utilizado em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos. Os estrógenos sintéticos são os que despertam maior preocupação, tanto pela potência como pela quantidade continua introduzida no ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida para os receptores estrógenos e, portanto, resultam em respostas máximas de atividade estrogênica, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição de efluentes.

A principal preocupação na quantificação destes hormônios é centralizada nos efeitos adversos que elas produzem ao sistema reprodutor dos seres vivos, pois podem ser facilmente adsorvidos nos sedimentos dos sistemas aquáticos (CARBALLA, 2004).

Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta, de acordo com alguns estudos de pelo menos 10 dias, quando comparados a outros compostos orgânicos (como alguns pesticidas), os estrógenos são continuamente introduzidos no ambiente o que lhes concede um caráter de persistência (MAZELLIER, 2008).

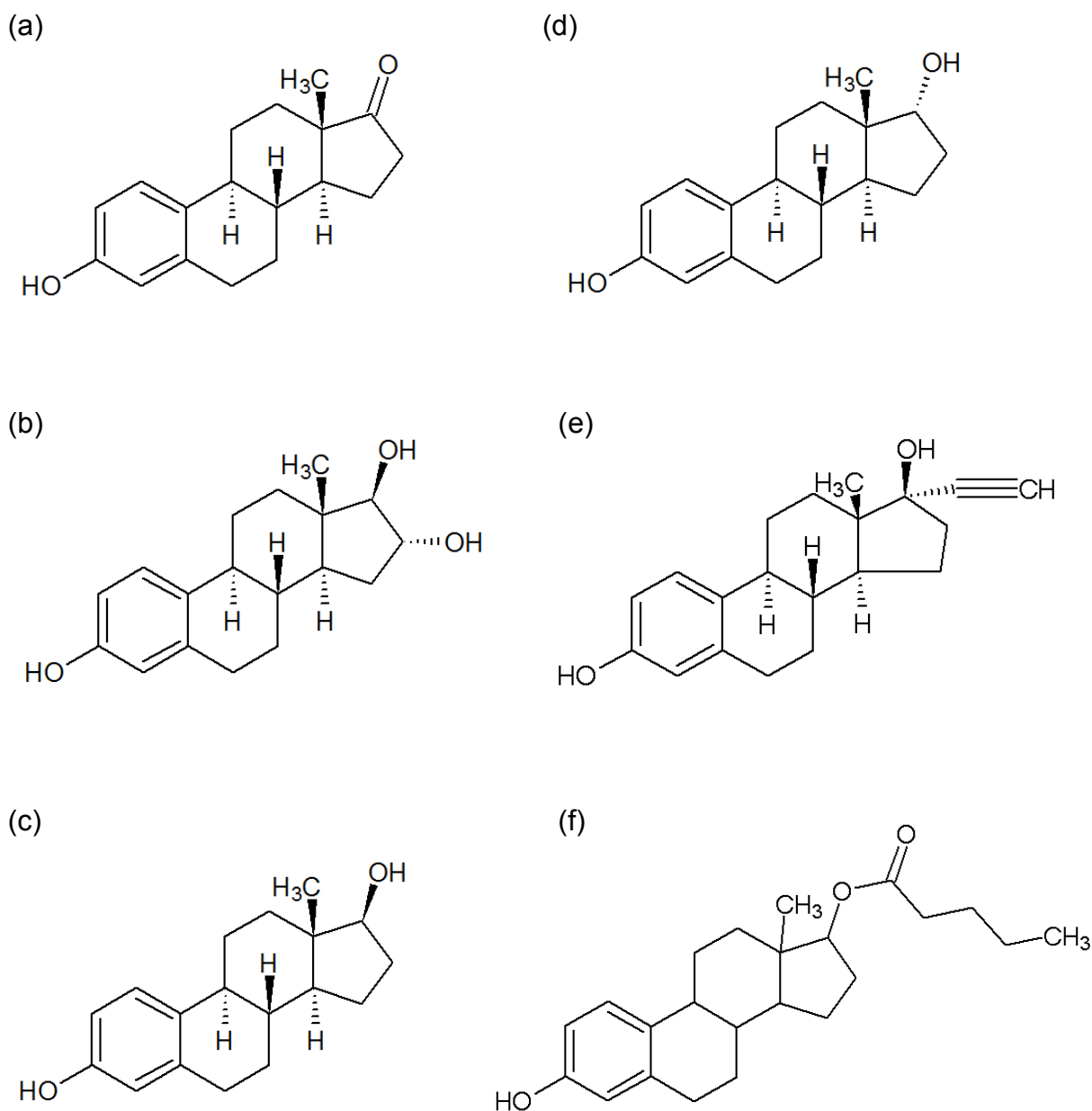


Figura 5: Estrutura molecular (a) estrona; (b) estriol; (c) 17β-estradiol; (d) 17α-estradiol; (e) etinilestradiol; (f) valerato de estradiol.

1.1.1.1 VALERATO DE ESTRADIOL

O valerato de estradiol (VE) é um hormônio sintético muito utilizado na medicina clínica. Sua nomenclatura oficial é 17-pentanoato, (17β)-estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol.

Este hormônio pode ser usado para tratar a síndrome da menopausa (climatério), câncer de próstata e pode ser utilizado juntamente com progesterona para a inibição da ovulação (DUAN, 1999).

O acetato de ciproterona associado ao valerato de estradiol é usado na terapia de reposição hormonal (TRH) no climatério, que nada mais é que a transição do período reprodutivo ou fértil para o não reprodutivo da mulher (DINÇ, 2003). Esse período ocorre após a menopausa (último ciclo menstrual), no qual ocorrem transformações metabólicas e hormonais que repercutem sobre o organismo feminino. Cessando por completo a menstruação, ocasiona-se endocrinologicamente a diminuição da atividade ovariana, e biologicamente existe a redução da fertilidade acarretando uma série de alterações no organismo da mulher (KHAN, 1994).

Entre os sintomas climatéricos estão: ondas de calor (fogachos), insônia, nervosismo, melancolia, vertigem, fadiga, palpitações, formigamento, incontinência urinária, entre outros. Através da TRH estes sintomas amenizam-se, além disso, a reposição é indicada para prevenir doenças cardiovasculares e osteoporose, é utilizada também para aumentar os níveis de colágeno da pele e melhorar a sexualidade (SPRITZER, 1998).

Recomenda-se que as mulheres menopausadas recebam estrogênio exógeno com a finalidade de manter ou melhorar os níveis de estrogênios, prevenindo assim os efeitos que a carência estrogênica exerce sobre os sistemas orgânicos.

Um breve levantamento da literatura revela diversas publicações relacionadas com a determinação de valerato de estradiol. Grande parte dos métodos descreve a análise em formulações contendo o fármaco em associação com outros hormônios, tais como o acetato de megestrol por espectrofotometria, enantato de testosterona por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) e acetato de medroxiprogesterona também por HPLC (MENDEZ, 2010). Atualmente, o método oficial de análise para esse hormônio é o HPLC, dado da Farmacopéia Inglesa.

1.2 POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS OU DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIPs)

O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande importância para uma melhor determinação de espécies químicas, assim, aumentando a confiabilidade dos resultados analíticos. Com isso, o emprego de etapas de separação/concentração se faz necessário. Devido à complexidade de algumas matrizes, aos baixos teores dos constituintes de interesse e à presença de interferentes em potencial, o desempenho de técnicas de separação/concentração pode ser prejudicado. Tendo isso em vista, o emprego de polímeros molecularmente impressos, ou de impressão molecular (do inglês - "*Molecularly Imprinted Polymers*" - MIPs) tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta analítica com grande potencialidade para minimizar as limitações das técnicas de separação/concentração tradicionalmente empregadas (GRASSI, 2008).

Este sistema com reconhecimento biomimético possui grandes semelhanças aos sistemas biológicos antígeno-anticorpo. Existem muitas vantagens da utilização dos MIPs em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) como: fácil preparo, baixo custo, possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula se encontra disponível, resistência a ambientes adesivos, como altas temperaturas e pressões, são estáveis em solventes orgânicos e resistem a variações de pH (PILETSKY, 2001; HAUPT, 1999). Estes polímeros podem ser armazenados a seco em temperatura ambiente por longos períodos de tempo, sem ao menos perder seu desempenho inicial.

Devido aos sítios de ligação dos MIPs, que apresentam afinidades e seletividades aproximadas aos dos sistemas anticorpo-antígeno, estes materiais são designados como polímeros biomiméticos, cujo objetivo é a melhoria na pré-concentração de amostras complexas contendo pequenas quantidades de analito. Neste sentido, não é surpreendente que exista atualmente uma forte tendência do seu uso como elementos de reconhecimento em sensores biomiméticos, em face da grande seletividade e sensibilidade inerentes às interações anticorpo-antígeno ou enzima-substrato (TARLEY, 2005b).

Dos constituintes da reação, bem como o princípio de preparo dos MIPs é simples, porém, sem a adequada combinação, bem como o tipo de procedimento

empregado na síntese, o polímero resultante pode adquirir características indesejáveis no que diz respeito à morfologia e a uniformidade das partículas e dos sítios seletivos (TARLEY, 2005a e 2005b).

Os MIPs são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do futuro analito ou de uma molécula com estrutura análoga. Após a polimerização a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito. Tal como esquematizado na Figura 6.

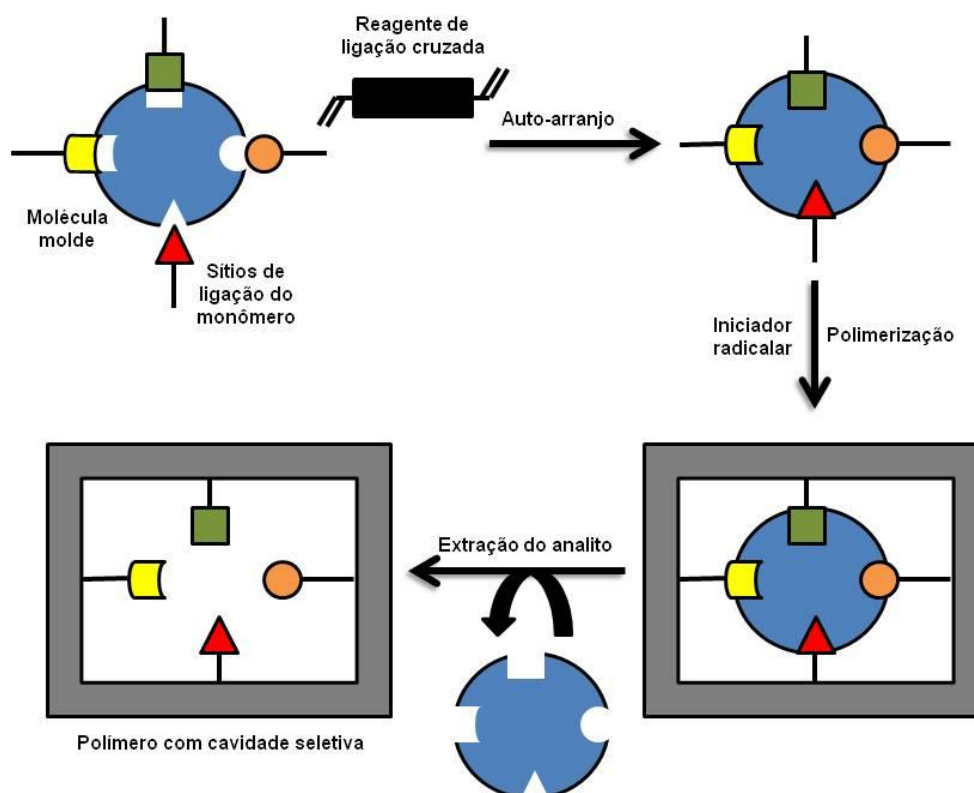


Figura 6: Representação esquemática do processo de impressão molecular.

O resultado dessa estratégia é uma "memória" molecular no polímero, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo do analito.

No que diz respeito aos métodos empregados na síntese de MIPs, a polimerização pelo método "bulk", esquematizado na Figura 7, é a mais utilizada devido a sua simplicidade de execução (TARLEY, 2005b).

