

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Síntese de materiais molecularmente impressos para
adsorção seletiva de gentamicina**

Munique Rodrigues Pereira

Porto Alegre
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MUNIQUE RODRIGUES PEREIRA

**Síntese de materiais molecularmente impressos para adsorção
seletiva de gentamicina**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos
Orientador

Porto Alegre, outubro de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Henrique Zimnoch dos Santos, o qual tenho uma profunda admiração profissional, pela orientação e confiança depositadas em mim nesse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização deste trabalho, bem como a CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro, sem a qual inviabilizaria a realização deste projeto. E ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelo experimento na linha de SAXS.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Catálise e Polímeros: Cristiane dos Santos, Sílvia Rosane, Matheus Cichero, Alan Silva e Cesar Heck, pelo companheirismo e convivência, mesmo que nesse pouco tempo, me proporcionaram boas conversas e tornaram a construção dessa dissertação muito mais prazerosa.

Aos meus pais, Mônica e Dalton, por terem me orientado na vida, projeto que sem dúvidas é o mais difícil, que é ser uma pessoa com caráter e com princípios e por terem dedicado a vida deles a criar eu e meus irmãos da melhor maneira possível. Sem dúvida a conclusão dessa etapa foi uma vitória não apenas minha, mas deles também, que sempre me incentivaram a seguir nos estudos. Dessa forma, agradeço também aos meus irmãos, Dalton Jr e Cecília, que são minha base, e seguem estampados na pele, além do coração, dividir com vocês todos esses momentos é um privilégio.

Há pessoas que não estiveram ativamente presentes durante a produção dessa dissertação, mas que são essenciais na minha vida e que merecem aqui serem homenageadas: Jamile, Lucas, Sheyla, Caroliny, Stella, Gabriela, Gabriel, Chun, Michelle e Renato. Esses tornam minha caminhada mais feliz e segura, e no fim acabaram contribuindo muito pra que esse período tenha sido mais fácil, só tenho a agradecer a amizade de vocês.

Por fim, agradeço a todos que estiveram envolvidos de uma maneira ou de outra, nessa dissertação. Meu muito obrigada.

RESUMO

Neste trabalho foram preparados dois materiais distintos, um pelo método sol-gel e o outro a partir de polimerização por precipitação, sendo assim, uma matriz inorgânica e outra orgânica. Esses materiais foram preparados de acordo com a tecnologia da impressão molecular. Para a preparação de ambos os materiais foi utilizado gentamicina como molécula molde. Para o material sol-gel, optou-se pela rota catalítica ácida, utilizando-se TEOS como fonte de sílica. A síntese do polímero, por sua vez, foi realizada empregando ácido metacrílico (MAA) como monômero funcional, trimetilolpropano trimetacrilato (TMPTMA) como agente reticulante, como iniciador radicalar 1,1'-azobis e acetonitrila como solvente. Após o preparo dos materiais, e extração da molécula molde, foram feitas análises de caracterização por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por raios X (XPS), Área Específica e Porosidade (BET), Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal. Posteriormente foram realizados teste de adsorção a fim de investigar o desempenho dos materiais frente à molécula de gentamicina.

Os materiais molecularmente impressos apresentaram área específica de $671 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ e $86 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ para o sol-gel e para o polímero, respectivamente. Ambos materiais apresentaram estruturas correspondentes a fractais de superfície, com valores de P superiores a 3 e inferiores a 4, ou seja, materiais mais densos e menos rugosos. O material sol-gel ainda apresentou quantidade de adsorção igual a $77,38 \text{ mg g}^{-1}$ de gentamicina, resultado três vezes superior ao resultado observado para o polímero, de $24,94 \text{ mg g}^{-1}$. Quanto à seletividade, o material SG-MIP obteve resultados superiores quando comparado com o material P-MIP.

ABSTRACT

In this work two different materials were prepared, one by the sol-gel method and the other from precipitation polymerization, thus being an inorganic and an organic matrix. These materials were prepared according to molecular printing technology. For the preparation of both materials, gentamicin was used as a template molecule. For sol-gel material, the acid catalytic route was chosen, using TEOS as the silica source. The synthesis of the polymer, in turn, was performed using methacrylic acid (MAA) as a functional monomer, trimethylolpropane trimethacrylate (TMPTMA) as crosslinking agent, as 1,1'-azobis radical initiator and acetonitrile as solvent. After preparation of the materials and extraction of the template molecule, Fourier Transform Infrared Characterization (FT-IR), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Surface Area and Porosity (BET), Small-angle X-ray Scattering (SAXS), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy analyzes were performed. Subsequently, adsorption tests were performed to investigate the performance of the materials against the gentamicin molecule.

Molecularly printed materials had a specific area of $671 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ and $86 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ for sol-gel and polymer, respectively. Both materials presented structures corresponding to surface fractals, with P values greater than 3 and less than 4, that is, denser and less rough materials. The sol-gel material still showed adsorption amount equal to 77.38 mg g^{-1} gentamicin, a result three times higher than the observed result for the polymer, 24.94 mg g^{-1} . As for selectivity, SG-MIP material had superior results when compared to P-MIP material.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS – MIP	17
2.1.1. <i>Processos de síntese do polímero impresso</i>	20
2.2. ESCOLHA DO ANALITO ALVO	24
2.3.1. <i>Antibióticos no meio ambiente: causas e danos</i>	24
2.3.2. <i>Gentamicina</i>	28
2.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	29
3. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVOS GERAIS	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1. REAGENTES E SOLVENTES	35
4.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS ORGÂNICO E INORGÂNICO IMPRESSOS MOLECULARMENTE PARA EXTRAÇÃO DE GENTAMICINA	35
4.2.1. <i>Preparação do polímero orgânico</i>	36
4.2.2. <i>Preparação do material inorgânico</i>	37
4.2.3. <i>Caracterização dos MIPs</i>	37
4.2.3.1. <i>Análise estrutural</i>	38
4.2.3.1.1... <i>Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR</i>	38
4.2.3.1.2. <i>Espectroscopia de reflectância total atenuada – ATR</i>	38
4.2.3.1.3. <i>Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X – XPS</i>	38
4.2.3.2. <i>Análise Textural e Morfológica</i>	39

4.2.3.2.1. Área Específica e Porosidade.....	39
4.2.3.2.2. Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos – SAXS	39
4.2.3.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	42
4.2.3.2.4. Microscopia Confocal.....	42
4.3. ESTUDOS DE ADSORÇÃO.....	42
4.3.1. Estudo Cinético de Adsorção	43
4.3.2. Isotermas de Adsorção.....	44
4.3.3. Estudos Comparativo de Fármacos	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. DESEMPENHO DOS MATERIAIS SINTETIZADOS.....	48
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MIPS.....	50
5.2.1. Análise Estrutural	50
5.2.2. Análise Textural e Morfológica	55
5.3. ESTUDO DE ADSORÇÃO	63
5.3.1. Estudo comparativo de fármacos	68
6. CONCLUSÃO	70
7. ANEXO.....	72
Reação colorimétrica aminoglicosídeo e ninhidrina.....	72
<u>Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X – XPS.....</u>	74
8. REFERÊNCIAS.....	76

Índice de Figuras

Figura 1. Imagens de (a)SG-NIP (b)SG-Gen (c)SG-MIP (d)P-NIP (e)P-Gen (f)P-MIP.....	48
Figura 2. Espectro de FTIR do sulfato de gentamicina. Pastilha em KBr. Resolução 4 cm ⁻¹	50
Figura 3. Espectro de FTIR para todos os materiais sintetizados com matriz inorgânica. (a) SG-NIP e (b) acima SG-Gen e abaixo SG-MIP.	52
Figura 4 – Espectro de FT-IR para todos os materiais sintetizados com matriz orgânica. (a) P-NIP e (b) P-Gen (vermelho) e P-MIP (azul).	52
Figura 5. Espectro de ATR para SG-GEN e SG-MIP.	54
Figura 6. Espectros de ATR para P-GEN e P-MIP.	54
Figura 7. (a) e (b) representam os gráficos das isotermas de adsorção-desorção de N ₂ para SG-MIP e P-MIP, respectivamente. No inset de cada uma das figuras estão contidos os gráficos de distribuição de tamanho de poro por modelo BJH.....	56
Figura 8. Curvas de SAXS dos materiais adsorventes, onde o símbolo (círculo) representa as intensidades originais de cada amostra, já as linhas sólidas representam a intensidade obtida através do modelo unificado: azul para os materiais NIP e vermelho para os materiais molecularmente impressos (MIP). (a) SG (b) P.	58
Figura 9. Estrutura das partículas segundo o valor de P. (adaptado de [65])...	60
Figura 10. Microscopia MEV do material (a) SG-NIP e (b) SG-MIP.	61
Figura 12. Imagens obtidas através da microscopia confocal de varredura à laser. (a) SG-NIP (b)SG-Gen (c) SG-MIP (d) P-NIP (e) P-Gen (f) P-MIP.....	62
Figura 13. Gráficos dos modelos de PPO e PSO obtidos do estudo cinético dos MIPS sintetizados. (A) SG-NIP, (B) SG-MIP, (C) P-NIP e (D) P-MIP.....	64
Figura 14. Gráfico dos modelos de Langmuir, Freundlich e BET modificado para SG-MIP em (A), (B) e (C) e para P-MIP em (D), (E) e (F), respectivamente.	66
Figura 15. Gráfico do estudo de seletividade de adsorção dos MIPS em relação à gentamicina e seus análogos. Onde TOB = tobramicina; AMI = amicacina e GEN = gentamicina.	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Siglas empregadas para os materiais sintetizados pelas duas rotas.	36
Tabela 2. Dados obtidos do estudo de adsorção para os materiais adsorventes. $C_0 = 107,6 \text{ mg.L}^{-1}$	49
Tabela 3. Principais picos de FT-IR do sulfato de gentamicina.[53]	51
Tabela 4. Deslocamento das principais bandas presentes na gentamicina e os possíveis deslocamentos ($> 4 \text{ cm}^{-1}$) nos materiais SG-Gen e P-Gen.	53
Tabela 5. Energia de ligação, valores de FWHM, e a razão entre as áreas de pico N/S para a gentamicina, SG-Gen e P-Gen.	55
Tabela 6. Caracterização textural dos MIPs a partir das isotermas adsorção/dessorção de N_2	57
Tabela 7. Resultado dos raios de giro (R_{g1} e R_{g2}), raios de partícula (R_{p1} e R_{p2}) e os expoentes da lei de potência para o segundo e terceiro níveis.	59
Tabela 8. Parâmetros estimados de primeira ordem.	65
Tabela 9. Parâmetros estimados de segunda ordem.	65
Tabela 10. Parâmetros estimados para a isoterma de Langmuir.	67
Tabela 11. Parâmetros estimados para a isoterma de Freundlich.	67
Tabela 12. Parâmetros estimados para a isoterma de BET Modificado.	67
Tabela 13. Capacidade de adsorção (qe) dos materiais P-MIP e SG-MIP para cada um dos três fármacos avaliados no estudo de seletividade.	69

Índice de Esquemas

Esquema 1. Número de publicações entre os anos de 1994 até 2019 para <i>Molecular Imprinted AND Molecular Imprinted Solid-phase Extraction</i> . (<i>Web of Science</i> , busca realizada em agosto de 2019).....	15
Esquema 2. Princípio da impressão molecular baseada na automontagem de monômeros funcionais e uma molécula molde (1), polimerização (2) e (3) remoção da molécula molde que fornece cavidades vazias. [16]	18
Esquema 3. Estrutura dos monômeros mais comumente usados na síntese de materiais molecularmente impressos.	19
Esquema 4. Descrição esquemática dos estágios de polimerização por precipitação para formação de grânulos de MIPs porosos. (adaptado de [23]).....	21
Esquema 5. Mecanismos gerais de hidrólise e condensação de precursores de alcoxi-silano para formar sílica em (a) condições catalisadas por ácido e (b) condições catalisadas por base. A condensação pode produzir água ou álcool como subproduto.....	23
Esquema 6. Desenvolvimento da resistência dos antibióticos ao longo dos anos (adaptado de [31])	26
Esquema 7. Fluxograma com as possíveis rotas dos fármacos e seus resíduos no ambiente (adaptado de [33]).	27
Esquema 8. Estrutura do sulfato de gentamicina	29
Esquema 9. Linha do tempo da incorporação dos MIPs às técnicas de microextração. (adaptado de [9]).....	32
Esquema 10. Estruturas dos fármacos utilizados para o teste de seletividade.	68
Esquema 11. Estrutura da ninhidrina a esquerda e do roxo de Ruhemann a direita.....	72
Esquema 12. Mecanismo de reação da ninhidrina com amina. [69]	73

Esquema 13. Representação esquemática da ninhidrina com quitosana (adaptado de Sabnis <i>et al.</i> [70]).	73
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Abreviaturas

AM	Acrilamida
AMI	Amicacina
ARG	Genes de resistência a antibióticos
ATR	Espectroscopia de reflectância total atenuada
DT50	Dose tóxica mediana
DVB	Divinilbenzeno
D-μ-SPE	Extração em fase microssólida dispersa
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
ETEs	Estações de tratamento de efluentes
FTIR	Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier
GEN	Gentamicina
HEMA	Metacrilato e Hidroxietilo
IF	Fator de Impressão
LOD	Limite de determinação
LPME	Microextração em fase Líquida
MAA	Ácido metacrílico
MBAA	N,N-metilenobisacrilamida
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
MIP	Polímero molecularmente impresso
MISPE	Extração em Fase Sólida com Impressão Molecular
NIP	Material sem impressão molecular
P-GEN	Polímero com gentamicina

P-MIP	Polímero molecularmente impresso
P-NIP	Polímero não impresso
PPO	Pseudo primeira ordem
PSO	Pseudo segunda ordem
SAXS	Espalhamento de Raios X a baixos ângulos
SBSE	Extração sorptiva por barra de agitação
SG-GEN	Sol-gel com gentamicina
SG-MIP	Sol-gel molecularmente impresso
SG-NIP	Sol-gel não impresso
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em Fase sólida
TEOS	Tetraetoxisilano
TFMAA	Ácido trifluorometacrílico
TMOS	Tetrametoxisilano
TOB	Tobramicina
TRIM	Trimetilopropano
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> (Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos)
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

1. INTRODUÇÃO

Cientistas de todo o mundo estão desenvolvendo novas tecnologias e reinventando as existentes na busca interminável de detectar e quantificar níveis cada vez mais baixos de concentração de diferentes analitos em muitas matrizes diferentes e altamente complexas, muitas vezes impulsionados por legislações cada vez mais exigentes.