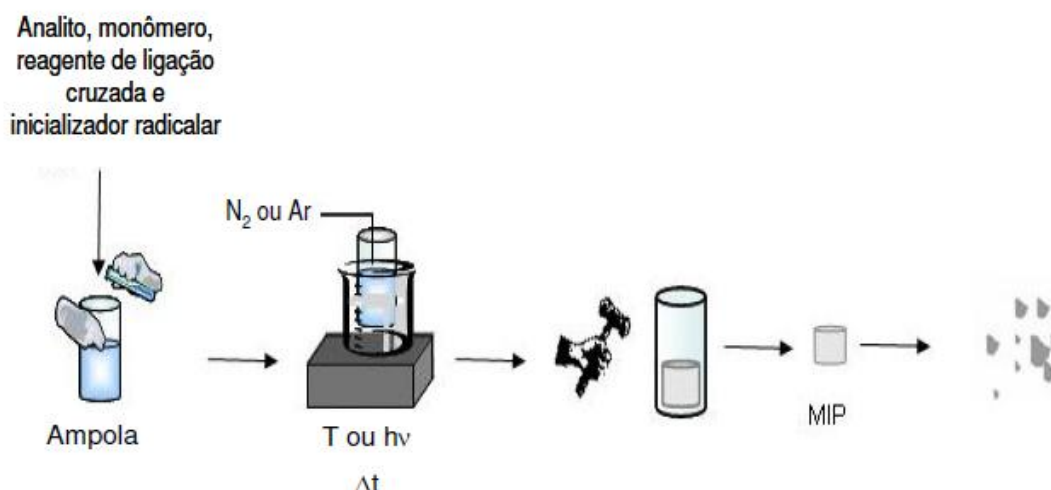


Figura 7: Esquema representativo da síntese de MIP por "bulk". (Fonte: GRASSI, 2008)

Este método de preparo é realizado em etapas, a primeira consiste em misturar em uma ampola, o monômero contendo grupos funcionais complementares àqueles da molécula molde formando assim o complexo monômero-molécula molde, essa interação é feita por meio de ligação covalente ou não covalente entre os grupos funcionais complementares (QIAO, 2006). Logo após, é adicionado ao meio um agente reacional que promove ligações cruzadas no polímero a fim de formar uma matriz polimérica rígida. Ao adicionar o iniciador radicalar a reação de polimerização é iniciada (COMARK, 2004). Esta polimerização é induzida por meio de calor e/ou luz UV, sob atmosfera de argônio ou de nitrogênio. O oxigênio deve ser eliminado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar (RACHKOV, 2000).

Por fim, o sólido polimérico resultante é moído e peneirado e submetido a lavagem com solvente para a extração do analito, visando seu uso posterior.

Vale ressaltar, que simultaneamente é realizada a síntese do NIP (do inglês *non-imprinted polymer*) sem a presença da molécula molde. Este polímero é fundamental para estudos de verificação molecular e deve ser feito sempre em simultâneo a um MIP.

1.2.1 ESCOLHA DOS REAGENTES NA SÍNTESE DOS MIPs

Para a síntese do MIP devem-se escolher criteriosamente os reagentes utilizados. Dentre estes, o monômero é um dos mais importantes visando obter MIPs

altamente eficientes. Esta molécula necessita conter em sua estrutura grupos funcionais capazes de interagir fortemente com o monômero, com a intenção de formar um complexo estável.

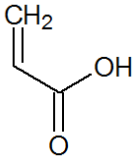
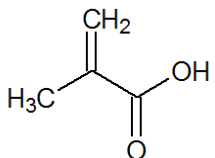
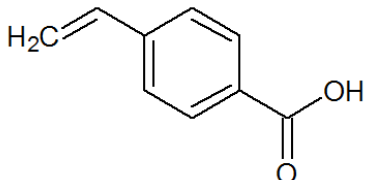
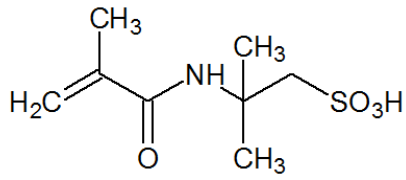
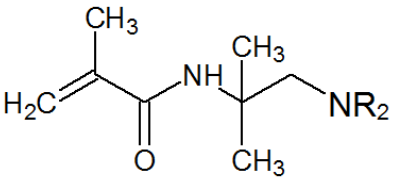
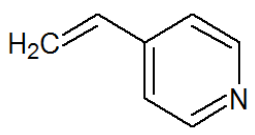
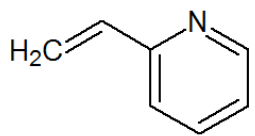
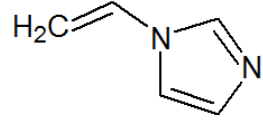
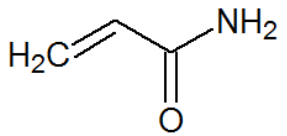
A interação monômero-molécula molde é governada por um processo em equilíbrio, quantidades superior do monômero em relação à molécula molde, devem ser empregadas com a finalidade de deslocar o equilíbrio da reação, formando assim maior quantidade de complexo monômero-molécula molde.

Como mencionado anteriormente, a interação monômero-molécula molde pode ser por meio de ligação covalente, ou não covalente como ligações de hidrogênio, interações iônicas, dipolo-dipolo, hidrofóbica ou ácido-base (TARLEY, 2005B; AL-KINDY, 2000).

Polímeros preparados por ligações covalentes possuem sítios mais seletivos, porém, estudos mostram que tais polímeros apresentam uma cinética lenta de retenção da molécula molde na cavidade do polímero. Já os polímeros preparados por ligações não covalentes com frequência apresentam diâmetros de partícula e sítios seletivos menos uniformes. Apesar dessas desvantagens, esta abordagem de preparo é a mais utilizada devido a maior flexibilidade de aplicação dos MIPs para diferentes analitos (TARLEY, 2005b). No caso das interações ácido-base, que são as mais comumente consideradas nas sínteses dos MIP, um ponto importante na escolha do monômero é saber se a molécula molde possui grupamentos ácidos ou básicos. Se possuir grupos ácidos, está interagirá melhor com monômeros com caráter básico, como a 4-vinilpiridina (VP). Se possuir grupos básicos, interagirá melhor com monômeros com caráter ácido, como o MAA (TARLEY, 2005b)

Na Tabela 1 estão reunidos alguns monômeros empregados para síntese dos MIPs.

Tabela 1: Monômeros tipicamente utilizados na síntese dos MIPs. (Fonte: Adaptado de TARLEY, 2005b).

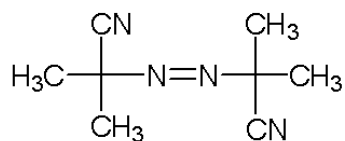
Monômero funcional	Nome do monômero	Interação com a molécula molde
	Ácido acrílico	Iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido metacrílico	Iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido <i>p</i> -vinilbenzóico	Iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido acrilamidossulfônico	Iônica
	Amino metacrilaminada	Iônica
	4-Vinilpiridina	Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-Vinilpiridina	Iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	1-Vinilimidazole	Iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio

Outro parâmetro que influencia na estabilidade da formação do complexo monômero–*template* é o solvente. Além de fornecer um meio onde o monômero e a molécula molde sejam solúveis, o solvente não deve interferir nessa interação monômero–*template*. Quando essa interação ocorre por meio de forças eletrostáticas e por ligação de hidrogênio, solventes apolares com constante dielétrica baixa (ex. clorofórmio, tolueno) oferecem um meio adequado para estabilizar as referidas interações. Solventes apolares com constante dielétrica alta (ex. acetonitrila) podem apresentar afinidade menos acentuada em ligar-se novamente à molécula molde. Já os solventes polares (ex. água, metanol) são poucos utilizados, pois de maneira geral, atuam como competidores no meio reacional interferindo na formação de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre molécula molde e monômero.

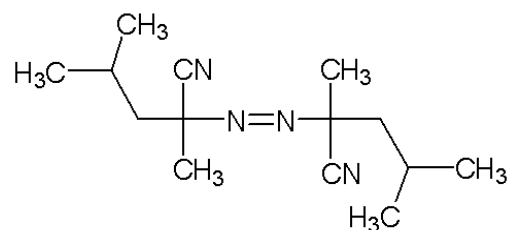
O iniciador radicalar 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) é o mais empregado na síntese de polímeros biomiméticos, mas outros também podem ser utilizados (Figura 8). A escolha desses reagentes é ditada pela interação do analito com o monômero. Se a interação ocorrer por ligação de hidrogênio, recomenda-se realizar a polimerização em baixas temperaturas, nessas circunstâncias, os iniciadores radicalares ativos fotoquimicamente são mais indicados (TARLEY, 2005b).

E por fim, além dos importantes parâmetros mencionados, a seletividade destes polímeros depende também do emprego de reagentes que promovam ligações cruzadas no polímero, permitindo assim a estabilidade do complexo monômero–molécula molde e, conseqüentemente, a rigidez do sítio seletivo formado. O etileno-glicol-dimetacrilato (EGDMA) é o reagente de ligação cruzada mais utilizado, pois ele promove a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa. A Figura 9 apresenta outros reagentes de ligação cruzada, porém, apenas o trimetilpropanotrimetacrilato (TRIM) tem apresentado resultados melhores ou similares ao EGDMA. (TARLEY, 2005b).

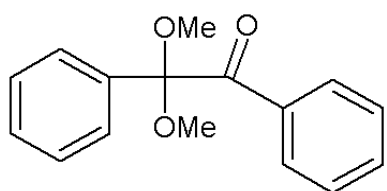
(a)



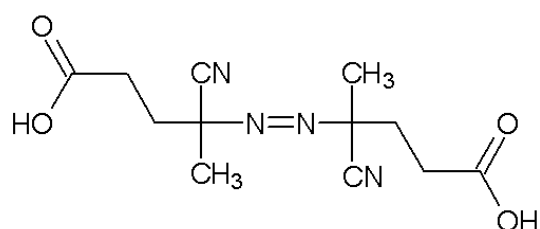
(c)



(b)



(d)



(e)

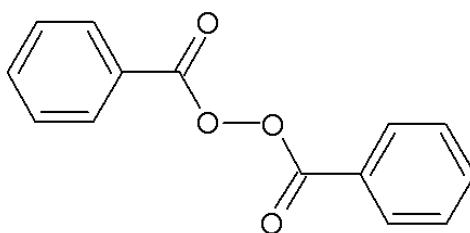


Figura 8: Estruturas moleculares dos iniciadores radicais empregados na síntese do MIP. (a) 2,2'-azobis(isobutyronitrila) (AIBN); (b) dimetilacetal de benzila; (c) azo-bis-dimetilvaléronitrila (ABDV); (d) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico); (e) peróxido de benzoíla (BPO).

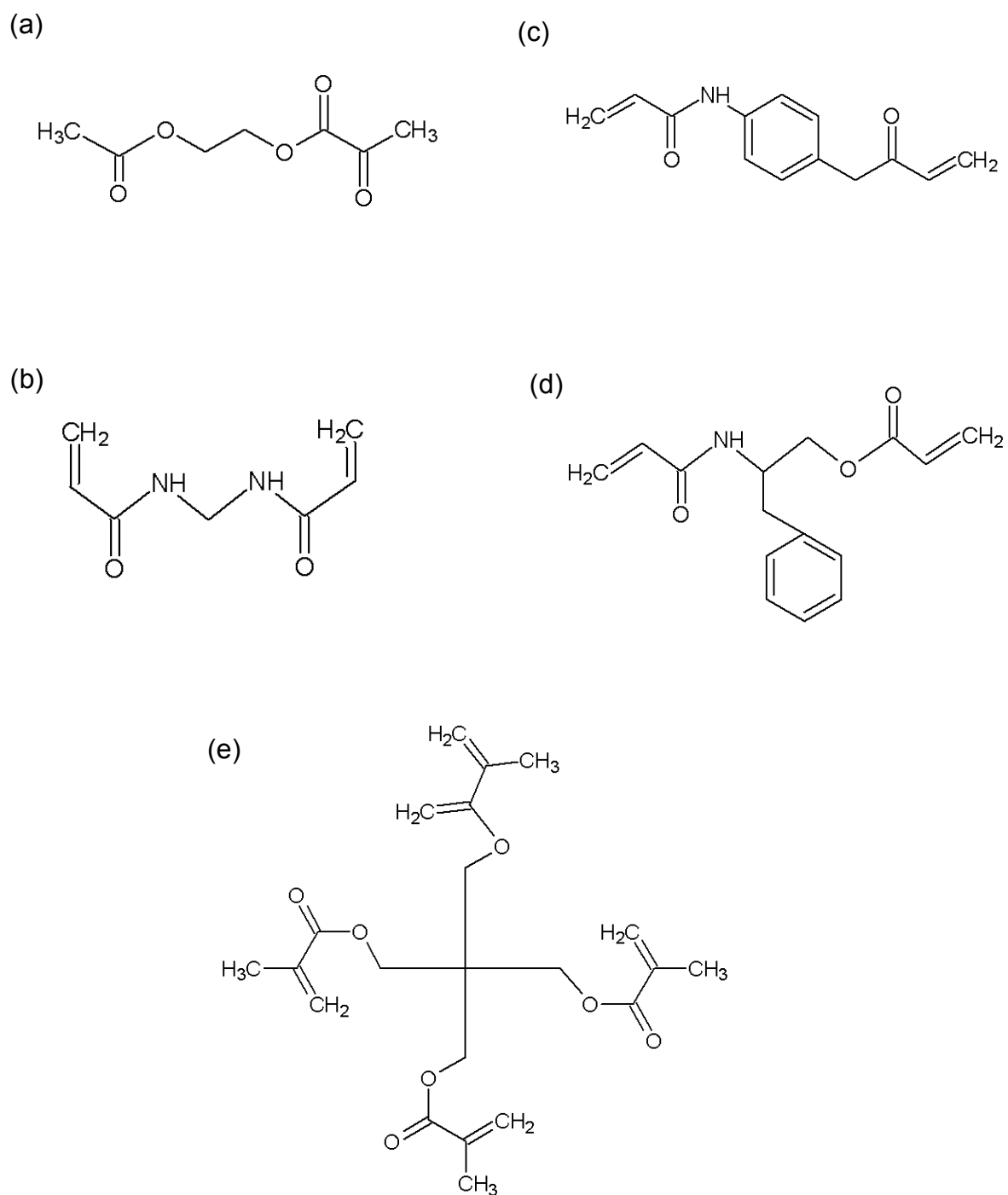


Figura 9: Estruturas moleculares dos reagentes de ligação cruzada empregados na síntese do MIP. (a) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA); (b) N,N'-metileno-bis-acrilamina; (c) N,N'-fenilendiacylamida; (d) N,O-bis-acriloíla-L-fenilalaninol; (e) trimetilpropano-trimetacrilato (TRIM).

1.2.2. BREVE HISTÓRICO DOS MIPs

A natureza das interações biomoleculares, como, enzima-substrato, fármaco-receptor e antígeno-anticorpo, sempre despertou interesse dos pesquisadores em se tratando dos fenômenos que regem a manifestação da resposta biológica e aos fatores responsáveis pela seletividade dessas interações.

Em 1972, Wulff e Sarhan sintetizaram um polímero orgânico enantioseletivo para ácido glicérico, onde as interações entre esse ácido e o monômero eram de natureza covalente. A principal característica desses polímeros era sua alta seletividade, como consequência da boa interação entre o monômero e a molécula molde. Entretanto, o processo de retirada da molécula molde do sítio de ligação mostrou-se difícil (WULFF, SARHAN, 1972; FIGUEIREDO, 2008).

Na década de 80, os pesquisadores Arshady e Mosbach, publicaram o primeiro artigo sobre um MIP, onde o monômero interagia com a molécula molde por meio de ligações não-covalentes, permitindo que o processo de desligamento fosse suscetível a fatores como modificação do pH, força iônica, solvente, dentre outros (ARSHADY, MOSBACH, 1981; FIGUEIREDO, 2008).

Em 1995, Whitcombe e colaboradores propuseram um novo MIP, onde a molécula molde e o monômero interagiram por ligações covalentes no momento da síntese e, por ligações não-covalentes no momento de re-ligação (outras ligações da molécula molde com o sítio do MIP). Após a síntese, foi necessária uma hidrólise para a retirada da molécula molde do sítio do MIP, permanecendo nesse local, grupos ligantes capazes de interagir não-covalentemente com a molécula molde em futuras interações. Com isso, foi possível associar as vantagens inerentes às metodologias de síntese covalente e extração não-covalente (WHITCOMBE, 1995; FIGUEIREDO, 2008).

A partir da década de 90 observou-se um aumento do número de trabalhos sobre MIPs (Figura 10) denotando sua importância em diversas áreas da ciência, com destaque para a química analítica, bioquímica e ciências farmacêuticas. Do número total de trabalhos publicados, 1,15% relaciona o emprego dos MIPs com hormônios.

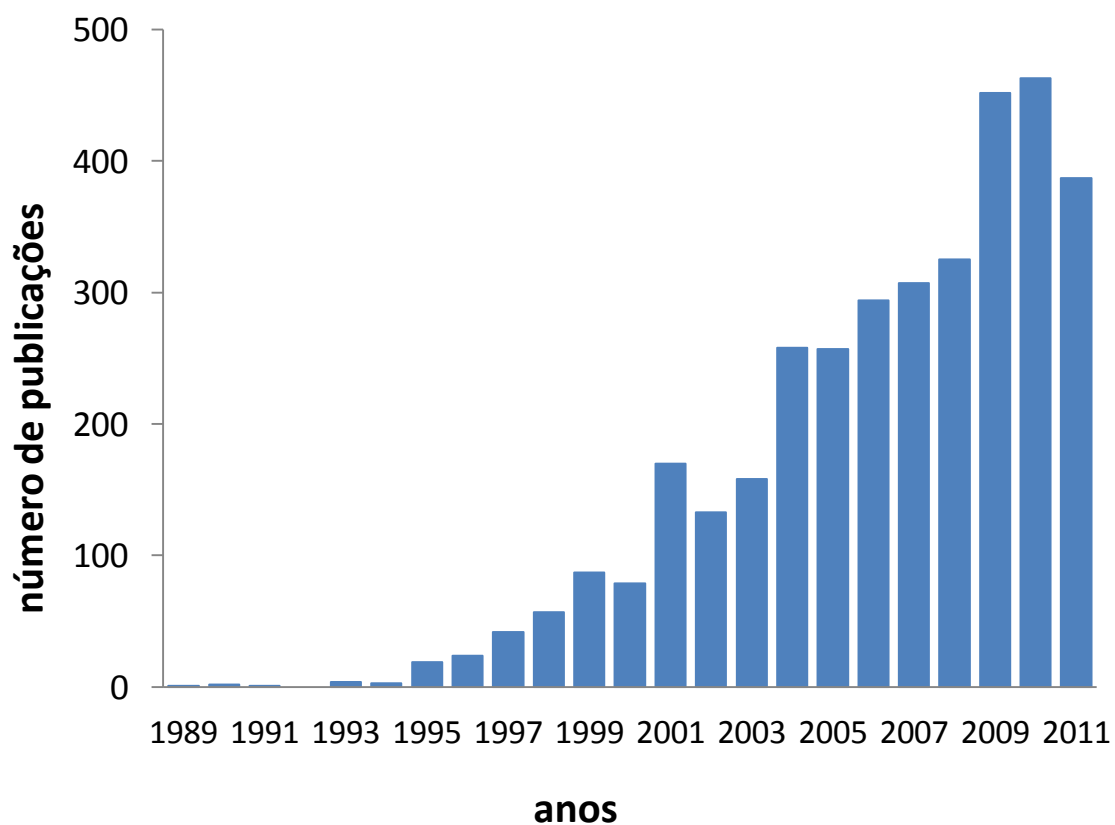


Figura 10: Número de publicações científicas sobre MIP a partir de 1989. (Fonte: web of knowledge (www.webofknowledge.com), acessado no dia: 07/11/2011. Palavras-chave: molecularly imprinted polymer).

2. OBJETIVO

Desenvolvimento de métodos analíticos para pré-concentração e quantificação de valerato de estradiol em amostras em interesse farmacêutico e ambiental, utilizando polímeros biomiméticos (MIPs) como materiais adsorventes em SPE (sistemas de extração em fase sólida).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou quando necessário HPLC, e utilizados tal como adquiridos.

O ácido acético glacial foi fornecido pela Ecibra[®], o ácido metílico da Synth[®], os hormônios: α -estradiol Vetranal[®], etinilestradiol Vetranal[®], valerato de estradiol; assim como o ácido metacrílico (MAA), o 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrila (AIBN) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. A acetonitrila P.A. foi fornecida pela VETEC-Química Fina[®]. O etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e o álcool etílico foram na marca Fluka[®].

3.2 SÍNTESES DO MIP e NIP

As sínteses do MIP e no NIP foram feitas pelo método de polimerização em “*bulk*” conduzidas em tubos de ensaio de 50 mL de capacidade. A diferença entre os polímeros sintetizados é a presença e a ausência da molécula molde, respectivamente.

No MIP, a molécula molde empregada foi o hormônio valerato de estradiol. O monômero escolhido foi o MAA. Adicionou-se à esta mistura reacional o reagente de ligação cruzada EGDMA; como iniciador radicalar escolheu-se o AIBN e finalmente o solvente, que no caso foi a acetonitrila. As escolhas dos reagentes foram feitas a partir da literatura (RACHKOV, 2000). Borbulhou-se então na mistura N₂ durante 10 minutos, a fim de remover o oxigênio do meio reacional (Figura 11).

Para o NIP o mesmo procedimento foi seguido, mas como já citado, não houve o emprego de uma molécula molde (Figura 12).

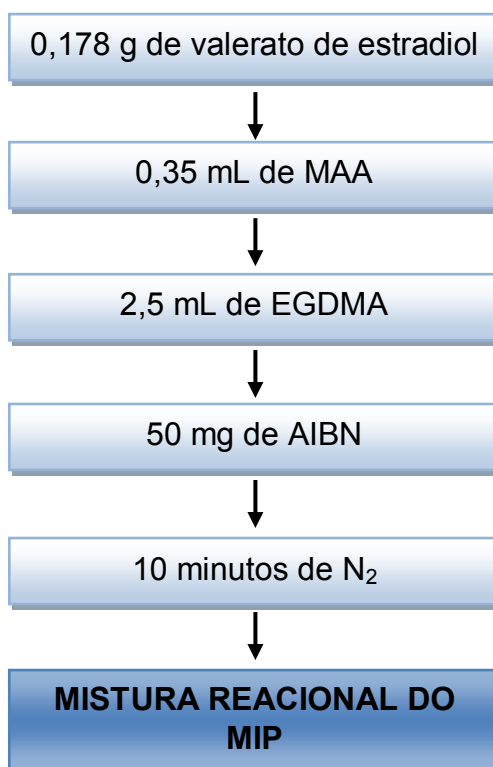


Figura 11: Síntese da mistura reacional para o MIP.

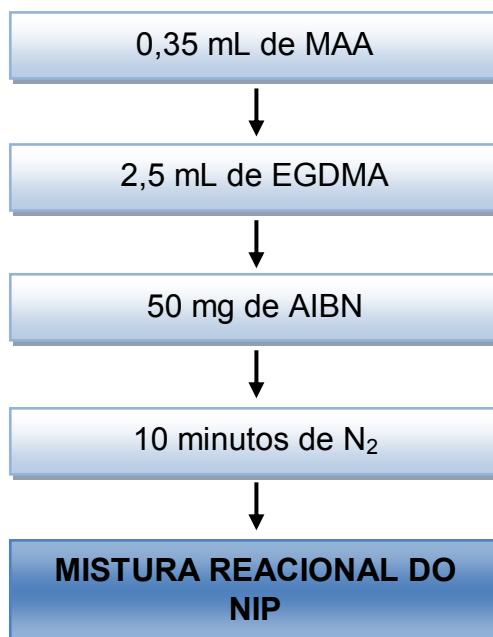


Figura 12: Síntese da mistura reacional para o NIP.