Especificamente no caso de amostras líquidas, para atingir os baixos limites de detecção (LODs), pode-se atuar no uso de detectores ou instrumentação cada vez mais sensível ou no uso de rotinas de pré-tratamento (clean-up) por exemplo, ou de préconcentração. Um dos métodos de pré-tratamento de amostra mais utilizados vem sendo a extração do analito usando extração em fase sólida (SPE). No entanto, uma limitação latente da SPE típica reside no fato de que diversos analitos, além daqueles de interesse, também podem ser co-extraídos, e a presença de tais compostos dificulta ainda mais a quantificação dos analitos-alvo. Esse efeito é especialmente importante ao se lidar com matrizes altamente complexas.

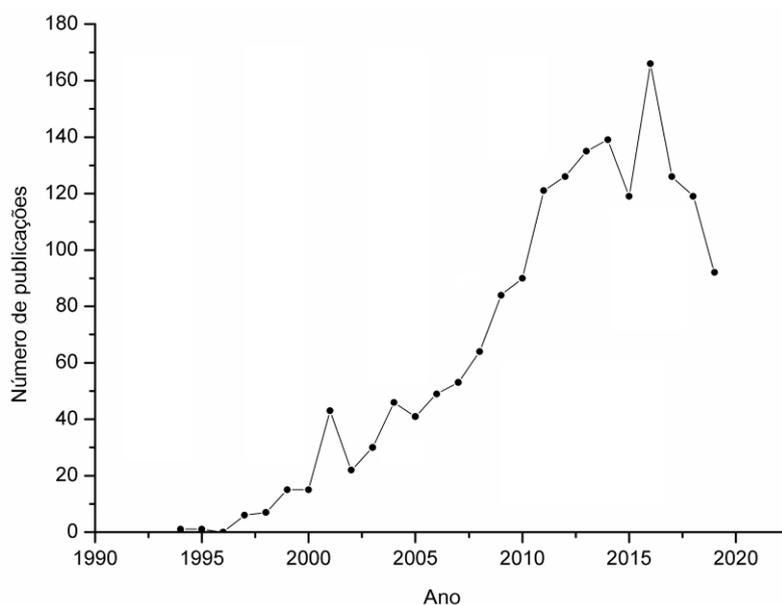
A melhor maneira de superar essa desvantagem é realizando extrações seletivas direcionadas para o composto de interesse. Uma boa maneira de desviar dessas dificuldades é usar polímeros molecularmente impressos (MIPs), que superam as limitações inerentes presentes em outros materiais usados em SPE, mantendo um alto grau de seletividade e a simplicidade do processo de síntese de sorventes poliméricos.

Os MIPs são sorventes especialmente projetados que exibem seletividade aprimorada em relação a uma determinada estrutura (ou a uma estrutura muito relacionada) e, devido às suas propriedades inerentes, os MIPs têm sido amplamente utilizados em diversas aplicações.

Além disso, desde que Sellergren [1] relatou pela primeira vez o uso de MIPs como sorventes especificamente na SPE, sua aplicação nesse campo tornou-se amplamente aceita por causa de sua extração altamente seletiva do analito de interesse. A ampla aceitação de MIPs como sorventes SPE levou essa prática a se tornar conhecida como SPE com impressão molecular

(MISPE). Como consequência dessa ampla aceitação, o número de publicações vinculadas a esse assunto vem aumentando ano a ano (Esquema 1).

No MISPE, a alta seletividade do sorvente em relação a uma determinada estrutura permite que essa estrutura seja retida seletivamente no sorvente enquanto os outros compostos não são retidos, resultando na extração do composto desejado da maioria dos outros compostos presentes na amostra.



Esquema 1. Número de publicações entre os anos de 1994 até 2019 para *Molecular Imprinted AND Molecular Imprinted Solid-phase Extraction*. (Web of Science, busca realizada em agosto de 2019).

A presença de fármacos decorrentes de despejos inadequados no meio ambiente é um exemplo de amostra complexa na qual nos deparamos. A quantificação desse fármaco se torna conveniente muitas vezes, fazendo-se necessária a utilização de materiais como MISPE.

Por fim, o escopo do presente trabalho reside na preparação comparativa de materiais para pré-concentração de gentamicina. Este trabalho está estruturado em cinco capítulos, a saber: revisão bibliográfica, objetivos, parte experimental, resultados e discussão e conclusão. No segundo capítulo, a revisão bibliográfica aborda os conceitos de polímeros molecularmente

impressos, onde aprofundamos os processos de obtenção desses materiais através dos métodos de precipitação e sol-gel, antibióticos no meio ambiente, gentamicina e extração em fase sólida. No capítulo 3 são expostos, os objetivos deste trabalho. No capítulo 4 encontra-se a parte experimental onde constam os materiais e reagentes utilizados, assim como a metodologia aplicada nas sínteses dos MIPs e das técnicas de caracterização empregadas. No capítulo 5, resultados e discussões, são apresentados o desempenho e as propriedades estruturais, morfológicas e texturais dos MIPs. E por último, no capítulo 6 encontram-se as conclusões extraídas do estudo.

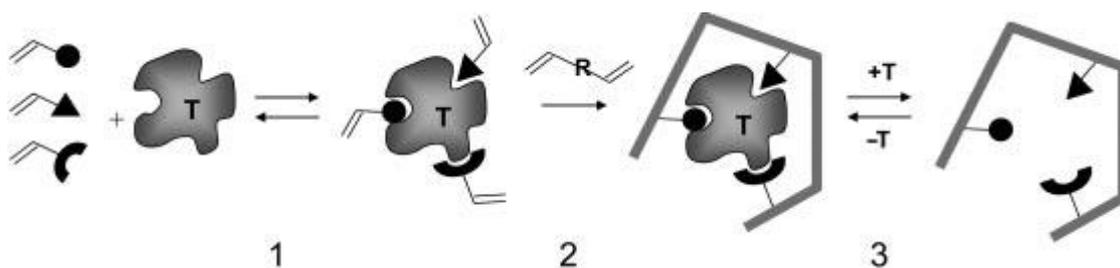
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica abordará polímeros molecularmente impressos, onde aprofundamos os processos de obtenção desses materiais através dos métodos de precipitação e sol-gel, antibióticos no meio ambiente, gentamicina e extração em fase sólida.

2.1. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS – MIP

Polímeros com impressão molecular (MIPs) são materiais porosos funcionais com locais de ligação de alta afinidade que são complementares em tamanho, dimensão e funcionalidade ao analito de interesse. O Esquema 2 apresenta de forma simples e objetiva as etapas envolvidas na obtenção desses materiais [2]. A tecnologia de impressão molecular foi desenvolvida pela primeira vez por Polyakov [3] na década de 1930, posteriormente com Wulff [4] na década de 1970, mas aumentou em popularidade quando Mosbach e colaboradores [5] introduzindo a abordagem de impressão não covalente na década de 1990. A abordagem não covalente permite uma escolha mais flexível de monômeros e facilita a remoção fácil da molécula molde da matriz polimérica. Este último pode ser desafiador, pois a lixiviação de modelos é considerada um problema comum para o uso de MIP, tanto covalentes quanto não-covalentes [6]. Os MIPs são de baixo custo, oferecem fácil produção [7], [8], são termicamente e quimicamente estáveis, não são provenientes de animais, são reutilizáveis e podem ser armazenados em temperatura ambiente por longos períodos. As desvantagens que precisam ser consideradas incluem o tempo necessário para seu desenvolvimento e otimização, que pode ser superado usando triagem avançada ou métodos computacionais e a adaptação dos polímeros para trabalhar em ambientes aquosos, uma vez que a água interfere nas interações não covalentes entre monômero e molécula molde. Os MIPs foram desenvolvidos para íons pequenos (conhecidos como polímeros com íons impressos), variando até grandes macromoléculas, e essa versatilidade significa que eles podem ser empregados para inúmeras

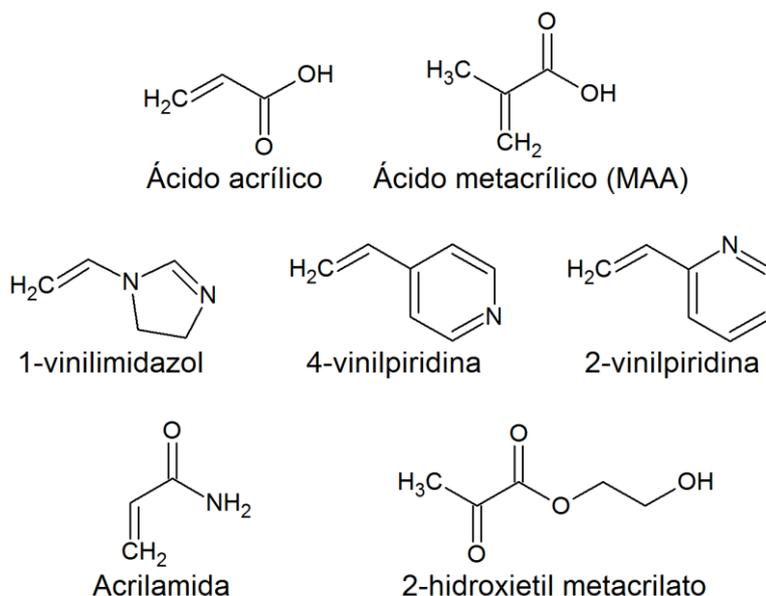
aplicações, incluindo separação em fase sólida [9], purificação [10], catálise [11], sensores [12], administração de medicamentos [13] e aplicações terapêuticas [14]. A principal aplicação comercial reside na remoção ou extração de contaminantes de baixo nível, pois os MIPs são ferramentas poderosas para a extração seletiva de compostos em matrizes complexas [15] (por exemplo, sangue, plasma, urina, amostras de alimentos, amostras ambientais, etc.).



Esquema 2. Princípio da impressão molecular baseada na automontagem de monômeros funcionais e uma molécula molde (1), polimerização (2) e (3) remoção da molécula molde que fornece cavidades vazias. [16]

Na síntese dos MIPS, muitos parâmetros devem ser avaliados, desde a influência morfológica, propriedades e desempenho dos polímeros que serão empregados. Não existe, ainda hoje, uma regra pré-estabelecida de um MIP adequado para todos os tipos de moléculas, o que exige que se façam sempre estudos preliminares do desempenho desses materiais. Na síntese do MIP a escolha do monômero é muito importante, pois está diretamente relacionada à eficiência do material final. Na síntese de MIPS, a escolha das moléculas usadas como molécula molde também é de primordial importância para obter MIPS funcionais eficientes. Uma ampla gama desse tipo de moléculas, como drogas, aminoácidos, carboidratos, proteínas, bases nucleotídicas, hormônios, pesticidas e coenzimas, já foram utilizadas com sucesso.

A escolha do monômero é muito importante para criar cavidades altamente específicas projetadas para a molécula molde. Os monômeros funcionais típicos (Esquema 3) são ácidos carboxílicos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido vinilbenzóico), ácidos sulfônicos (ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfônico), bases heteroaromáticas (vinilpiridina, vinilimidazol).



Esquema 3. Estrutura dos monômeros mais comumente usados na síntese de materiais molecularmente impressos.

Na abordagem não covalente, eles são normalmente usados em excesso em comparação com a molécula molde para favorecer a formação de conjuntos molde-monômero. De fato, a associação entre o monômero e a molécula molde é governada por um equilíbrio, e os monômeros funcionais normalmente precisam ser adicionados em excesso, em relação ao número de moles do modelo para favorecer a formação do complexo, com o molde: monômero funcionais proporções tipicamente de 1: 4. Consequentemente, isso levou a várias configurações diferentes do complexo monômero funcional do molde, que produziu uma distribuição heterogênea do local de ligação no MIP final, com uma gama de constantes de afinidade. O uso extensivo de ácido metacrílico (MAA) é devido à sua capacidade de atuar como doador de prótons e como aceitador de ligação de hidrogênio. Os melhores monômeros para sintetizar materiais impressos são, dessa forma, selecionados considerando a força e a natureza das interações molécula molde-monômero.

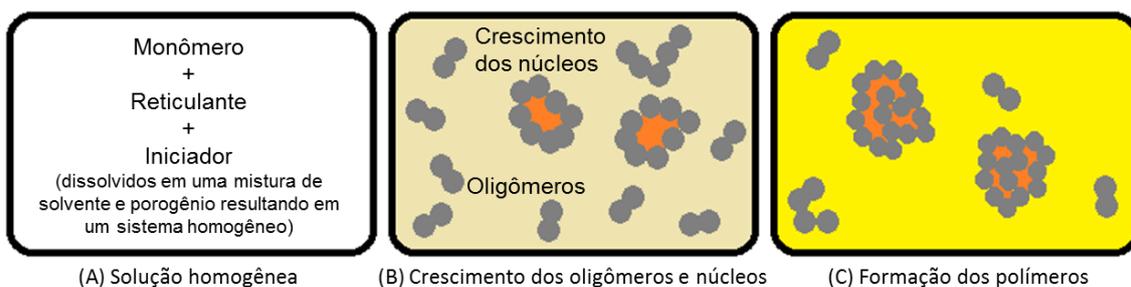
2.1.1. Processos de síntese do polímero impresso

Na literatura existem vários métodos para a síntese de MIPs, porém a seguir são descritos os dois métodos empregados no presente estudo, a saber: polimerização por precipitação e método sol-gel.

2.1.1.1. Polimerização por precipitação

O método de polimerização por precipitação foi desenvolvido por Stover et al. [17] e a aplicação desse método aos MIPs foi proposta pela primeira vez por Ye et al. [18] para a síntese de grânulos de MIPs na faixa submicrométrica. A polimerização por precipitação é um método de preparação de microesferas poliméricas com controle suficiente da morfologia do produto. É um método de polimerização fácil que dá origem a microesferas com superfícies limpas e lisas. [8], [19] É um processo heterogêneo livre de surfactante que começa inicialmente como uma solução homogênea de reticulador e monômero (tipicamente < 5% p v) em uma mistura de solvente e porogênio (etapa A do Esquema 4). [20] As vantagens deste método incluem simplicidade de preparo, ausência do uso de estabilizadores ou outros aditivos, compatibilidade com altos graus de agentes de reticulação e uso de solventes apróticos polares, que são capazes de preservar interações não-covalentes entre modelos e monômero. Estas vantagens tornaram este método de preparação mais comumente empregado para as microesferas de MIP na impressão molecular. [21] A polimerização por precipitação também é aplicada em vários outros campos, como para a preparação de partículas de polímero com estrutura interna funcional, dispositivos eletroforéticos e polímeros inteligentes. [22]

À medida que a polimerização se inicia, oligômeros e núcleos estão sendo formados, os oligômeros ainda são solúveis no meio (solvente), os núcleos precipitam resultando em uma mistura heterogênea. Os núcleos são inchados por porógenos e a fase contínua torna-se menos rica em porogênio. Os núcleos são estabilizados por uma camada de oligômeros (passo B do Esquema 4)



Esquema 4. Descrição esquemática dos estágios de polimerização por precipitação para formação de grânulos de MIPs porosos. (adaptado de [23])

À medida que a polimerização continua os núcleos não se sobrepõem, mas apenas crescem adicionando monômeros e oligômeros frescos da fase contínua.[24] O porogêneo¹ que é inicialmente absorvido pelos núcleos em crescimento, separa-se da partícula e forma os poros (passo C no Esquema 4). Em resumo, durante a polimerização, o polímero em crescimento segrega da solução enquanto captura e consome continuamente monômeros e oligômeros, eventualmente formando contas na faixa micro- ou submicrométrica sob condições adequadas.[25] Partículas esféricas monodispersas próximas podem ser rotineiramente preparadas com bons rendimentos por este método.