As misturas obtidas para MIP e NIP foram colocadas em banho termostático durante 16 h, a 60 °C, a fim de obter os polímeros (Figura 13). Após esse tempo e condições, os sólidos formados foram secos à temperatura ambiente durante 24 h (RACHKOV, 2000). Ao término da secagem, estes foram triturados em gral e peneirados (malha de 120 µm).

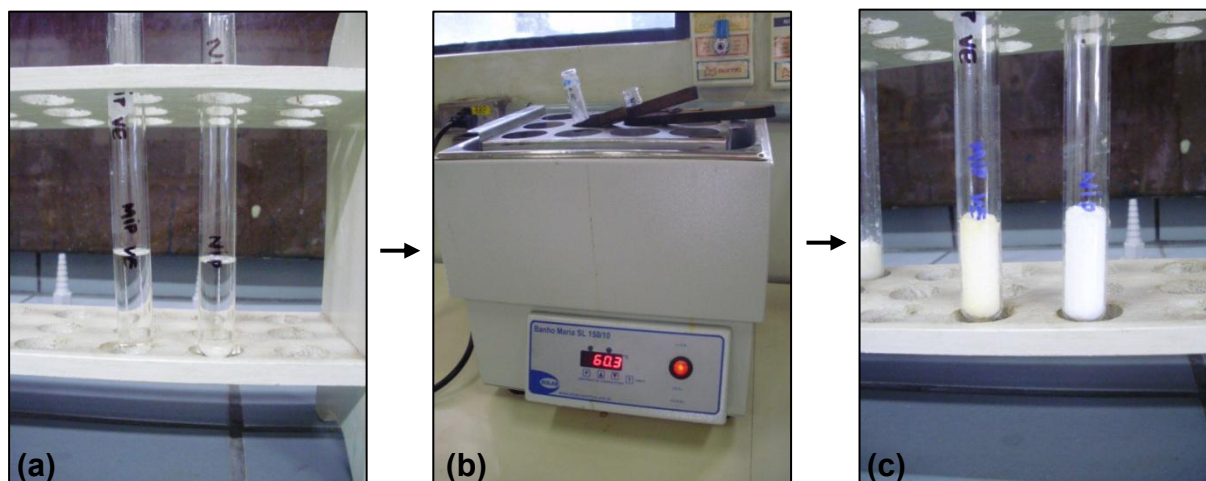


Figura 13: Processo de síntese do MIP e NIP. (a) Mistura reacional do MIP e NIP, respectivamente; (b) Banho termostático a 60 °C durante 16 horas; (c) Obtenção dos polímeros (MIP e NIP, respectivamente).

3.3 REMOÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE DO MIP

Os polímeros peneirados foram envoltos em papel de filtro e introduzidos no sistema soxhlet para a remoção da molécula molde (VE), no MIP. No NIP, como não há a molécula molde, o procedimento de lavagem foi feito apenas uma vez apenas para confirmação da ausência de VE. Em cada lavagem utilizou-se 100 mL de álcool etílico a 60 °C durante 24 horas. Nesse período, utilizando o método soxhlet de lavagem, o polímero foi mantido sob um refluxo contínuo da solução de extração (álcool etílico). Esta solução de extração foi mantida em um balão e aquecida até seu ponto de ebulição, que após em contato com o MIP no destilador vertical, extraia o hormônio presente no MIP. Por sua vez, o solvente de extração era recolhido

novamente no balão para posterior aquecimento, ebulição e condensação, e assim continuar com a “dissolução” do hormônio no MIP.

Cada água de lavagem, do MIP e NIP, foi devidamente guardada para análise em espectrofotômetro UV-Vis e HPLC. O esquema de lavagem dos polímeros é ilustrado na Figura 14.

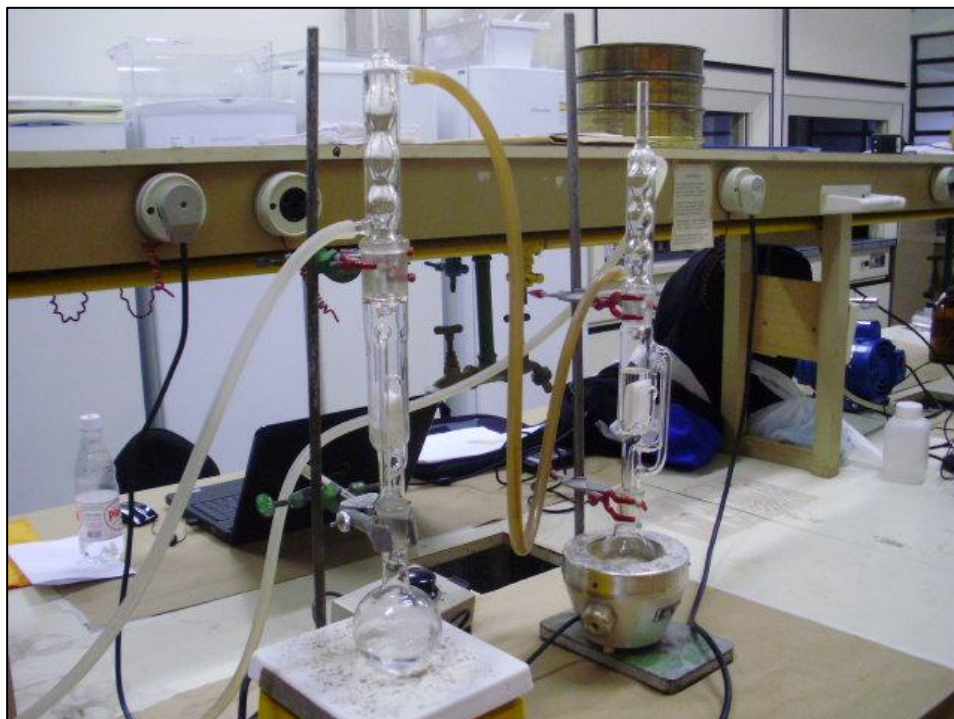


Figura 14: Esquema de remoção da molécula molde no MIP através do sistema soxhlet. Simultaneamente a lavagem do NIP também foi feita para análises.

3.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Os polímeros limpos, ou seja, ausentes de VE, foram secos a temperatura ambiente. Colocou-se então 150 mg de MIP limpo em cartucho de extração em fase sólida (SPE), para avaliar a eficiência do polímero na pré-concentração e extração do analito. Realizou-se o mesmo procedimento para o NIP. Para tal avaliação, preparou-se 100,0 mL de solução padrão de VE em água deionizada (2 mg L^{-1}) que foram pré-concentradas à vazão de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$, e posteriormente eluídas com 10,0

mL de etanol a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, tanto a solução obtida da pré-concentração quanto a obtida pela eluição foram analisadas em HPLC. Realizou-se o mesmo procedimento para o NIP. A Figura 15 mostra o esquema de pré-concentração usado neste trabalho.

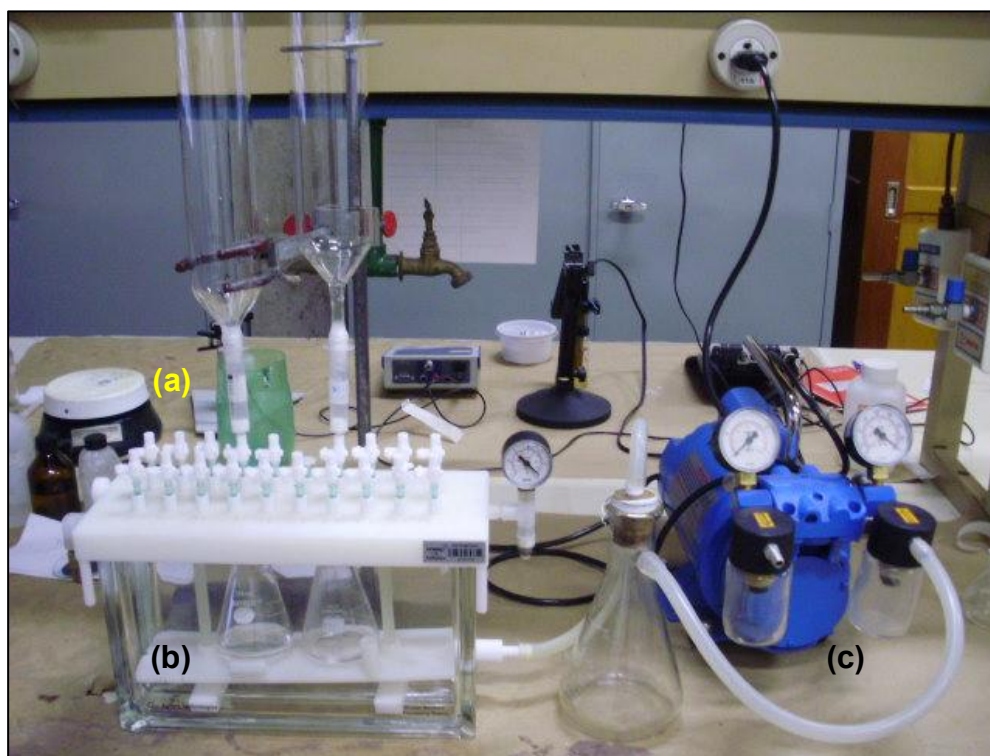


Figura 15: Esquema de pré-concentração. Utilização de cartuchos SPE com MIP ou NIP (a); Vacuum Manifold da Agilent® Technologies (b) e bomba de vácuo (c).

O mesmo procedimento foi realizado empregando o cartucho comercial Strata™ - X, com a finalidade de comparar a recuperação com os polímeros sintetizados. Preparou-se 100,0 mL de solução padrão de VE em água deionizada (2 mg L^{-1}) que foram pré-concentradas à vazão de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ no cartucho comercial, e posteriormente eluídas com 10,0 mL de álcool etílico a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, tanto a solução obtida da pré-concentração quanto a obtida pela eluição foram analisadas em HPLC.

3.5 ANÁLISES DE ACOMPANHAMENTO

Como já citado, utilizou-se espectrofotometria UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência para as análises deste trabalho monográfico.

3.5.1 ESPECTROFOTÔMETRIA UV-VIS

Para avaliar a limpeza do MIP e NIP descrita no tópico 3.2, foram registrados espectros na região UV/Vis na faixa de comprimentos de onda de 190 nm a 400 nm, utilizando Espectrofotômetro UV-Vis HP Hewlett Packard®.

3.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

3.5.2.1 EQUIPAMENTO DE HPLC UTILIZADO PARA ACOMPANHAMENTO DA EFICIÊNCIA DAS LAVAGENS DE MIP E NIP

As medidas cromatográficas para esse acompanhamento foram realizadas no Instituto de Química da USP-SC, no laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Marcos R.V. Lanza. Para isto foi usado um cromatógrafo líquido da Shimadzu® modelo 20 A, com detector UV/Visível SPD-20A, mostrador automático SIL-20A e degaseificador DGU-20A5, acoplado a um microcomputador pessoal.

A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa C18 da marca Shimadzu Shim – Pack CLC – ODS®.

Segundo estabelecido pela *–Official Monographs*” para VE, a fase móvel consistiu de 30% de solução A e 70% de solução B. Onde a solução A foi preparada com 0,8 g de nitrato de amônio em 1,0 L de água deionizada. E a solução B foi acetonitrila. A vazão da fase móvel foi de 2,0 mL min⁻¹, o comprimento de onda, estabelecido pelos espectros obtidos, foi de 280 nm e o volume injetado de amostra de 20 µL. O tempo de corrida de cada amostra foi de 40 minutos.

3.5.2.2 HPLC UTILIZADO PARA ESTUDO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO MIP E APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

As medidas cromatográficas para esse acompanhamento foram feitas no laboratório coordenado pela Profa. Dra. Raquel Pupo Nogueira no IQ/CAr, em cromatógrafo líquido HPLC–DAD Shimadzu® modelo LC – 20AT, acoplado a um microcomputador pessoal.

A fase estacionária foi uma coluna Phenomenex Luna® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), à temperatura de análise de 40 °C.

A fase móvel consistiu de 10% de solução A e 90% de solução B. Onde a solução A foi água deionizada e a solução B foi preparada com 2,0 mL de ácido acético e 998,0 mL de álcool metílico. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹, o comprimento de onda utilizado foi de 280 nm e o volume injetado de amostra de 40 µL. O tempo de corrida de cada amostra foi de 15 minutos.

Estas condições foram utilizadas para as análises de pré-concentração para o VE no MIP, NIP, cartucho Strata™ - X. E para amostras de água de rio e plasma sanguíneo.

3.5.2.3 HPLC UTILIZADO PARA ANÁLISES DE α-ESTRADIOL E ETINILESTRADIOL

As medidas cromatográficas para esse acompanhamento foram feitas, também no laboratório coordenado pela professora Raquel, em cromatógrafo líquido da HPLC – DAD Shimadzu® modelo LC – 20AT, acoplado a um microcomputador pessoal.

A fase estacionária foi uma coluna Phenomenex Luna® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) à temperatura de análise de 40 °C.

A fase móvel consistiu de 30% de solução A e 70% de solução B. Onde a solução A foi água deionizada, e a solução B foi preparada com 2,0 mL de ácido acético e 998,0 mL de álcool metílico. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹, o comprimento de onda utilizado foi de 280 nm e o volume injetado de amostra de 40 µL. O tempo de corrida de cada amostra foi de 15 minutos.

3.5.2.4 HPLC UTILIZADO PARA SELETIVIDADE DO POLÍMERO COM OS CORANTES

As medidas cromatográficas foram feitas em cromatografo líquido sob responsabilidade da Profa. Dra. Valnice Boldrin, da marca Shimadzu® com DAD, usando uma coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6mm; 5µm) à temperatura de análise de 40 °C, fase móvel contendo 20% água com 0,1% de ácido fórmico e 80% metanol, em vazão de 0,6 mL min⁻¹, durante um tempo de corrida de 6 minutos e nos comprimentos de onda de 273 e 549 nm para o corante cloridrato de pararosanilina, 280 e 552 nm para o corante verde de metila. Tendo sido escolhidos estes comprimentos de onda, porque os corantes apresentaram maior absorbância assim como maior intensidade de pico e resolução.

3.6 ESTUDO DE SELETIVIDADE

Para avaliação da seletividade do MIP, substâncias com estruturas análogas ao VE, como α-estradiol e etinilestradiol foram testadas, assim como dois corantes que possuem estruturas bem diferentes do VE, cloridrato de pararosanilina e verde de metila.

Colocou-se então 150 mg de MIP limpo em cartucho SPE. Para tal avaliação, preparou-se 100,0 mL de solução padrão α-estradiol em água deionizada (2 mg L⁻¹) que foram pré-concentradas à vazão de 4,0 mL min⁻¹, e posteriormente eluídas com 10,0 mL de etanol a 1,0 mL min⁻¹, tanto a solução obtida da pré-concentração quanto a obtida pela eluição foram analisadas em HPLC (descrito no tópico 3.5.2.3). Este mesmo procedimento foi realizado para o etinilestradiol.

Para análise dos corantes, colocou-se então 150 mg de MIP limpo em cartucho SPE. Para avaliar a seletividade do polímero, preparou-se 100,0 mL de solução de cloridrato de pararosanilina em água deionizada (2 mg L⁻¹) que foram pré-concentradas à vazão de 4,0 mL min⁻¹, e posteriormente eluídas com 10,0 mL da mistura álcool metílico/ácido acético (9:1 v/v) a 1,0 mL min⁻¹. Tanto a solução obtida da pré-concentração quanto a obtida pela eluição foram analisadas em HPLC (descrito no tópico 3.5.2.4). O mesmo procedimento foi realizado para o corante verde de metila.

3.7 ANÁLISE DE AMOSTRA ENRIQUECIDA

Nesta etapa do trabalho, analisou-se a recuperação do MIP empregando água do rio Jacaré-Guaçu e plasma sanguíneo feminino, ambos enriquecidos com VE.

Para preparação da solução de água de rio, primeiramente esta foi devidamente filtrada à vácuo (Figura 16), e depois enriquecida com VE em concentração de 2 mg L^{-1} . Em um cartucho SPE contendo o MIP limpo (MISPE), passou-se tal solução a fim de obter-se uma pré-concentração com vazão de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$. Após esse procedimento, realizou-se a eluição com $10,0 \text{ mL}$ de álcool etílico à vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Tanto a solução obtida da pré-concentração quanto a obtida pela eluição foram analisadas em HPLC (descrito no tópico 3.5.2.2).



Figura 16: Esquema de filtração à vácuo da água do rio Jacaré-Guaçu.

Para o preparo da solução de plasma sanguíneo enriquecida com VE, em um balão volumétrico de capacidade de $10,0 \text{ mL}$ adicionou-se $0,5 \text{ mL}$ de plasma sanguíneo, $25 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de 800 mg L^{-1} de VE, com a finalidade de obter-se uma concentração final de 2 mg L^{-1} . Água deionizada foi adicionada até completar

o menisco. Essa solução foi “passada” em um cartucho MISPE e em seguida 10,0 mL de álcool etílico foi adicionado ao cartucho. Essas duas soluções obtidas foram analisadas em HPLC (descrito no tópico 3.5.2.2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DO MIP E NIP

Após a polimerização da mistura reacional, do MIP e NIP, obteve-se um polímero branco, com aparência de um giz, como pode ser observado na Figura 17.

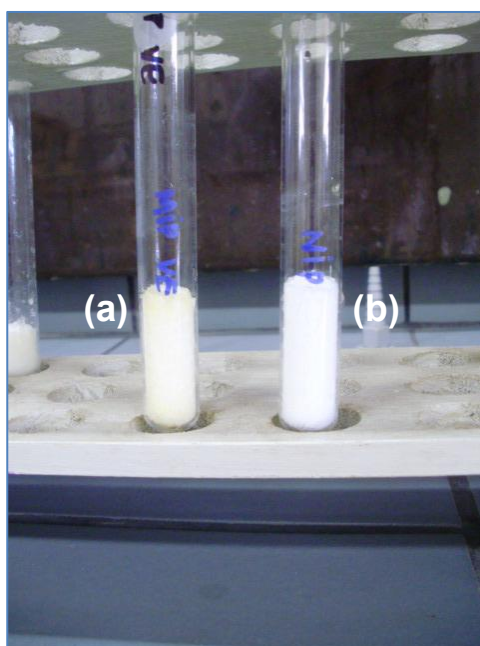


Figura 17: Polimerização da mistura reacional para o MIP (a); e para o NIP (b).

4.2 REMOÇÃO DA MOLÉCULA MOLDE DO MIP

Segundo a literatura, para remoção total da molécula molde seriam necessárias de 5 a 6 lavagens do polímero (RACHKOV, 2000). Para isso analisaram-se tais águas de lavagens em Espectrofotômetro UV-Vis e em HPLC. E os resultados obtidos são descritos a seguir nos próximos itens.

4.2.1 RESULTADOS OBTIDOS USANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Primeiramente foram preparadas diversas soluções de concentrações conhecidas de VE em etanol ($2,2 \times 10^{-5}$; $4,5 \times 10^{-5}$; $9,0 \times 10^{-5}$; $3,6 \times 10^{-4}$ e $7,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) com a finalidade de obter-se uma curva analítica (Figura 18b).

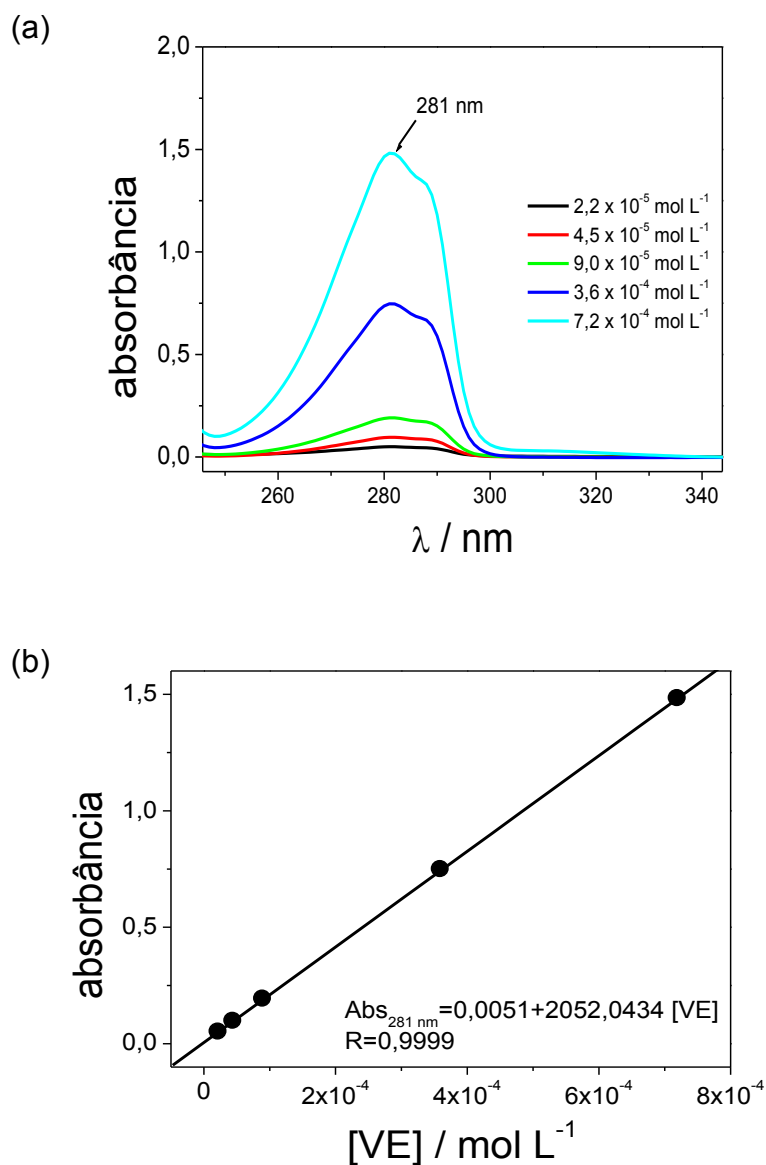


Figura 18: Medidas realizadas em espectrofotômetro UV-Vis. (a) Espectro dos padrões preparados para o VE; (b) Curva analítica dos padrões de VE.

4.2.2 RESULTADOS OBTIDOS USANDO HPLC

Foram preparadas diversas soluções de concentrações conhecidas de VE em etanol ($4,5 \times 10^{-5}$; $9,0 \times 10^{-5}$; $1,8 \times 10^{-4}$; $3,6 \times 10^{-4}$ e $7,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) com a finalidade de obter-se uma curva analítica (Figura 19). Tais medidas foram analisadas utilizando o equipamento e as condições descritas no tópico 3.5.2.1.