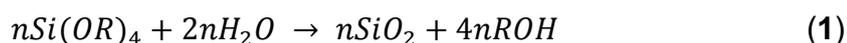
A seleção de precursores apropriados é um passo crucial na síntese de MIPs. Os monômeros funcionais são responsáveis por fornecer funcionalidades que formam um complexo com o molde por interações covalentes ou não covalentes. A força das interações entre o molde e o monômero determina a afinidade e a seletividade dos locais de reconhecimento nos MIPs. Uma interação mais forte resulta em um complexo estável de monômero-monômero que, por sua vez, fornece maior capacidade de ligação nos MIPs. Geralmente, a seleção dos monômeros funcionais é baseada na sua capacidade de formar interações não covalentes com as moléculas molde. Os monômeros funcionais mais comumente utilizados incluem ácido metacrílico (MAA), ácido acrílico (AA), 2- ou 4-vinilpiridina (2-VP ou 4-VP), acrilamida (AM), ácido trifluorometacrílico (TFMAA) e metacrilato de hidroxietilo (HEMA).

¹ Agente formador de poros.

O agente reticulante é um importante precursor de MIPs que exibe pelo menos duas ligações duplas polimerizáveis em sua estrutura. O papel do reticulador é fixar o complexo monômero-molécula molde e, assim, formar uma rede de polímero rígido altamente reticulado. Tipos e quantidades de reticuladores têm profunda influência sobre a seletividade e capacidade de ligação dos MIPs. Os agentes de reticulação vulgarmente utilizados envolvem dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), trimetacrilato de trimetilopropano (TRIM), N,N- metilenobisacrilamida (MBAA) e divinilbenzeno (DVB).

2.1.1.2. Método Sol-Gel

Os métodos sol-gel utilizam geralmente precursores moleculares de alcóxido metálicos para produzir um óxido de metal de acordo com a reação geral (equação (1))



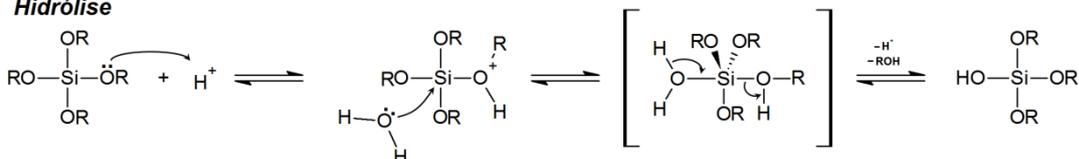
onde R é um grupo alquilo e o metal neste caso é Si. Os precursores formam primeiro uma solução coloidal (sol), depois uma rede integrada (ou gel) de material amorfo. Para sílica, os tetra-alcóxissilanos (tais como tetrametoxissilano, TMOS ou tetraetoxissilano, TEOS) hidrolisam e policondensam-se para formar materiais de sílica altamente reticulados.

As reações ocorrem por catálise ácida em $pH < 2$ ou por catálise básica em $pH > 2$ (Esquema 5). A mudança nítida (*crossover*) em pH igual a 2 marca o ponto isoelétrico da sílica, onde a mobilidade elétrica da sílica é zero e as taxas de reação são extremamente baixas. O processo sol-gel é feito a baixas temperaturas (geralmente entre 0 °C e 100 °C) e em condições químicas moderadas (pH e teor de água são facilmente ajustáveis). Embora a reação sugira que dois equivalentes de água são suficientes para produzir um equivalente de SiO_2 completamente condensado, esse raramente é o caso. Dependendo da porosidade do material final, uma quantidade significativa de $SiOH$ não completamente condensado e, por vezes, espécies $SiOR$ estarão presentes. O grau de condensação pode ser controlado até certo ponto pelo método de síntese usado e tratamentos pós-síntese para expulsar água e

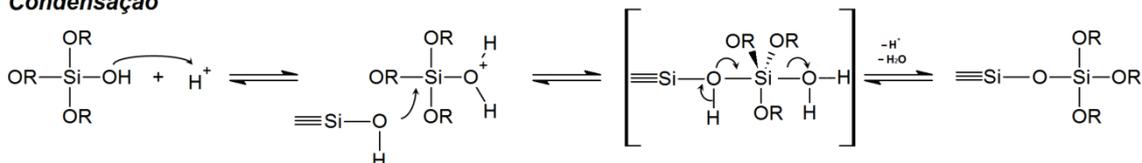
álcool e aumentar a condensação, mas isso não é necessariamente necessário.

a) Catálise ácida - pH < 2

Hidrólise

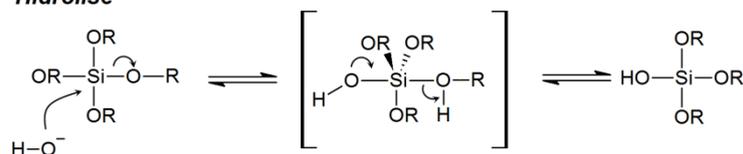


Condensação

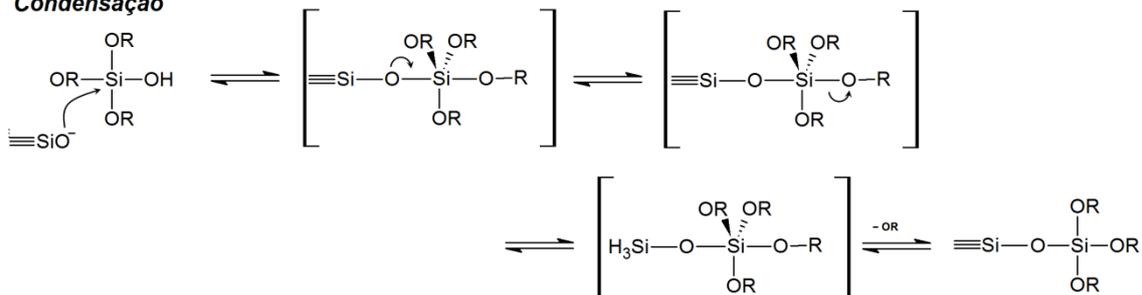


b) Catálise básica - pH > 2

Hidrólise



Condensação



Esquema 5. Mecanismos gerais de hidrólise e condensação de precursores de alcoxi-silano para formar sílica em (a) condições catalisadas por ácido e (b) condições catalisadas por base. A condensação pode produzir água ou álcool como subproduto.

A água e o álcool produzidos nas reações sol-gel servem como agentes porogênicos no material e, quando a secagem é feita em condições ambientes, o material resultante é chamado de xerogel. Se a secagem for feita em condições supercríticas, um aerogel é produzido. Os aerogéis têm densidades extremamente baixas, altas áreas específicas e grandes porosidades, e

possuem excelentes propriedades de isolamento térmico e elétrico. No entanto, sua área específica extremamente grande também os torna menos robustos que os xerogéis, que possuem porosidades menores e áreas de superfície mais baixas.

A taxa de reação para a hidrólise depende do pH, do conteúdo de água da solução de síntese e da natureza do grupo alquila. Geralmente, grupo alquila maiores e/ou mais volumosos diminuem a taxa de hidrólise. Da mesma forma, efeitos estéricos de grupos alquílicos maiores em espécies vizinhas impedem a condensação.

2.2. ESCOLHA DO ANALITO ALVO

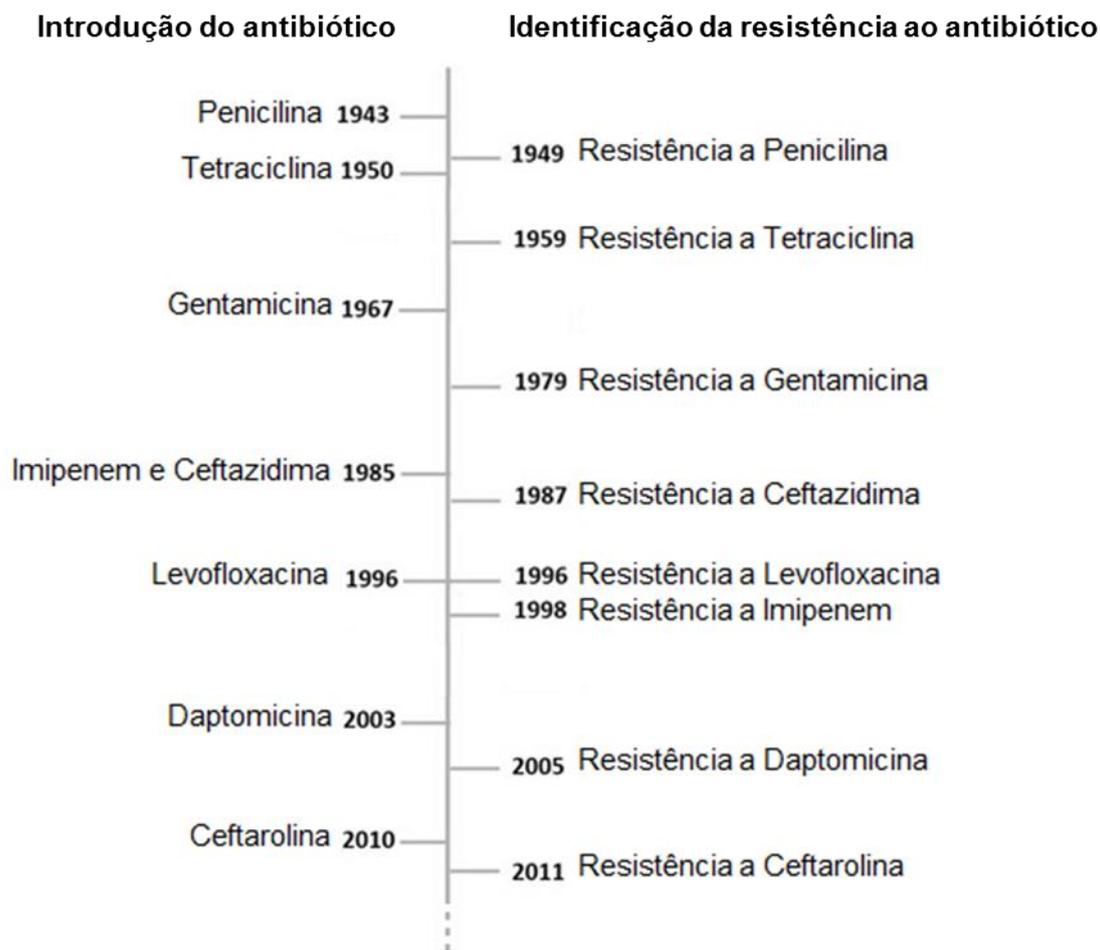
2.3.1. Antibióticos no meio ambiente: causas e danos

O uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana e veterinária tem causado a contaminação frequente do meio ambiente. Sabe-se hoje que seu uso descontrolado é responsável por inúmeros impactos negativos relacionados à contaminação do meio como o surgimento de bactérias resistentes, toxicidade para algas, macrófitas, microcrustáceos e peixes. Os fármacos, de um modo geral, são considerados poluentes emergentes, ou seja, de acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (US EPA - *United States Environmental Protection Agency*) são compostos químicos recentes que não possuem uma regulamentação própria.

A produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio brasileiro. A fim de assegurar a produtividade e a competitividade do setor, a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia é uma prática bastante comum. Dos medicamentos utilizados, os agentes antibióticos correspondem a uma das classes mais prescritas. O Brasil é o terceiro maior usuário de antibióticos na produção animal, atrás da China e dos EUA. Até 2030, deve-se aumentar o uso em cerca de 50%, chegando próximo das 9 mil toneladas/ano. Os EUA continuarão em segundo, com pouco mais de 10 mil toneladas/ano, mas estima-se que a China mais do que dobrará o uso atual, ultrapassando as 30 mil toneladas/ano. Isso demonstra como ainda

contamos com essa ajuda para a intensificação da produção de alimentos de origem animal [26].

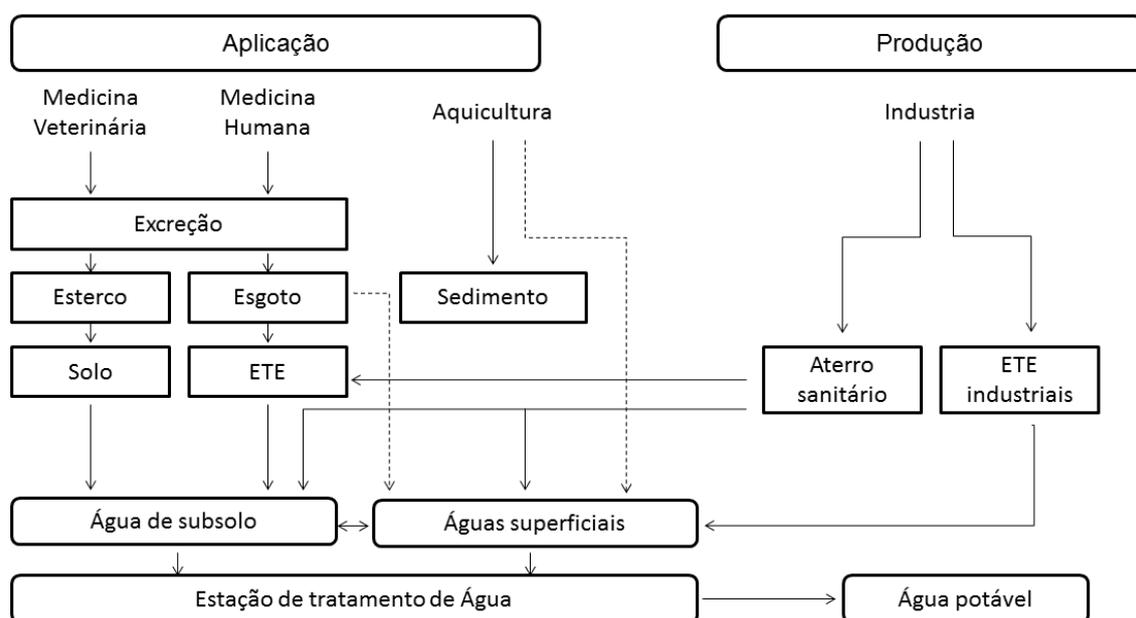
Devido ao surgimento de resistência bacteriana aos antibióticos, que é considerado um problema de saúde pública mundial, a abundância e diversidade de genes de resistência a antibióticos (do inglês *antibiotic resistance genes* - ARGs) em solos se torna um assunto relevante a ser discutido e avaliado. Quando os resíduos de antibióticos entram no solo, os principais processos que determinam sua persistência são sorção para partículas orgânicas e degradação/transformação. A ampla gama de valores de DT50 (dose tóxica mediana) para resíduos de antibióticos em solos mostra que os processos que governam a persistência dependem de diversos fatores, por exemplo, propriedades físico-químicas do resíduo, características do solo e fatores climáticos (temperatura, chuva e umidade). Muitos estudos na atualidade mostram que os antibióticos afetam os microrganismos presentes no meio ambiente, alterando sua atividade enzimática e capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono, bem como alterando a biomassa microbiana total e a abundância relativa de diferentes grupos (bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos) em comunidades microbianas.[27]–[29] Estudos utilizando métodos baseados em análises de ácidos nucleicos provam que antibióticos alteram a biodiversidade de comunidades microbianas e a presença de muitos tipos de ARGs é afetada por atividades agrícolas e humanas. Vale ressaltar que estudos em ARGs no meio ambiente resultaram na descoberta de novos genes e enzimas responsáveis pela resistência bacteriana aos antibióticos. No entanto, muitos resultados ambíguos indicam que a estimativa precisa do impacto dos antibióticos na atividade e diversidade de comunidades microbianas do solo é um grande desafio.[27] No Esquema 6, é possível observar uma breve linha do tempo correlacionando o ano do surgimento com o ano da identificação da resistência a alguns antibióticos.