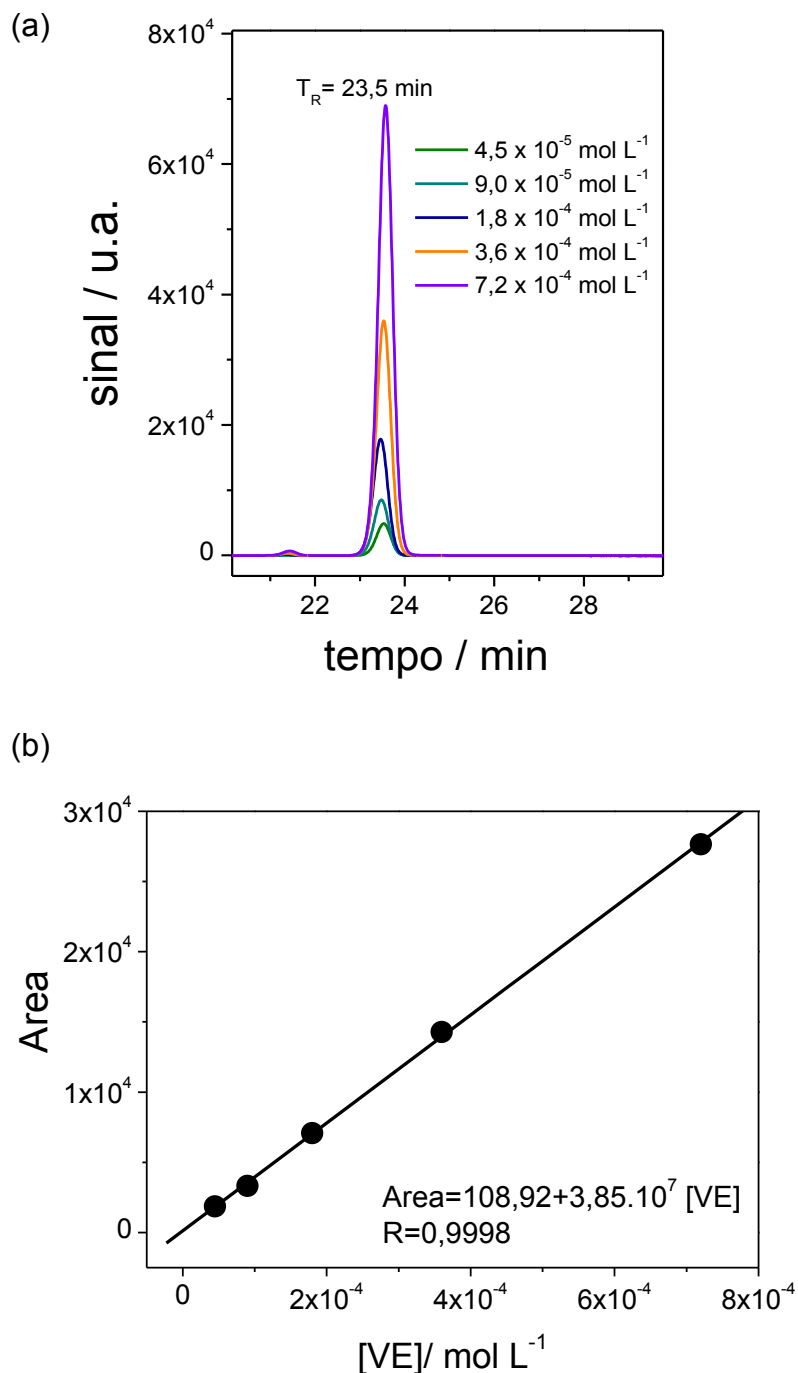


Figura 19: (a) Cromatograma dos padrões do VE, onde o TR = 23,5 min; (b) Curva analítica dos padrões de VE.

Ambos os polímeros, MIP e NIP, foram lavados pelo sistema soxhlet. Na Figura 20 pode-se notar a presença do pico de VE na lavagem do MIP e a ausência deste na lavagem do NIP.

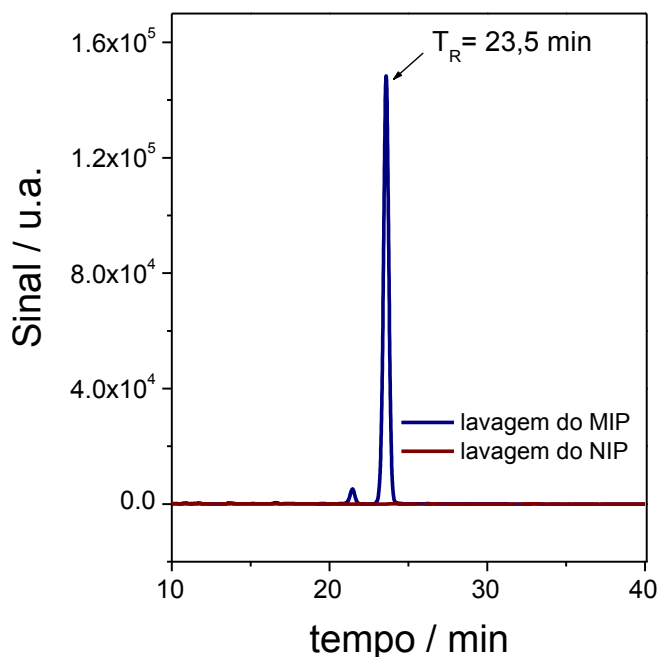


Figura 20: Cromatograma da primeira lavagem do MIP e do NIP, onde o $T_R = 23,5$ min.

Foram feitas seis lavagens, de 24 h cada uma, do MIP para remoção do *template*, mas como se pode observar na Figura 21, seriam necessárias apenas 4 lavagens para remover com eficiência e segurança o VE do MIP. Também devido aos resultados obtidos, pode ser usada a espectrofotometria UV/Vis para esta finalidade, pois é uma técnica mais simples e menos dispendiosa.

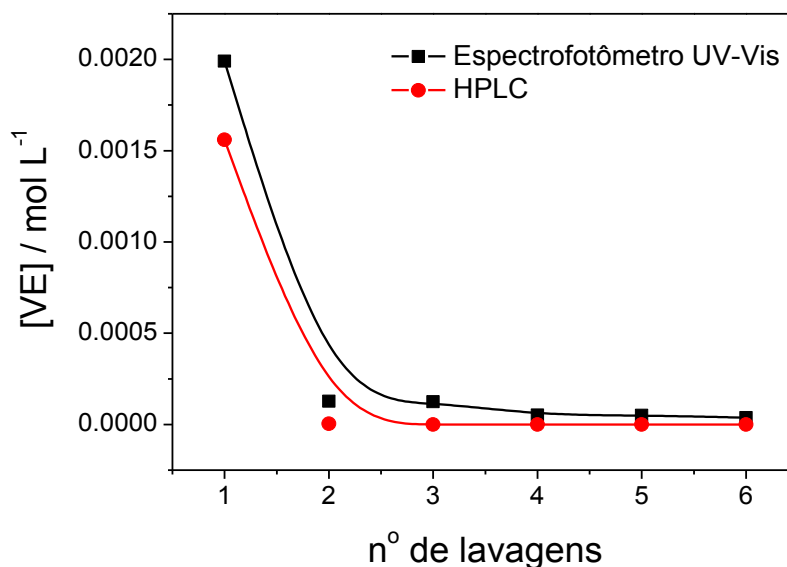


Figura 21: Concentração de VE em função do número de lavagens, comparação dos dois métodos de análise. Cada lavagem corresponde a um período de 24 h.

4.3 EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Concomitantemente foi realizada a pré-concentração para o MIP e NIP com a finalidade de obter recuperações do analito satisfatórias (descrito no tópico 3.4). Para comparação, realizou-se o mesmo procedimento de pré-concentração para o cartucho comercial amplamente utilizado, Strata™-X. Nesta etapa do trabalho, utilizou-se HPLC e condições previamente otimizadas descritas no tópico 3.5.2.2. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Comparação das porcentagens de recuperação dos materiais adsorventes, MIP, NIP e Strata™-X.

Material adsorvente	% recuperação
MIP	53,0
NIP	80,1
Strata™ - X	53,0

Pode-se observar que o MIP e o cartucho comercial obtiveram a mesma recuperação. A única diferença entre eles é que o MIP é seletivo e o Strata™-X não.

A recuperação do MIP deve ser comparada ao do seu respectivo NIP, para que sua atividade seja designada especificamente às cavidades moleculares impressas no polímero e não somente às interações provenientes do monômero utilizado em sua síntese. Tanto o NIP quanto o MIP possuem as mesmas interações provenientes do monômero utilizado para suas sínteses, ou seja, ambos irão reter o VE quando uma solução desta for passada através dos cartuchos SPE. Na etapa da eluição com a finalidade de pré-concentrar a solução, observou-se que o MIP obteve uma recuperação inferior ao do NIP, o que não era esperado.

Desta forma, foram realizadas simulações computacionais para avaliar a interação do VE com diversos monômeros.

Foram empregados os seguintes programas para tal simulação computacional:

- **HyperChem® 8.0.5:** utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIPs.
- **OpenEye®** (pacote de *softwares*) contendo os programas:
 - *VIDA 3.0.0:* utilizado para visualizar as moléculas modeladas para conferir possíveis erros de ligações entre átomos.
 - *Omega2:* este *software* gera diversos confôrmeros das moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros de cada pesticida, sendo escolhidos 3 ao acaso para realizar os testes simulatórios.
 - *Szybki 1.2.2:* programa que leva a molécula até seu estado de menor energia e, portanto, mais estável.
- **AutoIt 3.3.6.0:** aplicativo que utiliza linhas de comandos (*scripts*) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos.
- **Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital PACkage) 2009:** Será utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde calculando a energia liberada, resultando assim a afinidade entre os mesmos. MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semiempírica para os cálculos de aproximação.

Foram avaliados os 20 monômeros mostrados na Tabela 3, os quais foram nomeados como MP1 a MP20 para fins de simplicidade de análise dos resultados.

Tabela 3: Monômeros comumente utilizados na síntese de MIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais.

Sigla	Monômero
MP1	<i>bis</i> -acrilamida de <i>N,N</i> -metileno
MP2	Ácido imidazol-4-acrílico
MP3	Etil éster de imidazol-4-acrílico
MP4	Ácido acrílico
MP5	Acrilamida
MP6	Acroleína
MP7	Alilamina
MP8	Acrlonitrila
MP9	Etileno glicol dimetacrilato
MP10	2-(cianoetilamino)etilmetacrilato
MP11	Ácido metilenosuccinico
MP12	Ácido metacrílico (MAA)
MP13	3-divinilbenzeno
MP14	4-divinilbenzeno
MP15	Estireno
MP16	1-vinilimidazol
MP17	2-vinilpiridina
MP18	4-vinilpiridina
MP19	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico
MP20	2-hidroxietil metacrilato

A simulação computacional (Figura 22) durou em média uma semana para os 20 monômeros testados. Os valores obtidos podem ser interpretados como a energia liberada na aproximação entre cada monômero e o VE, sendo que quanto maior a energia liberada (mais negativo o valor), maior a afinidade entre eles, e teoricamente mais seletivo será o polímero resultante.

Como se pode observar o MAA (MP12) utilizado na síntese do MIP para VE e utilizado na literatura na qual se baseou a síntese do MIP neste trabalho, não é o monômero mais indicado para a síntese do polímero para VE, o que justificaria a baixa recuperação do MIP na pré-concentração.

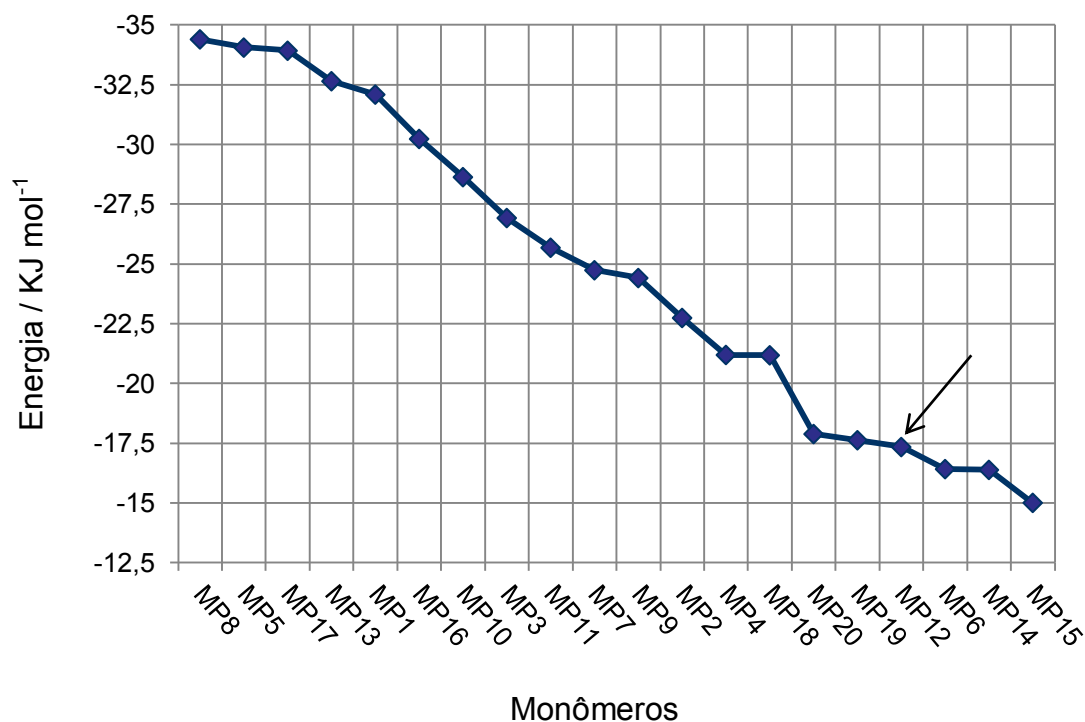


Figura 22: Resultados das simulações realizadas para avaliar a energia da interação do VE com os 20 monômeros propostos.

Observando os resultados obtidos na simulação computacional (Figura 22), nota-se que os monômeros mais adequados para o VE seriam: a acrilonitrila (MP8); a acrilamida (MP5) e a 2-vinilpiridina (MP17) que representam os três monômeros que mostraram maiores energias de aproximação, cujas estruturas são mostradas na Figura 23.

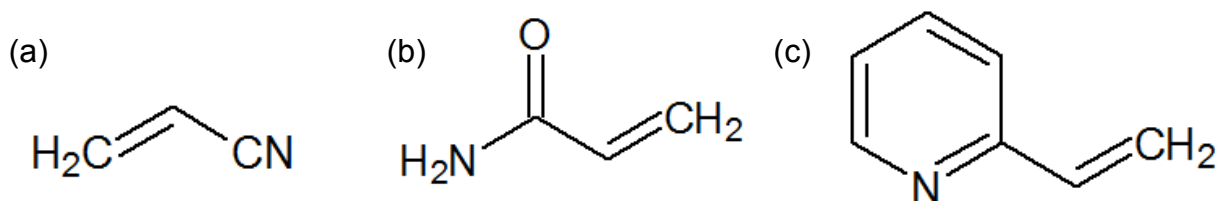


Figura 23: Estrutura molecular dos três monômeros acusados na simulação como os mais indicados para síntese do MIP para VE; (a) MP8; (b) MP5; (c) MP17.

Ao observar a estrutura do VE na Figura 5f, pode-se notar que esse estrogênio possui caráter ácido. Como já dito anteriormente, de acordo com a literatura sobre os MIPs, moléculas molde com caráter ácido possuem afinidade com

monômeros de caráter básico e vice-versa. E é isso que ocorre neste caso para VE. Os melhores monômeros obtidos na simulação computacional possuem caráter básico, como pode-se observar na Figura 23. Desta forma, estudos adicionais deverão ser realizados para sintetizar e avaliar novos MIP para VE usando as moléculas da Figura 23.

4.4 ESTUDO DA SELETIVIDADE

Substâncias com estruturas análogas ao VE, como α -estradiol e etinilestradiol foram testadas para verificação se o MIP é seletivo para os estradióis, assim como dois corantes que possuem estruturas bem diferentes do VE, cloridrato de pararosanilina e verde de metila, e os resultados obtidos são mostrados a seguir.

4.4.1 SUBSTÂNCIAS COM ESTRUTURA ANÁLOGA AO VE

Realizou-se teste de seletividade para α -estradiol e etinilestradiol, que de acordo com a Figura 5 possuem estruturas muito parecidas com a do VE.

Utilizando as condições e o equipamento descrito no tópico 3.5.2.3, obtiveram-se os cromatogramas correspondentes ao uso do MIP e do NIP para cada estrogênio analisado (Figura 24), os valores de recuperação calculados a partir da área de cada pico estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de recuperação para 2 mg L^{-1} , vazão pré-concentração 4 mL min^{-1} ; vazão de eluição: 1 mL min^{-1} ; pré-concentração de 10x. Usando MIP e NIP para cada molécula.

Composto	% recuperação MIP	% recuperação NIP
VE	53,0	80,1
α -estradiol	91,0	106,0
etinilestradiol	95,0	91,0

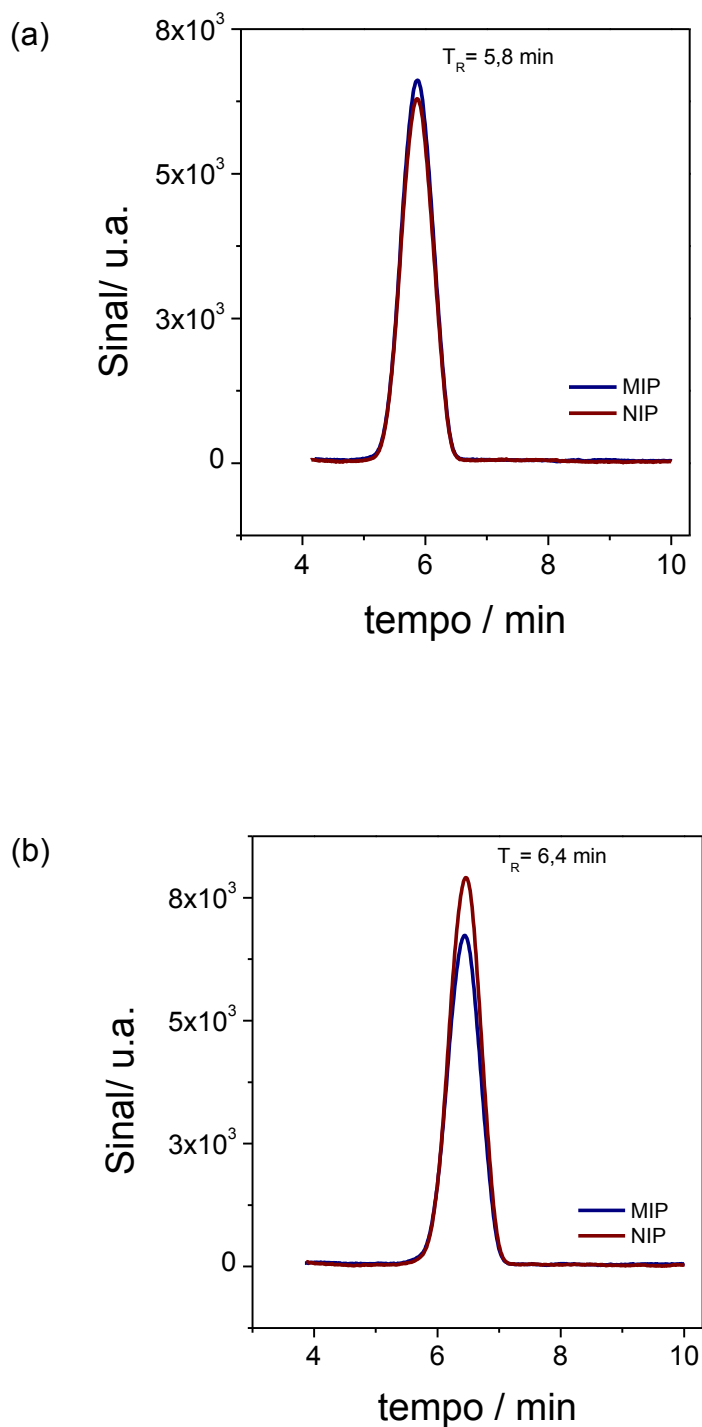


Figura 24: Cromatogramas do estudo de seletividade do MIP e NIP; (a) para o etinilestradiol que possui $T_R = 5,8$ min; (b) para o α -estradiol que possui $T_R = 6,4$ min.

De acordo com os valores contidos na tabela acima (Tabela 4), nota-se que a recuperação de etinilestradiol foi muito satisfatória, levando a crer que o MIP sintetizado inicialmente para o VE utilizando MAA como monômero, na verdade seria o melhor para a síntese de um MIP para o etinilestradiol. Isso pode ser justificado pelo etinilestradiol possuir caráter básico e o monômero utilizado (MAA) ter caráter ácido.

4.4.2. SUBSTÂNCIAS COM ESTRUTURA DIFERENTE AO DO VE

Com a finalidade de estudar a seletividade do MIP para VE, utilizou-se também compostos com estrutura bem diferente ao do estrogênio. Foram escolhidos então dois corantes, verde de metila (VM) e cloridrato de pararosanilina (CP), representados na Figura 25.

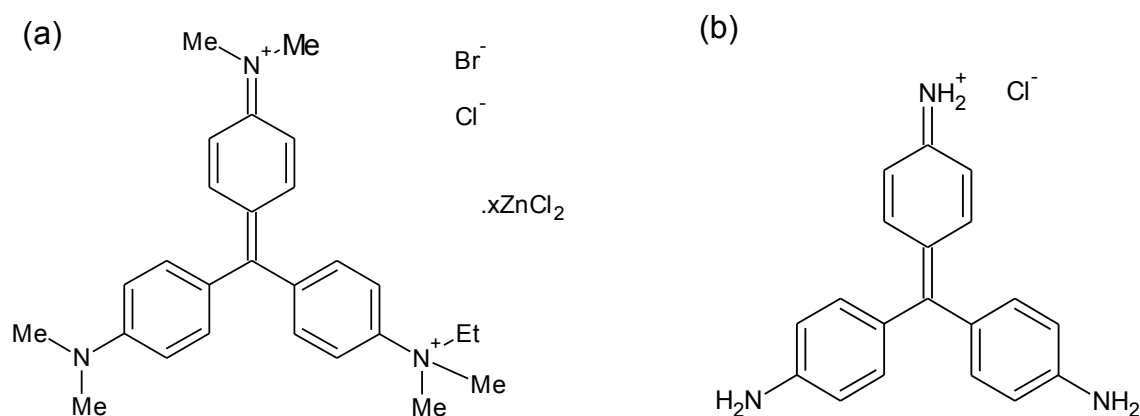


Figura 25: Estrutura molecular dos corantes (a) verde de metila e (b) cloridrato de pararosanilina.

Utilizando as condições e HPLC descrito no tópico 3.5.2.4, obtiveram-se os cromatogramas para os corantes da Figura 26.