Esquema 6. Desenvolvimento da resistência dos antibióticos ao longo dos anos (adaptado de [30])

São diversos os caminhos que os antibióticos percorrem até atingirem o meio ambiente: por meio dos efluentes tratados, do lodo residual das ETEs (Estações de tratamento de efluentes) utilizados como fertilizantes por agricultores, do despejo de esgoto diretamente nos leitos dos rios e mares, pelo descarte incorreto de medicamentos, pela pulverização nas plantações ou pela excreção dos animais, cujos resíduos também são muitas vezes utilizados como fertilizantes naturais. Trata-se de alguns dos exemplos encontrados na literatura. Outro caminho comum para os fármacos chegarem ao ambiente são as estações de tratamento de esgoto da própria indústria farmacêutica, que apesar de realizarem o tratamento de seus efluentes, os mesmos não são totalmente eficazes para eliminar os fármacos da água.[31] No Esquema 7 são identificadas as possíveis rotas dos fármacos no ambiente.

Conforme ilustra o Esquema 7, o descarte irregular gera, além da contaminação ao meio ambiente e uma possível toxicidade aos animais, uma aceleração à resistência a esses antibióticos. Embora muitos tenham sido descobertos nos últimos tempos, vários deles não demonstraram utilidade clínica, ou por serem muito tóxicos ou por não serem absorvidos adequadamente pelo organismo humano, por exemplo. A estratégia que vem sendo utilizada para gerar “novos” antibióticos, desde a década de 1990, é modificar a estrutura química daqueles já existentes, para que eles tenham atividade aprimorada contra as bactérias.



Esquema 7. Fluxograma com as possíveis rotas dos fármacos e seus resíduos no ambiente (adaptado de [32]).

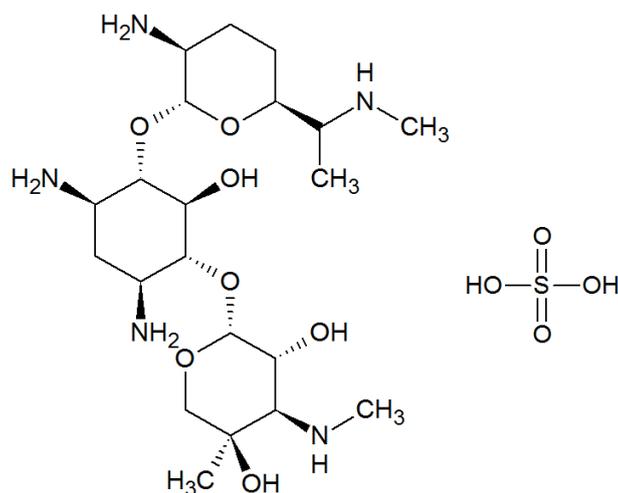
A gentamicina, por se tratar de um dos principais antibióticos utilizados, apresenta uma grande quantidade de resíduos oriundos do seu processo de produção, além da própria aplicação prática em hospitais e fazendas na qual há descarte no ambiente, o que pode induzir o desenvolvimento de genes de resistência a esse fármaco. [33]–[36] O problema da resistência aos medicamentos é a redução da função dos antibióticos, como já mencionado anteriormente. Além disso, há grande quantidade de resíduos sólidos da produção de gentamicina e os excrementos de animais contendo gentamicina.

Até agora, poucos métodos eficazes foram explorados para lidar com os resíduos de gentamicina. Assim, é extremamente urgente o desenvolvimento de soluções economicamente viáveis para remover ou reduzir efetivamente os resíduos de gentamicina no meio ambiente.

A gentamicina é estável ao calor da gentamicina e sua resistência a condições ácidas e alcalinas tornam-na um grande desafio removê-la do ambiente usando degradação química comum ou métodos físicos. A impressão molecular, ao contrário, é uma técnica atraente, por se tratar de uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios específicos de reconhecimento, estereoquimicamente moldados a partir de molécula modelo. A vantagem do uso dessa tecnologia se dá essencialmente na etapa de preparação da amostra. Essa etapa ainda é considerada o gargalo de todo o processo analítico.

2.3.2. *Gentamicina*

A gentamicina, com estrutura de seu sulfato representada no Esquema 8, é um antibiótico bactericida de amplo espectro da família dos aminoglicosídeos que pode ser usada no tratamento de diversos tipos de infecções bacterianas, eliminando infecções na pele, abdominais, gastrointestinais, biliares, geniturinárias, ósseas e em queimaduras [37]. A gentamicina foi patenteada em 1962 e aprovada para uso médico em 1964.[38] É produzida a partir da bactéria *Micromonospora purpúrea* e é encontrada na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde, que lista os medicamentos mais eficazes e seguros necessários em um sistema de saúde.[39]



Esquema 8. Estrutura do sulfato de gentamicina

A gentamicina é muito utilizada na medicina veterinária para o tratamento de diversas infecções, e é um fármaco de primeira escolha por causa de seu baixo custo e atividade confiável para todos os agentes aeróbios gram-negativos, como *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeromoniae*, *Aerobacter aerogenes* e gram-positivos como *Staphylococcus sp* e *Streptococcus sp*.

Os resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal são de grande preocupação para agências e órgãos reguladores, portanto, métodos confiáveis de extração para detecção rápida, seletiva e sensível desses resíduos são necessários para garantir a segurança alimentar. [40] Os resíduos de medicamentos veterinários, como a própria gentamicina, ocorrem geralmente em níveis baixos de concentração, daí a necessidade de pré-concentração. A busca por técnicas de extração e pré-concentração para esse tipo de resíduos está fortemente vinculada com os princípios da química verde, dessa forma a aplicação de polímeros com impressão molecular (MIPs) aliados a extração em fase sólida (SPE) para a extração e pré-concentração de resíduos de medicamentos veterinários se torna uma ferramenta útil que vem sendo estudada e aprimorada.

2.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A preparação de amostras, também chamada de pré-tratamento, tem um papel importante em qualquer método analítico e se torna fundamental para a

análise de matrizes complexas, como amostras de alimentos, biológicas e ambientais. A preparação da amostra permite enriquecer e isolar o analito-alvo, reduzindo assim os efeitos da matriz e os compostos interferentes. A preparação de amostras com base na interação com uma fase sólida é provavelmente a abordagem mais comum em qualquer método analítico e compreende uma série de estratégias que diferem com base na natureza da fase estacionária empregada [41]. Muitas técnicas espectroanalíticas apresentam algumas limitações como a determinação de analitos em baixas concentrações e a grande interferência da matriz no sinal do analito.

A aplicação de métodos de pré-concentração, por exemplo, extração em fase sólida (do inglês *solid-phase extraction* – *SPE*), pode resolver essas limitações. A mesma é baseada na afirmação de que os analitos da amostra, geralmente na forma líquida, são distribuídos e retidos em uma fase sólida, como resina, carvão ativado, sílica e óxido de grafeno. Depois de retidos e separados, os analitos são então recuperados por eluição. A distribuição é influenciada pelas forças intermoleculares entre as fases, que influenciam a retenção e a eluição [42]. Outras características importantes desse tipo de extração são a simplicidade de operação, baixo custo de instrumentação, alta seletividade, baixo consumo de reagente, baixa geração de resíduos e a possibilidade de ser facilmente automatizadas [43], [44].

Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas de microextração para procedimentos de preparação de amostras levou a métodos analíticos com características aprimoradas relacionadas à exatidão, precisão, limites de detecção e rendimento da amostra. As principais técnicas de microextração (e mais desenvolvidas) incluem microextração em fase sólida (SPME)²,

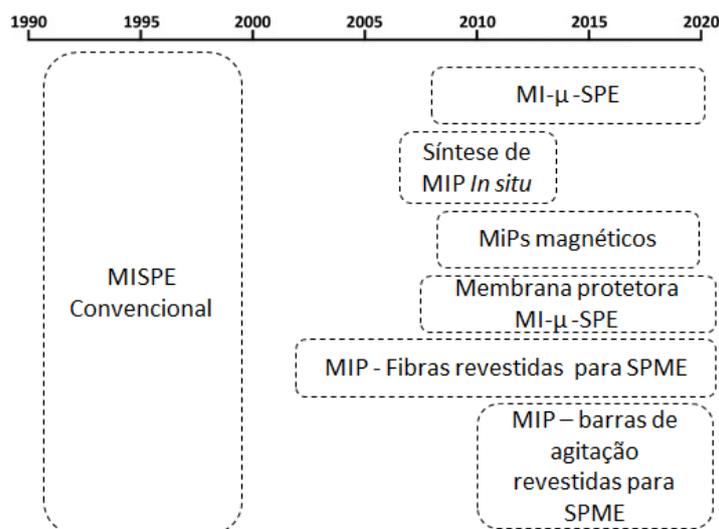
² SPME representa um método rápido e econômico de preparação de amostras para GC e LC que não requer nenhum solvente. O SPME é composto de duas etapas básicas: (1) particionamento de analitos entre a fase de extração e a matriz da amostra e (2) dessorção dos extratos concentrados em um instrumento analítico. Comparado ao SPE tradicional, a quantidade de adsorvente usado em SPME é 1000 vezes menor e pode ser reutilizado até 50 vezes.

microextração em fase líquida (LPME)³, extração sorptiva por barra de agitação (SBSE)⁴ e extração em fase microssólida dispersa (D- μ -SPE)⁵.] A SPME já é usada rotineiramente em laboratórios analíticos, enquanto o uso das outras técnicas de microextração acima mencionadas ainda é marginal. No entanto, todos apresentam alto grau de maturidade e, portanto, seu uso rotineiro é esperado nos próximos anos. Todavia, é importante enfatizar que o processo de extração se baseia na partição dos analitos alvo entre a amostra e uma fase aceitadora (fase líquida ou estacionária). Infelizmente, independentemente da técnica de microextração escolhida, as diferentes fases utilizadas cobrem aproximadamente a escala de polaridade que leva à extração do analito-alvo juntamente com outros compostos da matriz, dificultando sua determinação final pelas atuais técnicas cromatográficas. Essa falta de seletividade durante o processo de extração torna necessário o desenvolvimento de aplicações complexas usando diferentes solventes de lavagem, reduzindo assim as vantagens inerentes às técnicas de microextração [9].

³ Na LPME os poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (fibra oca) são impregnados com o solvente orgânico de extração e o seu lúmen é preenchido com microlitros de uma fase aceitadora. Com isso, a fase aceitadora não entra em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo aplicar agitação constante durante a extração. Além disso, o baixo custo de cada unidade de extração possibilita o seu uso uma única vez. [72]

⁴ Esta técnica foi desenvolvida para extrair analitos orgânicos de amostras líquidas e baseia-se na sorção de analitos em um filme espesso de polidimetilsiloxano (PDMS) revestido em uma barra de agitação de ferro [73]. Consiste em duas etapas: (1) extração de um analito da amostra para o polímero PDMS e (2) dessorção do analito do sorvente para o sistema cromatográfico.

⁵ O D- μ -SPE é um procedimento muito eficiente para aumentar a seletividade dos processos analíticos. É uma técnica de preparação de amostras em que o adsorvente sólido na faixa de μ g é disperso na solução analisada [74]. Após a centrifugação da suspensão, os sedimentos em fase sólida ficam no fundo do tubo de ensaio. Em seguida, é utilizado um solvente orgânico apropriado para eluir os analitos de interesse do sorvente sólido antes da análise do extrato orgânico. Após a eluição dos analitos adsorvidos, eles são dessorvidos termicamente ou determinados diretamente por uma técnica adequada.



Esquema 9. Linha do tempo da incorporação dos MIPs às técnicas de microextração. (adaptado de [9])

Atualmente, existem várias técnicas de preparação de amostras, porém todas sofrem com a falta de seletividade. Nesse sentido, os polímeros com impressão molecular (MIP) são considerados excelentes materiais capazes de realizar extrações seletivas. Assim, os MIPs são excelentes materiais para proporcionar seletividade à preparação da amostra, sendo seu uso na extração em fase sólida, a chamada “extração em fase sólida com impressão molecular” (MISPE), já bem estabelecida atualmente [36]. Esferas de sílica e polímero são os suportes físicos mais típicos da SPE, além de serem os principais materiais usados no preparo de materiais molecularmente impressos.

Os resultados evidenciam que a combinação de MIPs com técnicas de microextração fornece poderosa ferramenta analítica com as características de ambas as tecnologias: simplicidade, flexibilidade e seletividade. Nesse sentido, a incorporação de MIPs às técnicas de microextração tem sido uma área de grande atividade nos últimos anos e marcos relevantes nesse campo são mostrados no Esquema 9.