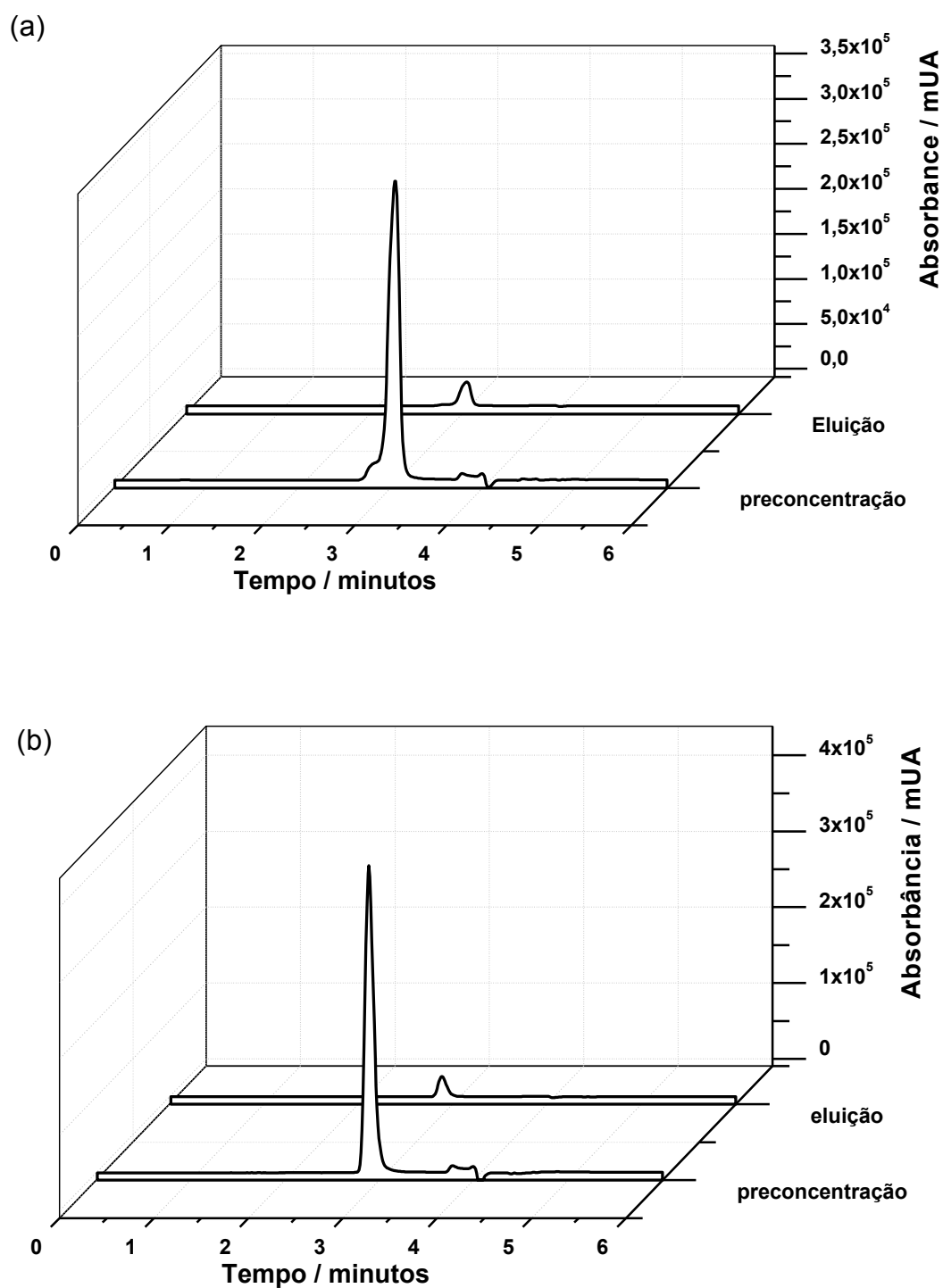


Figura 26: Cromatogramas da solução da solução de passagem da pré-concentração (2 mg L^{-1}) e da eluição com álcool metílico/ácido acético (9:1 v/v) para os corantes (a) verde de metila; (b) cloridrato de pararosanilina.

A partir desses cromatogramas pode-se notar que o MIP quase não reteve os dois corantes na primeira etapa da pré-concentração, o que era esperado, pois o

polímero sintetizado possui as cavidades seletivas para os estradióis e não para os corantes. Nota-se também que valores baixos de recuperação foram obtidos na etapa de eluição, os quais estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de recuperação para 2 mg L^{-1} , vazão pré-concentração 4 mL min^{-1} ; vazão de eluição: 1 mL min^{-1} ; pré-concentração de 10x. Usando MIP para cada corante.

Composto	Eluição (mg L^{-1})	Esperado (mg L^{-1})	% recuperação
VM	0,3	20	1,5
CP	n.d*	20	n.d*

*Fora do limite de detecção

Estes resultados mostraram a alta seletividade do MIP sintetizado para estradióis.

4.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS ENRIQUECIDAS COM VE

Embora o MIP sintetizado neste trabalho não fora o mais eficiente para VE, extrações em amostras enriquecidas de água de rio e plasma sanguíneo foram realizadas afim de verificar se a recuperação de VE nessas amostras é viável. A Tabela 6 traz os valores de recuperação obtidos.

Tabela 6: Valores de recuperação obtidos para VE em diversos tipos de amostras. Vazão pré-concentração 4 mL min^{-1} ; vazão de eluição: 1 mL min^{-1} . Usando MIP sintetizado com MAA.

Composto	Esperado* (mg L^{-1})	Encontrado (mg L^{-1})	% recuperação
rio Jacaré-Guaçu	10,60	10,03	94,6
plasma sanguíneo	1,06	1,20	113,2

*Considerando que em média foi recuperado com este MIP 53% para VE

Nota-se que as recuperações foram satisfatórias e coerentes com o valor esperado para as duas amostras analisadas. O valor elevado da recuperação do plasma pode ser justificado, pois o sangue coletado é de uma mulher que poderia ter tomado algum medicamento contendo estradiol, ou mesmo correspondente ao estradiol natural.

5. CONCLUSÕES

- 5.1. O emprego dos polímeros biomiméticos (MIPs) vêm sendo uma alternativa analítica cada vez mais estudada devido ao seu fácil preparo, baixo custo e por ser muito seletivo.
- 5.2. Inicialmente foi sintetizado neste trabalho um MIP para VE. Entretanto, os resultados obtidos mostraram que o MIP usando o MAA como monômero, foi mais eficiente para o etinilestradiol. Este polímero foi altamente seletivo para moléculas com estruturas análogas à do VE.
- 5.3. Simulações computacionais realizadas para encontrar o melhor monômero na síntese do MIP para o VE sugerem que monômeros de caráter básico (acrilonitrila, acrilamida, 2-vinilpiridina) seriam mais adequados no preparo de MIPs eficientes para VE.
- 5.4. A aplicação do MIP em amostras reais, mostrou-se satisfatória na recuperação do VE, considerando uma recuperação média de 53% para VE.
- 5.5. Assim, este trabalho mostrou a viabilidade e eficiência de MIPs como materiais adsorventes alternativos àqueles comercialmente existentes e tradicionalmente empregados em sistemas de extração em fase sólida (SPE).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- 6.1. Sintetizar MIPs para VE, utilizando os resultados obtidos na simulação computacional.
- 6.2. Investigar a eficiência de cada MIP a ser sintetizado e comparar com os resultados obtidos com cada NIP e com cartuchos comerciais.
- 6.3. Aplicar em amostras de caráter farmacêutico, clínico e ambiental, para estudar a viabilidade da utilização desses polímeros, na extração de VE nesse tipo de amostras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KINDY, S.; BADÍA, R.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, J.L.; DÍAZ-GARCÍA, M.H.; Molecularly Imprinted Polymers and Optical Sensing Applications. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 291-309, 2000.

ARSHADY, R.; MOSBACH, M.; Synthesis of substrateselective polymers by host-guest polymerization, **Macromolecular Chemistry and Physics**, v.182, p. 687-692, 1981.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M.; Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v.26, p.523-530, 2003.

BRAGA, B. *et al.*; Introdução à Engenharia Ambiental, 1 ed., São Paulo: Prentice Hall, 2002.

CARBALLA, M. *et al.*; Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in sewage treatment plants. **Water Research**, v. 38, p. 2918-2926, 2004.

COMBALBERT,S.; HERNANDEZ-RAQUET,G.; Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p. 1671-1692, 2010.

CORMACK. P.A.G.; ELORZA, A.Z.; Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 804, p. 173-182, 2004.

DINÇ, E. *et al.*; Simultaneous spectrophotometric determination of cyproterone acetate and estradiol valerate in pharmaceutical preparations by ratio spectra derivative and chemometric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 539-547, 2003.

DUAN, J.P. *et al.*; Adsorptive and electrochemical behaviors of estradiol valerate at a mercury electrode. **The Analyst**, v. 124, p. 1651-1655, 1999.

FARMACOPÉIA INGLESA – Martindale (The Extra Pharmacopoeia), London, ed. 29, 1989.

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

GAMA, M.R.; Degradação de hormônios por processos Fenton mediados por ciclodextrina. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara-SP, 142f., 2010.

GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Tese de doutorado, Universidade de Campinas, Campinas-SP, folhas, 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W.F.; Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v.30, p. 695-706, 2007.

GOETTLICH, P.; What are Endocrine Disruptors? in *Fundamentals of Naturopathic Endocrinology*. Dr Friedman Michael Edit. CCNM Press 2005. Ver.8aug(2006). Disponível em : [HTTP://www.mindfully.org/Pesticide/EDs=PWG-16jun01.htm](http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs=PWG-16jun01.htm)

GRASSI, V. Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo, 2008, 179f. Tese de Doutorado – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 179f., 2008.

HAUPT, K.; MOSBACH, K.; Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing. **Biochemical Society Transactions**, v. 27, p. 344-370, 1999.

HOVERSTAD, T. *et al.* Influence of Oral Intake of Seven Different Antibiotics on Faecal Short-Chain Fatty Acid Excretion in Healthy Subjects . **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.21, n.8, p.997-1003, 1986.

JORGENSEN, S.E.; HALLING-SORENSEN, B.; Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, p. 691-699, 2000.

KHAN, S.; GAU, D.W. – Climacteric Symptoms in Healthy Middle-Aged Women. **British Journal of Clinical Practice** v.48 p. 240-2, 1994.

KUMMERER, K. Drugs, diagnostic agents and disinfectants in waste water and water. **Chemosphere**, v.45, p.957-969, 2001.

LEANDRO, F.Z.; Bisfenol A: Validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara-SP, 94f., 2006.

MAZELLIER, P.; MÉITÉ, L.; DE LAAT, J. Photodegradation of steroid hormones 17 beta-estradiol (E2) and 17 alpha-ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. **Chemosphere**, v. 73, n.8, p. 1216-1223, 2008.

MCKEON, D.M.; CALABRESE, J.P.; BISSONNETTE, G.K.; Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. **Water Research**, v. 29, p. 1902-1908, 1995.

MENDEZ, Andreas S. L.; DECONTO, Lislaine; GARCIA, Cássia V.. UV derivative spectrophotometric method for determination of estradiol valerate in tablets. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, 2010.

MIERZA, J.C.; AQUINO, S.F.; Contaminantes orgânicos presentes em microquantidades em mananciais de água por abastecimento público (WWW.finep.gov.br/prosab/livros/prosab5_tema5%201.pdt – acessado em 03/11/2011)

MIRANDA, C.D.; CASTILLO,G.; Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **The Science of the total environment**, v. 224, p. 167-176, 1998.

MULROY,A. When the Cure Is the Problem. **Water Environment & Technology**, v. 13, n. 2, p. 32-36, 2001.

OTOMO, J.I.; Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo – SP. 178f, 2010.

PILETSKY, S.A.; ALCOCK, S.; TURNER, A.P.F. Molecular imprinting: at the edge of the trird millennium. **Trends in Biotechnology**, v.19, p.9, 2001.

PROSAB; Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. ed. ABES, Belo Horizonte –MG; 2009.

QIAO, F.X.; SUN,H.W.; YAN,H.Y.; ROW,K.H. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. **Chromatographia**, v. 64, p. 625-634, 2006.

RACHKOV, A. *et al.* Fluorescence detection of β -estradiol using a molecularly imprinted polymer. **Analytica Chimica**, v.405, p. 23-29, 2000.

SCARE, R.F.; Escassez de água e mudança institucional: análise da regulação dos recursos hídricos no Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo – Faculdade de economia, administração e contabilidade, São Paulo-SP. 135 f., 2003.

SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M.A.F.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F.; Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais (Caderno temático Vol. 06). Universidade Estadual de Campinas, Campinas –SP, 2007.

SPRITZER, PM; REIS, FM. Reposição hormonal no climatério: princípios terapêuticos embasados em evidências. **Reprod. Clim.**, v. 13, p. 32-41, 1998.

STUMPF, M. *et al.* Polar drugs residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v.225, n.1-2, p.135-141, 1999.

SUMPTER, J.P. Xenoendocrine disrupters — environmental impacts. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p.337-342, 1998.

TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.D.P.; KUBOTA, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.6, 2005a.

TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.D.P.; KUBOTA, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.6, 2005b.

UNESCO / IHP Regional Office of Latin America and the Caribbean, 2002 – cadernosaguas. Disponível em: wwf.org.br. Acesso em 20/11/2011).

WHITCOMBE, M.J.; RODRIGUEZ, M.E.; VILLAR, P.; VULFSON, E.N. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting – syntheses and characterization of polymeric receptors for cholesterol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 7105-7111, 1995.

WULFF, G.; SARHAN, A. Über die Anwendung Von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung, **Angewandte Chemie**, v.84, p. 364, 1972.