No entanto, na literatura pouco se fala do uso de MIPs aliado a SPE específico para gentamicina. No banco de dados *Web of Science*, quando usados os tópicos “MIP”, “gentamicin” e “SPE” juntos nos deparamos com apenas dois resultados, e mesmo quando os tópicos usados são “molecular imprinted polymer” ou “solid phase extraction” não conseguimos resultados de

grande impacto. E mesmo nesses casos, a busca nos mostra artigos que tratam de análises de aminoglicosídeos, classe que se encontra a gentamicina, mas nada que aborde um estudo profundo de algum material específico para o mesmo. Deste modo, a questão de pesquisa norteadora da presente dissertação foi: primeiramente, que material molecularmente impresso se comportaria melhor tendo como molécula-alvo a gentamicina: matriz orgânica ou inorgânica? Seria possível uma aplicação como MIPSPE desse material?

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

A presente dissertação tem como objetivo investigar as potencialidades e limitações no desenvolvimento de materiais com impressão molecular para pré-concentração analítica de gentamicina em matrizes orgânicas e inorgânicas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar MIPs produzidos a partir do método sol-gel com sílica com MIPs orgânicos produzidos por polimerização por precipitação usando MAA como monômero funcional.
- Avaliar os processos de adsorção, além de definir o melhor modelo cinético de equilíbrio que descreve o processo de adsorção do sistema;
- Avaliar a seletividade dos MIPs e NIPs com diferentes moléculas análogas a gentamicina.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo, serão apresentados os materiais utilizados durante este trabalho, bem com as metodologias de síntese dos MIPs

4.1. REAGENTES E SOLVENTES

Os materiais listados foram utilizados e acondicionados conforme o fabricante, sem tratamento prévio.

- 1,1' – Azobis (ciclohexano carbonitrila) [C₁₄H₂₀N₄] - Sigma-Aldrich, 98%;
- Acetonitrila (Anidrol, P.A);
- Ácido clorídrico [HCl] - Merck, 23%;
- Ácido metacrílico (MMA) [C₄H₆O₂] - Sigma-Aldrich, 99%;
- Argônio (White Martins, puro);
- Etanol Absoluto;
- Tetraetilortossilicato (TEOS) [SiC₈H₂₀O₄] - Sigma-Aldrich, 99%;
- Trimetilolpropano trimetacrilato (TMPTMA) [C₁₈H₂₆O₆] - Sigma-Aldrich, grau técnico;
- Sulfato de gentamicina (IQ Soluções & Química SA);
- Ninhidrina (Riedel-de Haën)

4.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS ORGÂNICO E INORGÂNICO IMPRESSOS MOLECULARMENTE PARA EXTRAÇÃO DE GENTAMICINA

Ao todo foi sintetizado um conjunto de seis materiais, combinando dois processos distintos: (i) rota sol-gel via ácida (SGA) e (ii) polimerização por precipitação (P), conforme Tabela 1. Em ambos os processos foram sintetizados materiais não impressos, dos quais foram chamados de NIPs, materiais molecularmente impressos, MIPs e por fim, materiais sintetizados

com gentamicina, aos quais foram chamados de GEN. Esses últimos são materiais intermediários, antes da etapa de extração para obtenção dos MIPs.

Tabela 1. Siglas empregadas para os materiais sintetizados pelas duas rotas.

Material	Sigla
Sol-gel não impresso	SG-NIP
Sol-gel impresso	SG-MIP
Sol-gel com gentamicina	SG-GEN
Polímero não impresso	P-NIP
Polímero impresso	P-MIP
Polímero com gentamicina	P-GEN

4.2.1. Preparação do polímero orgânico

Para a rota de polimerização por precipitação, em uma primeira etapa, ocorreu a pré-polimerização, onde iniciou uma interação entre o monômero funcional (ácido metacrílico, MAA) e a molécula molde – neste caso o sulfato de gentamicina. Essa rota de polimerização por precipitação foi adaptada, substituindo os monômeros e agente reticulante de Vallo e colaboradores.[45] Em um Becker foram adicionados 2,370 mmol (0,2 mL) de MAA juntamente com 3,1360 mmol (1 mL) do agente de reticulação trimetilolpropano trimetacrilato (TMPTMA) e 100 mg de sulfato de gentamicina em 35 mL de solvente (acetonitrila), que atua como agente porogênico. Os reagentes interagiram por 24 horas à temperatura ambiente sob agitação magnética para assegurar a homogeneização do sistema.

Após o período de pré-polimerização, a solução foi vertida em um copo de Teflon® (de 100 mL), que foi inserido em uma autoclave de aço inoxidável. Junto à solução foram acrescentadas 28 mg do iniciador radicalar 1,1'- azobis. O sistema foi submetido por 5 minutos sob fluxo de argônio para remoção do oxigênio presente. Vencido este procedimento, a autoclave foi devidamente selada e introduzida em uma estufa com rotação mecânica (MARCONI, SP, BR) mantendo sob agitação e temperatura constante de 90 °C por 24 horas. O polímero final foi obtido por decantação, onde passa por uma etapa de

secagem a 50°C por 12 horas, e uma de moagem até obter um pó fino e homogêneo, e por último, foi acondicionado em frascos.

Em seguida, o polímero foi colocado em contato com 20 mL de água deionizada e submetido à extração em um processador ultrassônico Models 250 & 450, fabricado por Branson-Sonifier® (Schwäbisch Gmünd, Germany). Foram realizados 5 ciclos de extração de 120 segundos, intercalados por intervalos de 30 segundos. A amplitude utilizada foi de 30%. Depois de realizados os ciclos de extração as amostras foram dispostas em tubos falcon de 20 mL e submetidas à centrifugação, recolhendo-se o solvente com gentamicina do material então impresso.

4.2.2. Preparação do material inorgânico

Para o preparo da sílica molecularmente impressa com gentamicina, foi utilizado o processo sol-gel catalisado por meio ácido. Utilizou-se 10 mL de TEOS como precursor de sílica e 8,6 mL de HCl 0,2 M. A mistura foi mantida sob agitação por 12h. Diluiu-se 1g de sulfato de gentamicina em 5 mL de água deionizada, correspondendo desse modo a 600 mg de gentamicina, e se adicionou à mistura anterior. A solução (sol) foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente até a obtenção do gel.

Após, o Béquer contendo o material sol-gel foi levado à estufa (Cole-Parmer®) por 12 horas a 50°C. O material resultante foi moído em gral e pistilo, até obtenção de um pó fino e homogêneo e acondicionado.

Para a extração de gentamicina, o sol-gel contendo o fármaco foi suspenso em 20 mL de água deionizada e submetido ao mesmo processo de extração que o polímero descrito no item 4.2.1.

4.2.3. Caracterização dos MIPs

A maioria das análises foi realizada nas dependências do Instituto de Química da UFRGS. Aquelas realizadas alhures, encontram-se discriminadas.

4.2.3.1. *Análise estrutural*

4.2.3.1.1. *Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR*

As análises de FTIR dos materiais sintetizados foram feitas através de pastilhas com uma espessura de cerca de 1 mm e 5 mm de diâmetro. Para a formação da pastilha, cerca de 10% em massa de amostra foi adicionado a KBr seco, onde foram misturados em gral com pistilo. Os espectros FTIR dos sensores foram obtidos utilizando o equipamento Shimadzu FTIR 8300 na função de transmitância coadicionando 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.3.1.2. *Espectroscopia de reflectância total atenuada – ATR*

Também foram realizadas análises em modo de reflectância total atenuada, a fim de se analisar a superfície dos materiais, depositando uma quantidade de amostra (pó) sobre cristal de KBr com 32 aquisições e resolução de 4 cm^{-1} em equipamento Alpha P Bruker na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.3.1.3. *Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X – XPS*

As medidas de XPS foram realizadas em um equipamento OMICRON (CHA - Concentric Hemispherical Analyser) modelo EA 125, utilizando radiação Al/Ka ($1486,6\text{ eV}$) e ânodo operado a 15 kV, 15mA e 225W. O espectro de varredura (Survey) foi obtido com uma energia de passagem de 50 eV e passo de 1 eV e as regiões específicas de interesse foram obtidas em uma resolução maior, energia de passagem de 10 eV e passo de 0,1 eV. As amostras foram depositadas sobre fita de cobre em porta amostras de molibdênio e transferidas sob atmosfera para a pré-câmara. A pressão na câmara de análise foi de 1×10^{-9} mbar.

4.2.3.2. Análise Textural e Morfológica

4.2.3.2.1. Área Específica e Porosidade

A área de superfície do material foi investigada usando porosimetria de nitrogênio em um analisador Micromeritics Gemini. As amostras foram desgaseificadas a 110°C durante 24 h sob vácuo antes de cada medição. A área específica foi determinada a partir das isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio (pureza 99,99%, White Martins) a -196 °C usando o método Brunauer-Emmett-Teller (BET) na faixa de pressão parcial de $0,01 < P/P_0 < 0,35$. Os tamanhos dos poros foram calculados usando a equação de Barrett-Joyner-Halenda (o método BJH) com os padrões de Halsey.

4.2.3.2.2. Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos – SAXS

Os experimentos de SAXS foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, na linha D1B-SAXS1 usando um comprimento de onda de 1,488 Å e um detector Pilatus 300k. SAXS é uma técnica utilizada para estudar heterogeneidades estruturais de tamanho coloidal [46]. Nesta técnica, um feixe de Raios X de baixa divergência incide sobre a amostra e um padrão de intensidade, resultante do espalhamento coerente que surge da não homogeneidade da densidade de elétrons dentro da amostra, é medido em função do ângulo de espalhamento. O feixe de Raios X passou por um monocromador de silício e colimado por um conjunto de fendas que definem um tipo de geometria denominada *pin-hole*⁶. O feixe incidente foi detectado por duas distâncias diferentes entre amostra e detector de 994,2 mm e 2245,7 mm – com a intenção de aumentar a faixa do vetor q coletada, onde $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$; e

⁶ *Pin-hole*: Designação do inglês "buraco de agulha" relacionado à geometria de colimação do feixe eletromagnético na linha de SAXS. Caracteriza-se por apresentar um orifício único. Aumenta o campo de visão da região em estudo, proporciona pequeno campo de detecção. Possui um ponto focal e o seu campo de visão aumenta com a distância. É comumente utilizado para ampliação da imagem.

$2\theta = \text{ângulo de espalhamento}$. Os sensores foram dispostos entre duas fitas de Kapton e o feixe de Raios X colimado foi passado através de uma câmara contendo o porta amostras de aço inoxidável. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente e, behenato de prata foi utilizado como padrão de calibração para a distância entre detector e a amostra, inclinação e posição do feixe. A transmissão e correções da radiação de fundo e para as fitas Kapton® foram realizadas na imagem 2D antes do processamento dos dados de amostragem. A média dos padrões de espalhamento isotrópicos foi realizada radialmente.

Num sistema isotrópico, a intensidade de SAXS, $I(q)$, função da forma e tamanho das partículas, é descrita em termos do módulo do vetor de espalhamento q , definido por:

$$q = (4\pi/\lambda)\text{sen}(\theta/2) \quad (2)$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação incidente e θ o ângulo de espalhamento. Há uma lei de reciprocidade, como na lei de Bragg, entre o módulo do vetor de espalhamento q e o comprimento característico L da escala com a qual se está estudando um objeto, de modo que:

$$L \sim 1/q \quad (3)$$

Dessa forma, variando-se o intervalo de q pode-se estudar um objeto em diferentes escalas de resolução. Via de regra, partículas coloidais de pequenas dimensões produzem largos domínios na curva de intensidade de espalhamento $I(q)$ enquanto que partículas de grandes dimensões produzem estreitos domínios.

A intensidade de espalhamento, $I(q)$, por um sistema de N partículas idênticas espalhando independentemente pode ser aproximada pela lei de Guinier [46]:

$$I(q) = N(\Delta\rho)^2v^2\exp(-R_G^2q^2/3) \quad (4)$$

onde R_G é o raio de giro das partículas de volume v e $\Delta\rho$ a diferença entre as densidades eletrônicas das partículas e da matriz na qual elas estão dispersas. A lei de Guinier deve ser observada para pequenos valores de q tal que $qR_G <$

1. Se o sistema é polidisperso, isto é, há uma distribuição de tamanho de partículas. Então, o valor de R_G observado através da lei de Guinier tem peso muito grande das maiores partículas [47]. Neste caso, apenas um valor médio de R_G com peso muito grande das maiores partículas espalhando pode ser obtido através de um gráfico $\log I(q)$ versus q^2 .

A intensidade de espalhamento $I(q)$ para valores maiores de q , correspondente a parte assintótica da curva ($qL \gg 1$), segue a lei de Porod [48]:

$$I(q) = 2\pi(\Delta\rho)^2 S q^{-4} \quad (5)$$

onde S é a superfície de interface entre as partículas e a matriz. A lei de Porod é válida para partículas de tamanhos dissimilares, independente do estado de compactação (vale também para um sistema de duas fases homogêneas ocupando as frações de volume φ e $(1-\varphi)$), desde que $qL \gg 1$ para qualquer dimensão L das partículas (ou fases) e que a interface tenha um contorno nítido (não difuso) e seja perfeitamente lisa (superfície não fractal). Um gráfico de $\log I(q)$ versus $\log q$ para um tal sistema resulta numa reta com inclinação -4 na região de Porod, de modo que a quantidade $I(q)q^4$ permanece constante, uma quantidade denominada constante da lei de Porod frequentemente indicada por K_P .

A análise dos dados de SAXS foi processada utilizando o *software* Igor Pro (WaveMetrics) empregando a rotina de avaliação Irena.[49] O ajuste unificado de múltiplos níveis foi utilizado para descrever os níveis organizacionais estruturais nos dados de espalhamento. Neste método, o espalhamento resultante de cada nível estrutural é a soma de uma forma exponencial de Guinier e uma cauda é descrita pela Lei de Potências⁷. [50]

⁷ Na Física, uma lei é dita lei de potência se entre dois escalares x e y ela é tal que a relação pode ser escrita na forma: $y = ax^k$, onde a e k são constantes. A lei de potência é expressa por uma linha reta em um gráfico log-log, pois a equação anterior pode ser escrita como: $\log(y) = k \log(x) + \log(a)$ que é a mesma forma da equação de uma reta, $y = mx + c$.

4.2.3.2.3. *Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV*

Utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL, modelo JSM 6060, operado a 10 kV no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS. As amostras foram preparadas dispondo uma quantidade pequena de cada sensor em uma fita de carbono a qual foi fixada sobre porta amostra de alumínio, que posteriormente foi submetido à metalização com uma fina camada de ouro. As micrografias foram obtidas com diferentes magnitudes. A técnica permite avaliar a diferença morfológica entre os MIPs e os NIPs preparados.

4.2.3.2.4. *Microscopia Confocal*

As análises de microscopia confocal foram realizadas em um microscópio confocal FluoView (Olympus), modelo FV1000 equipado com a objetiva UPLSAPO 60X O NA:1.35. O equipamento foi operado no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS. A linha de laser de excitação foi 510 nm. Uma pequena quantidade dos materiais adsorventes foram disposta em lamínula de vidro. As imagens, obtidas em modo sequencial, foram feitas ao longo do eixo z dos sensores e processadas e analisadas pelo software FluoView (Olympus).

4.3. ESTUDOS DE ADSORÇÃO

Para avaliar a capacidade de reconhecimento e da adsorção do MIP e NIP estudos de adsorção e isoterma de adsorção foram realizados.

Para o estudo de adsorção foi preparada uma solução de gentamicina 100 mg.L⁻¹ em solução tampão de fosfato pH 7,4 e foram usados 10 mg de cada material sintetizado. Os materiais previamente pesados foram transferidos para tubos de ensaio com tampa e adicionados 5 mL da solução de gentamicina recém preparada, sendo cada ensaio preparado em triplicata. Em seguida, os tubos foram fechados e agitados por 4 h em agitador horizontal. Ao final do tempo decorrido, recolheu-se 2 mL da solução, centrifugou-se e então realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis seguindo o método

colorimétrico com nihidrina, com equação da reta igual a $y = 0,0148x - 0,3285$, $r^2 = 0,97$ e $N = 7$.

A capacidade de adsorção dos materiais foi avaliada pela diferença da concentração de gentamicina antes e depois da adsorção e foi estimada pela equação (6).

$$Q = \frac{(C_0 - C_s) \times 1000 \times V}{m} \quad (6)$$

onde: Q ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) é a capacidade de adsorção por unidade de massa dos materiais, C_0 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) a concentração inicial da solução do analito, C_s ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) a concentração do analito livre no equilíbrio, V (L) é o volume da solução de gentamicina e m (g) é a massa do material.

O fator de impressão (IF) foi determinado com base na equação (7), sendo este definido pela razão da resposta do MIP versus NIP.

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (7)$$

4.3.1. Estudo Cinético de Adsorção

Para determinar os tempos de equilíbrio para a adsorção de gentamicina aos materiais molecularmente impressos, foram realizados estudos cinéticos de adsorção. Selecionaram-se os materiais mais adequados, ou seja, aqueles que apresentaram valores de IF melhores como descrito no anteriormente.

Em tubos de ensaio providos com tampa foram adicionados 5 mL de solução de gentamicina ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e 10 mg de MIP. Os tubos foram fechados e submetidos à agitação mecânica (500 rpm) em equipamento Shaker GFL 3005, fabricado por Gesellschaft für Labortechnik mbH® (Burgwedel, Germany) em temperatura ambiente. Cada frasco correspondeu a um determinado intervalo de tempo (15 a 300 min). Ao término de cada intervalo de tempo, o frasco correspondente era retirado da agitação e 2 mL da solução recolhida, centrifugada e analisada pelo método colorimétrico em UV-Vis.

4.3.2. Isotermas de Adsorção

As isotermas de adsorção foram realizadas preparando soluções de gentamicina adequadas para cada tipo de material. Para o SG-MIP preparou-se uma curva com concentrações de 20 a 400 mg.L⁻¹, enquanto que para P-MIP as concentrações selecionadas foram de 20 a 250 mg.L⁻¹. Em seguida foram adicionados 10 mg de material adsorvente em tubos de ensaio com tampas juntamente com 5 mL de solução de gentamicina. As amostras foram mantidas sob agitação mecânica constante (mesma condição e equipamento usados no item 4.3.1) por uma hora. Após esse tempo, alíquotas de 2 mL foram recolhidas, centrifugadas e analisadas pelo método colorimétrico em UV-Vis.

A estimativa dos parâmetros de ambas as isotermas foi realizada utilizando-se quadrados mínimos não-lineares (*non-linear least-square* NLLS) que foi implementado no Matlab usando a função *fmincon*. [51]

A qualidade da estimativa dos parâmetros foi analisada a partir do intervalo de confiança do parâmetro (I), da matriz de correlação (C), do coeficiente de determinação (r^2), e avaliando visualmente a qualidade de ajuste (dados previstos vs. dados experimentais).

O intervalo de confiança e a matriz de correlação foram calculadas considerando a distribuição de t -Student para confiança de 95% como mostrado nas Equações (8) -(15).

$$I = p \pm t_{\alpha, (n-n_p)} \sigma_p(i) \quad (8)$$

$$\sigma_p = \sqrt{\text{diag}(v_p^2)} \quad (9)$$

$$\alpha = \frac{1 + 0.95}{2} \quad (10)$$

$$v_p^2 = v_{exp}^2 (M^T M)^{-1} \quad (11)$$

$$v_{exp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n v_i^2}{n - n_p} \quad (12)$$

$$M(q_e, p) = \left[\frac{\delta q_e}{\delta p} \right] \quad (13)$$

$$C_{ij} = \frac{(v_p)_{ij}}{\sqrt{(v_p)_{ii}(v_p)_{jj}}}; \text{ para } i \neq j \quad (14)$$

$$C_{ij} = 1; \text{ para } i = j$$

onde:

p é o parâmetro estimado;

σ_p é o desvio padrão do parâmetro;

v_{exp}^2 é a matriz de covariância do parâmetro;

v_{exp}^2 é a variância experimental média;

v_i^2 é a variância experimental do experimento i ;

M é a matriz derivada;

C é a matriz de correlação;

$Diag$ é a matriz de covariância (diagonal);

ε é o desvio previsto;

q_e é a quantidade adsorvida do composto;

n é o número de pontos experimentais;

n_p é o número de parâmetros ajustáveis.

Isotermas de adsorção de Freundlich e Langmuir

Isoterma de adsorção de Freundlich é mostrada na Equação (16) Contudo, usando a Equação (15) nas estimativas leva a valores altamente correlacionados de k_f e $1/n$. [52]

$$q_e = k_f C_e^{1/n} \quad (15)$$

A fim de obter parâmetros de baixa correlação, Equação (16) foi redefinida considerando uma nova variável $C_e^* = K C_e$. As Equações (13) –(17) podem ser usadas no ajuste de dados para uma substituição adequada de C_e^* na Equação (15). Nesse sentido, parâmetros de baixa correlação podem ser

estimados a partir da configuração adequada de K permitindo que a matriz de $M^T M$ não seja singular na Equação (8). [52]

$$q_e = \alpha(C_e^*)^\beta \quad (16)$$

$$q_e = \alpha K^\beta (C_e)^\beta \quad (17)$$

Onde: $k_f = \alpha K^\beta$ e $1/n = \beta$.

Infelizmente, uma modificação similar não é tão simples de ser aplicada na isoterma de adsorção original de Langmuir (Equação (18)).

$$q_e = \frac{q_m k_a C_e}{1 + k_a C_e} \quad (18)$$

Isoterma BET modificada para adsorção sólido-líquido

$$q_e = \frac{y_1 y_2 C_e}{abs(y_3 - C_e) \left(1 + (y_2 - 1) \frac{C_e}{y_3}\right)} \quad (19)$$

Onde: $abs(x)$ é o valor absoluto do argumento x .

A isoterma modificada de BET não é uma função contínua. Para $C_e = y_3$ a função torna-se infinita. Sendo assim, é necessário que se aplique a Equação (19) entre duas regiões, $C_e < y_3$ e $C_e > y_3$.

4.3.3. Estudos Comparativo de Fármacos

Para avaliar a eficiência dos materiais desenvolvidos frente a outras moléculas similares a gentamicina, foi utilizado sulfato de gentamicina e outros dois fármacos com estruturas semelhantes, tobramicina e sulfato de amicacina. Uma solução de 100 mg L^{-1} de cada um dos compostos foi preparada em tampão fostato, com pH 7,4. Esse estudo foi feito adicionando-se 10 mg do material adsorvente em um frasco com 5 mL contendo uma das soluções. A mistura foi mantida sob agitação constante por 4h e temperatura ambiente

(mesma condição e equipamento usados no item 4.3.1). Após esse período, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado e analisado pelo método colorimétrico em UV-Vis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão discutidos os resultados referentes à performance e caracterização dos materiais sintetizados através da tecnologia de impressão molecular. Para tal, optou-se em dividir o capítulo em três partes: (i) caracterização da análise estrutural, na qual se investigou os dados de UV, FTIR, ATR e XPS; (ii) análise textural e morfológica dos materiais sintetizados, através das análises de BET, SAXS, MEV e Microscopia Confocal. Por fim, (iii) o desempenho dos materiais impressos sintetizados foi avaliado frente à capacidade de se mostrarem adsorventes eficientes para a gentamicina através dos estudos de adsorção.

5.1. DESEMPENHO DOS MATERIAIS SINTETIZADOS

Na Figura 1 são apresentadas imagens dos materiais obtidos antes e depois da etapa de extração da gentamicina usando processador ultrassônico. Apenas o material SG-Gen apresentou uma coloração diferente antes da extração. Os demais sempre se mantiveram como pós brancos.

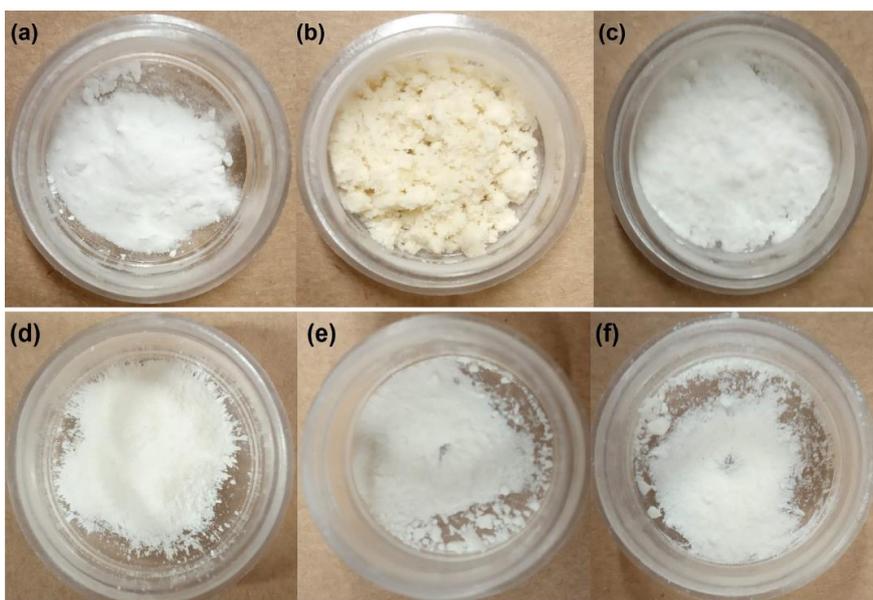


Figura 1. Imagens de (a)SG-NIP (b)SG-Gen (c)SG-MIP (d)P-NIP (e)P-Gen (f)P-MIP.

O primeiro teste realizado teve como parâmetro o fator de impressão (IF) descrito no item 4.3. Na Tabela 2 são mostrados os valores de concentração inicial da solução do analito (C_0 em mg.L^{-1}); da concentração do analito livre no equilíbrio (C_s em mg.L^{-1}); da capacidade de adsorção (Q) e do fator de impressão para cada um dos materiais.

A análise dos materiais impressos frente aos seus materiais não impressos permite avaliar a eficácia e se a síntese ocorreu corretamente com respeito à impressão da molécula alvo. Os resultados apresentados apontam que há uma relação adequada entre SG-MIP/SG-NIP com valor de IF igual a 1,54 demonstrando que sítios específicos para gentamicina foram formados com maior eficiência. Em contrapartida, os resultados para a relação P-MIP/P-NIP mostram que essa eficiência menor para esse material, nesse caso o IF obtido foi igual a 1,08

Tabela 2. Dados obtidos do estudo de adsorção para os materiais adsorventes. $C_0 = 107,6 \text{ mg.L}^{-1}$.

	$C_s \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$	$Q \text{ (}\mu\text{g.g}^{-1}\text{)}$	IF
SG-MIP	70,667	18467,797	$1,533 \pm 0,031$
SG-NIP	83,500	12026,350	-
P-MIP	88,767	9417,117	$1,077 \pm 0,038$
P-NIP	90,000	8749,320	-

Onde C_0 = concentração inicial da solução do analito; C_s = concentração do analito livre no equilíbrio; Q = capacidade de adsorção; IF = fator de impressão.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2, foram realizadas análises de caracterização dos materiais com o intuito de se entender esses comportamentos distintos entre o SG e o P.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MIPS.

5.2.1. Análise Estrutural

Inicialmente foram feitas leituras do sulfato de gentamicina e dos materiais SG-Gen e P-Gen por Espectroscopia de Refletância Difusa no Ultravioleta/Visível (UV-DRS) e Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A primeira foi realizada com a intenção de observar se haveria algum deslocamento da banda de gentamicina (247 nm) quando a mesma fosse sintetizada com os materiais SG e P, ou seja, decorrente da interação do fármaco com a matriz. Todavia, os espectros não apresentaram nenhum sinal que pudessem revelar algum comportamento distinto e relevante dessa interação, sendo então descartada sua interpretação para o presente estudo.

Com relação à análise de FTIR, primeiramente foi realizado um espectro apenas do fármaco. O objetivo era identificar os picos característicos da gentamicina que pudessem ser observados nos materiais adsorventes e dessa forma explorar a existência da sua interação com a matriz antes e depois da etapa de extração (Figura 2)

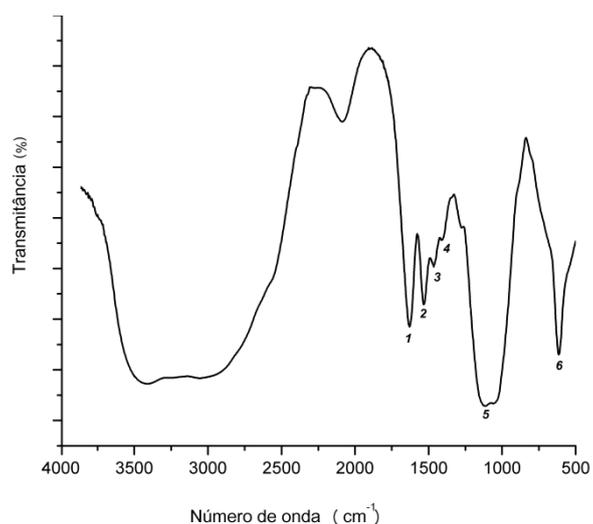


Figura 2. Espectro de FTIR do sulfato de gentamicina. Pastilha em KBr. Resolução 4 cm⁻¹.

Na Tabela 3 estão descritas as frequências e atribuições de cada pico apresentado na Figura 2.

Tabela 3. Principais picos de FT-IR do sulfato de gentamicina.[53]

Pico	Atribuição	Frequência (cm ⁻¹)
6	δ_{C-C-C}	615
5	δ_{H-O-C}	1116
4	δ_{N-CH_3}	1411
3	δ_{H-C-H}	1465
2	δ_{C-N-H}	1531
1	δ_{H-N-H}	1629

Assim como para o fármaco, medidas na região do infravermelho foram realizadas para ambos os materiais, SG e SG-MIP, e os espectros obtidos para as amostras são apresentados na Figura 3a e 3b. Observa-se que ambos os espectros são similares. Em 3439 cm⁻¹ (1) há o estiramento de grupos OH resultantes de silanóis não condensados e a água residual adsorvida, cuja presença é confirmada pela banda centrada aproximadamente em 1643 cm⁻¹ (2), atribuída à deformação da molécula de água.[54] Em 935 cm⁻¹ (4), destaca-se a deformação (δ_{Si-O-H}) do grupo silanol.[55] Por fim, encontram-se em 1100 cm⁻¹ (3) e 800 cm⁻¹ (5) as bandas correspondentes, respectivamente, ao estiramento assimétrico (ν_{Si-O}) e simétrico (ν_{Si-O}) da ligação Si-O da rede e sílica. [56], [57]

Não há diferenças significativas entre os espectros de infravermelho do SG-NIP e SG-MIP, já que a diferença entre os dois é essencialmente morfológica e não de composição química e estrutural. No entanto, vale ressaltar a existência do pico em 617 cm⁻¹ (6) na Figura 3b referente à deformação (δ_{C-C-C}) dos anéis. O mesmo é encontrado no espectro do material antes da extração e desaparece no espectro do SG-MIP.

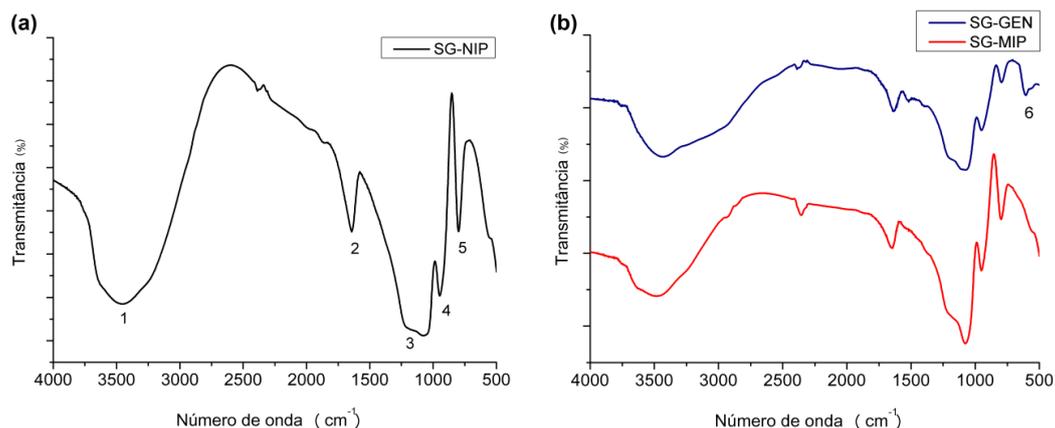


Figura 3. Espectro de FTIR para todos os materiais sintetizados com matriz inorgânica. (a) SG-NIP e (b) acima SG-Gen e abaixo SG-MIP.

Para o P e P-MIP, as medidas na região do infravermelho encontram-se na Figura 4. Em 3506 cm^{-1} (1) há o estiramento de grupos OH, em 1732 cm^{-1} (2) [58] encontra-se o pico referente às vibrações de estiramento ($\nu_{C=O}$) do grupo $-\text{COOH}$. Já os picos destacados em 1153 cm^{-1} (3) e 970 cm^{-1} (4) [59] correspondem à deformação (δ_{C-O-C}), presente no material reticulante usado (TMPTMA) e ao estiramento ($\delta_{C=CH_2}$), respectivamente.

Assim como observado para o SG, não há diferenças notórias entre os espectros de infravermelho do P-NIP e P-MIP; o que pode ser ressaltado é o pico encontrado em 1384 cm^{-1} (5) devido ao (δ_{H-O-C}) que aparece no espectro do material polimérico com o fármaco, antes da extração (P-GEN), e que não aparece nem no espectro do material branco nem após a extração do fármaco.

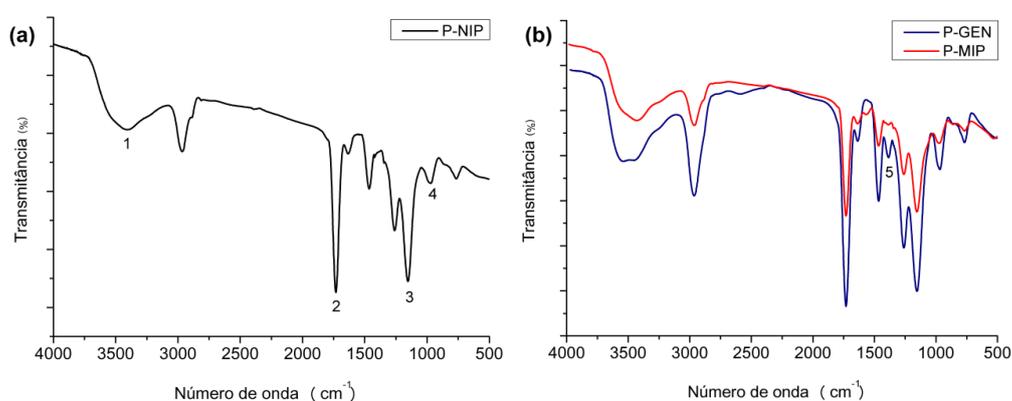


Figura 4 – Espectro de FT-IR para todos os materiais sintetizados com matriz orgânica. (a) P-NIP e (b) P-Gen (vermelho) e P-MIP (azul).

De acordo com a Tabela 4, as bandas referentes à deformação do grupo SiOH apresentaram os maiores deslocamentos para o material SG-Gen, indicando provável interação com as moléculas do fármaco. Para o polímero, no entanto, não foi observado nenhum deslocamento que se mostrasse significativo, isso se deve muito provavelmente pelo fato da concentração de gentamicina usada para a síntese do P-Gen ter sido em menor quantidade em comparação ao SG-Gen e também pela possibilidade do fármaco ter se mantido na região interna do material.

Tabela 4. Deslocamento das principais bandas presentes na gentamicina e os possíveis deslocamentos ($> 4 \text{ cm}^{-1}$) nos materiais SG-Gen e P-Gen.

Frequência (cm^{-1})							
Sol-Gel				Polímero			
Atribuição	SG	SG – Gen	$\Delta\bar{\nu}$	Atribuição	P	P – Gen	$\Delta\bar{\nu}$
ν_{O-H}	3439	3433	6	ν_{O-H}	3506	3506	0
$(\delta_{O-H})_{H_2O}$	1643	1635	8	$\nu_{C=O}$	1732	1730	2
ν_{Si-O}	1100	1120	20	δ_{C-O-C}	1153	1155	2
δ_{Si-O-H}	935	952	17	$\delta_{C=CH_2}$	970	970	0
ν_{Si-O}	800	796	4				

Espectros de ATR também foram analisados. Essa é uma análise onde a radiação é direcionada a um ângulo específico (rasante), no qual, antes de alcançar a amostra, a radiação é totalmente refletida no cristal opticamente denso onde a amostra é suportada, permitindo assim que o feixe de luz penetre numa camada fina da superfície da amostra possibilitando por fim o estudo da sua superfície.

Ao observar os espectros de ATR obtidos para ambos os materiais, antes e após a etapa de extração, observa-se que no material SG existe uma grande diferença, principalmente no aparecimento do pico em 1070 cm^{-1} característico do estiramento de Si-O que aparece apenas no material impresso (SG-MIP), indicando assim, que muito provavelmente as moléculas

de gentamicina tenham se mantido na parte externa do material, pois esse mesmo pico é subtraído no espectro do material antes da extração (SG-GEN).

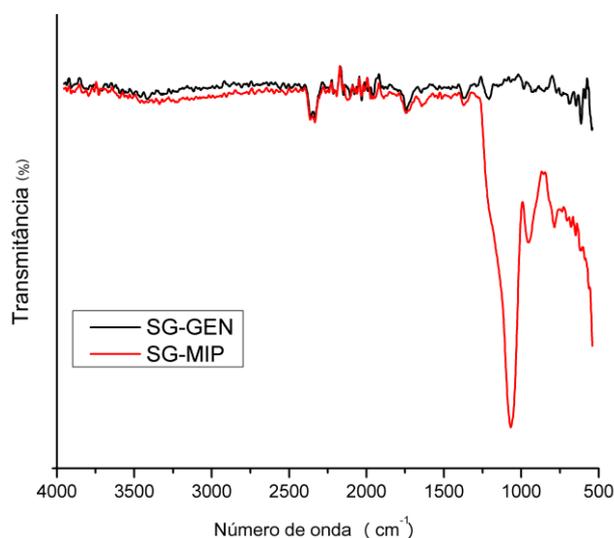


Figura 5. Espectro de ATR para SG-GEN e SG-MIP.

Para o material polimérico, no entanto, não se observou supressão de nenhum pico no espectro do material P-GEN, ou ao mesmo o surgimento de algum pico no espectro do material P-MIP que pudesse indicar a mesma característica do material SG; para este, acredita-se que as moléculas de gentamicina tenham se incorporado ao material, se acumulando no interior dos mesmos.

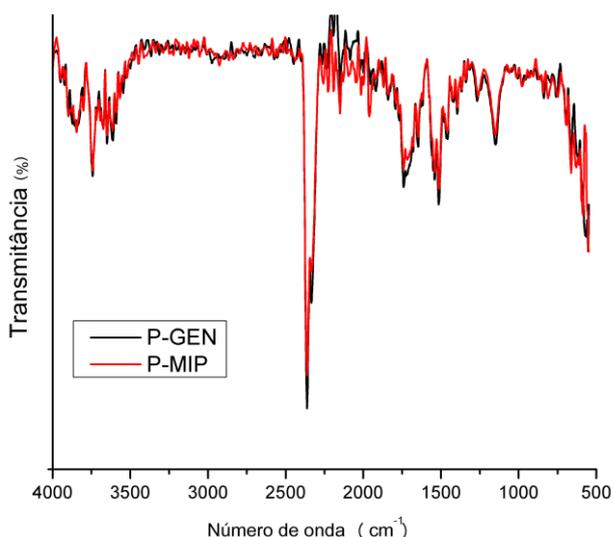


Figura 6. Espectros de ATR para P-GEN e P-MIP.

Para complementar a análise estrutural das amostras e a fim de se comprovar as possíveis interações entre gentamicina e os materiais SG e P, foram realizadas análises de Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio X (XPS) dos materiais SG-Gen e P-Gen.

O principal pico investigado foi do nitrogênio (1s), e os dados a respeito da sua energia de ligação (eV) e largura à meia altura de ligação (eV) – do inglês *full width at half maximum*, FWHM – são encontrados na Tabela 5.

Tabela 5. Energia de ligação, valores de FWHM, e a razão entre as áreas de pico N/S para a gentamicina, SG-Gen e P-Gen.

	Energia de ligação (eV)	FWHM (eV)	N/Si
Gentamicina	403,9	1,9	-
SG-Gen	406,6	2,5	0,17
P-Gen	-	-	-

Como é observado na Tabela 5, o pico referente ao nitrogênio não foi observado no material P-Gen. Isso pode ter ocorrido pelo fato de alguns materiais, poliméricos muitas vezes, apresentarem degradação por fontes monocromáticas ou não monocromáticas de raios X.

Com relação à energia de ligação, percebe-se um aumento do valor encontrado para o fármaco (403.9 eV) isolado com relação quando o mesmo é incorporado ao material SG (406.6 eV). Esse aumento indica que o nitrogênio presente no material SG-Gen se encontra mais catiônico, ou seja, está doando densidade eletrônica para algum átomo vizinho. Quando comparado com os resultados já encontrados por FTIR, em que há um deslocamento da banda de Si-O e Si-OH para número de onda maior para o material SG-Gen, isso indica que o nitrogênio pode ser sim um dos responsáveis pela interação da gentamicina com o xerogel. Além disso, foi possível observar um aumento no valor de FWHM, sugerindo uma maior heterogeneidade das espécies na sílica.

5.2.2. Análise Textural e Morfológica

A determinação da área específica dos materiais tem o objetivo de observar a presença de microporos, mesoporos e macroporos. Tal procedimento permite determinar as características relacionadas à porosidade e área específica dos materiais sintetizados. Os gráficos obtidos das isotermas de adsorção em fase gasosa, e os gráficos de distribuição do tamanho de poro BJH encontram-se na Figura 7.

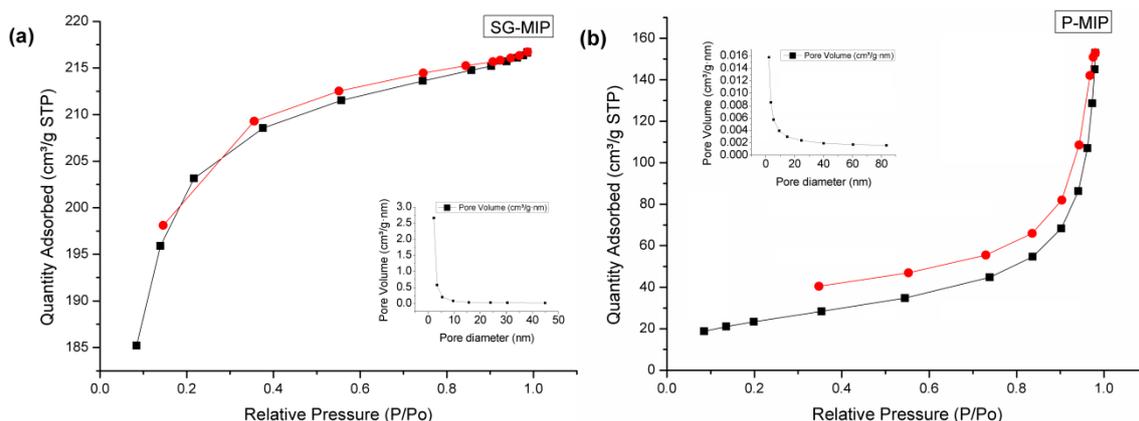


Figura 7. (a) e (b) representam os gráficos das isotermas de adsorção-dessorção de N_2 para SG-MIP e P-MIP, respectivamente. No inset de cada uma das figuras estão contidos os gráficos de distribuição de tamanho de poro por modelo BJH.

Através da Figura 7 é possível identificar diferentes perfis de isotermas, além de volume e diâmetro de poros distintos, mostrando assim a diferença entre os materiais. De acordo com a classificação oficial da IUPAC, a isoterma do adsorvente SG-MIP (Figura 7a) é classificada como tipo Ia, já a isoterma do P-MIP foi classificada como sendo do tipo II e ambas não apresentaram formação de histerese em seus gráficos. O que é possível extrair desses gráficos é que os dois materiais apresentam microporos, mas o que os difere é que no material SG-MIP a quantidade de microporos é muito superior quando comparado ao material P-MIP. Na Tabela 6 são apresentados os dados extraídos das isotermas de adsorção/dessorção de N_2 .

Tabela 6. Caracterização textural dos MIPs a partir das isotermas adsorção/dessorção de N₂.

MIP	Área específica BET (m²g⁻¹)	Volume poros (cm³g⁻¹)
SG – NIP	515	0,1156
SG – Gen	1,57	0,0122
SG – MIP	671	0,0709
P – NIP	-	-
P – Gen	-	-
P – MIP	86	0,2055

Os dados apresentados na Tabela 6 demonstram que cada material apresenta características de fato distintas. O material SG-MIP apresenta elevada área específica (671 m²g⁻¹), quase oito vezes maior quando comparada com a área específica do material P-MIP (86 m²g⁻¹). Já quando comparados tamanho de poros e volume de poros o material P-MIP apresentou valores superiores ao SG-MIP e a todos os demais. Para os materiais P-Gen e P-NIP não foram possíveis realizar a determinação da área específica.

Ao comparar a área específica do material SG-MIP (671 m²g⁻¹) ao seu correspondente não impresso (515 m²g⁻¹), observa-se um aumento desse valor, demonstrando assim que a gentamicina afetou as propriedades texturais do material. Esse fenômeno se deve ao fato da formação de cavidades geradas pelo fármaco após a extração do mesmo. O tamanho médio dos poros, no entanto, não apresentou mudança significativa do material branco para o material impresso, o que se teve foi uma diminuição do seu volume em aproximadamente 60%. Isso pode estar ligado ao tamanho da estrutura da gentamicina e de como a mesma se comportou na formação das cavidades na superfície do material SG-MIP. Vale ressaltar que a síntese do sol-gel através de catálise ácida, apresenta materiais com área específica elevada, podendo chegar até 600 m²g⁻¹ dependendo da quantidade de ácido adicionado[61], quando comparado com a literatura, os valores de SG-MIP também se mostraram adequados;[62], [63] Para o SG-Gen, ou seja, o xerogel antes da

etapa de extração do fármaco, o valor de área específica é baixíssimo, ainda mais comparado com os valores do NIP e do MIP. Isso caracteriza um material muito pouco poroso, consequência do preenchimento desses poros pela gentamicina. Para o polímero, a comparação dos valores de área e tamanho e volume de poros ficaram prejudicados devido à falta de dados para os materiais P-NIP e P-Gen.

O espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) é uma técnica experimental baseada na interação de raios X com a matéria, compartilhando o mesmo princípio físico básico da técnica de cristalografia por difração de raios X. A diferença entre essas duas técnicas é que a primeira apresenta apenas um contraste do sinal entre a densidade eletrônica média da partícula e do seu ambiente químico sem qualquer informação sobre as posições atômicas, sendo assim, as informações obtidas por essa técnica nos permitem esclarecer como se deu o crescimento e organização das partículas fractais dos materiais em escala manométrica (entre 1 e 100 nm).[64]

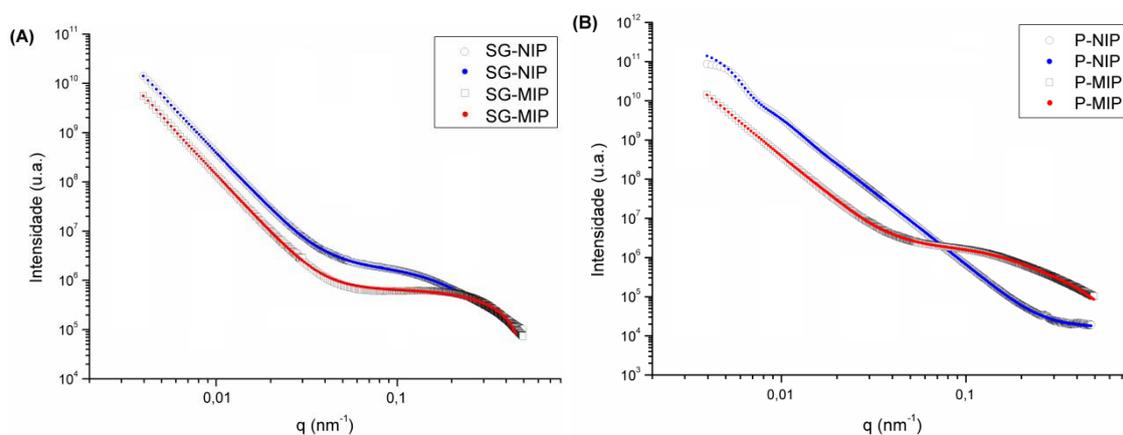


Figura 8. Curvas de SAXS dos materiais adsorventes, onde o símbolo (círculo) representa as intensidades originais de cada amostra, já as linhas sólidas representam a intensidade obtida através do modelo unificado: azul para os materiais NIP e vermelho para os materiais molecularmente impressos (MIP). (a) SG (b) P.

Após realizar o ajuste unificado nas curvas de SAXS, presentes na Figura 8, é possível apontar que as estruturas são organizadas em estruturas multi-escala, na maioria dos casos, divididas em duas regiões: (i) nível 1, onde

$q > 0,2$ nm, região de alto ângulo, fornecendo dados referentes às partículas primárias, através do raio de giro (R_{g1}) – corresponde à região de Porod, com a Lei de Potência igual a 4,0, indicando que as partículas secundárias são esferas de núcleo denso e superfície uniforme; (ii) nível 2, relacionado ao denominado médio ângulo, que reflete o fator de estruturas⁸ das partículas – denominada região de Guinier ($0,015 < q < 0,04$ nm), associada ao raio da partícula (R_{G2}) que é estimado pela Equação (4) e pela Lei de Potências (q^{-P2}); e apenas um dos materiais (P-NIP) o (iii) nível 3, região onde $q < 0,009$ nm, de baixo ângulo, corresponde aos *clusters* resultantes da agregação das partículas primárias – onde a Lei de Potência (q^{-P3}) é utilizada para determinar as informações destes aglomerados. Observou-se que quando o fármaco foi adicionado ao material, houve alterações significativas nos valores de R_{g1} e P_2 . A Tabela 7 apresenta os dados de raio de giro e de partícula extraídos das curvas de espalhamento.

Tabela 7. Resultado dos raios de giro (R_{g1} e R_{g2}), raios de partícula (R_{p1} e R_{p2}) e os expoentes da lei de potência para o segundo e terceiro níveis.

Amostra	Nível 1		Nível 2		Nível 3	
	R_{g1} (nm)	R_{p1} (nm)	R_{g2} (nm)	R_{p2} (nm)	P	P
SG-NIP	9,422	12,16	121	156,34	3,6	-
SG-MIP	3,651	4,71	689	889,89	3,9	-
P-NIP	6,170	7,97	673	868,46	3,6	3,4
P-MIP	2,094	2,70	250	322,75	3,5	-

Conforme a Tabela 7, os valores de R_{g1} variaram de 2,094 a 9,422 nm. Os valores correspondentes ao R_{G2} , que corresponde às estruturas das partículas, variaram entre 121 e 689 nm. Nesse caso, o material que

⁸ O fator de estrutura descreve o modo pelo qual um raio incidente é espalhado pelos átomos da célula unitária de um cristal, levando em conta os diferentes fatores de espalhamento. Como os átomos estão espacialmente distribuídos na célula unitária, existirá uma diferença de fase quando consideramos a amplitude de espalhamento de dois átomos diferentes. O fator de espalhamento depende do tipo de radiação considerada. Como elétrons interagem com a matéria através de diferentes processos em relação a, por exemplo, Raios-X, o fator de forma atômico difere de um caso para outro.

apresentou maior valor foi o SG-MIP com 689 nm. A curva inclinada, regida pela lei de potência (P^2), descreve a estrutura fractal na qual as partículas primárias se organizaram. Inclinações entre 1 e 3 representam fractais de massa, enquanto os valores entre 3 e 4 caracterizam os fractais da superfície. Em geral, quanto menor o número, menos denso (no caso dos fractais de massa) ou rugoso (no caso dos fractais de superfície) a estrutura é. Todos os materiais apresentaram uma estrutura fractal de superfícies, tanto para os materiais SG, quanto para os materiais P. Essa estrutura, com valores de índice superior a 3 e inferior a 4 ($3 < P < 4$), pode ser inferida em todos os materiais como estrutura de *clusters*. De modo geral, quanto menor o valor de P , menos densa e mais rugosa é a estrutura. As diferentes estruturas possíveis são ilustradas na Figura 9.

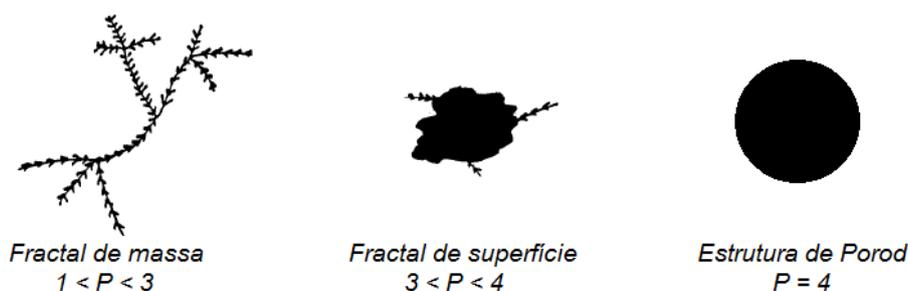


Figura 9. Estrutura das partículas segundo o valor de P . (adaptado de [65])

Para investigar a morfologia dos materiais MIPs e NIPs, os mesmos foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 10a e Figura 10b ilustra as imagens dos materiais SG e SG-MIP com aumento de 5.000 vezes, respectivamente, enquanto que a Figura 10c e Figura 10d ilustra para os materiais P e P-MIP. Quando analisados, os materiais sol-géis, obtidos pela rota sol-gel catalisada por ácido, revelam uma tendência de formar grandes aglomerados homogêneos. Quando submetido à etapa de extração, o material passou a apresentar uma estrutura mais laminar com cavidades na sua superfície.

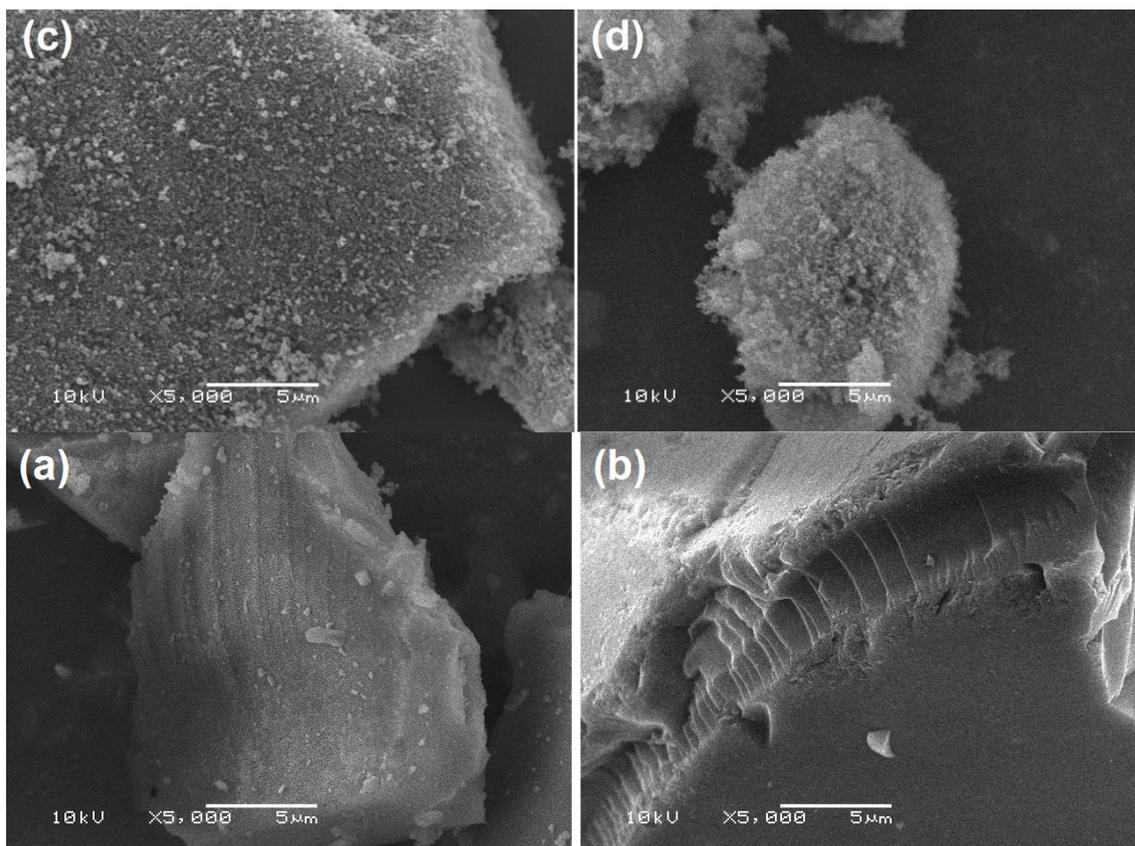


Figura 10. Microscopia MEV do material (a) SG-NIP e (b) SG-MIP.

A fim de visualizar a presença e/ou ausência de gentamicina nas amostras de SG e P antes e depois das etapas de extração foi realizada microscopia confocal de varredura a *laser*. Essa análise foi feita com a intenção de se obter uma resposta visual da eficácia do processo de remoção do fármaco.

Na Figura 11 são apresentadas imagens tanto dos materiais brancos, quanto dos materiais com gentamicina e dos MIPs. Esta técnica utiliza um laser capaz de excitar, caso o analito seja fluorescente, em comprimentos de onda específicos e o aparelho detecta, então, os fótons emitidos pela amostra em um comprimento de onda maior. O material SG-NIP não apresenta nenhum grupo fluoróforo capaz de ser excitado e apresentar fluorescência (Figura 11a). Diferentemente, para o material SG-Gen, em que há a presença de gentamicina, a mesma, apesar de apresentar poucos grupos capazes de serem excitados, quando excitada em 510 nm acaba emitindo na faixa do verde (Figura 11b). Sua remoção é completa e isso pode ser comprovado pela

ausência de sinal de fluorescência no material SG-MIP (Figura 11c), comportamento similar ao observado no SG-NIP.

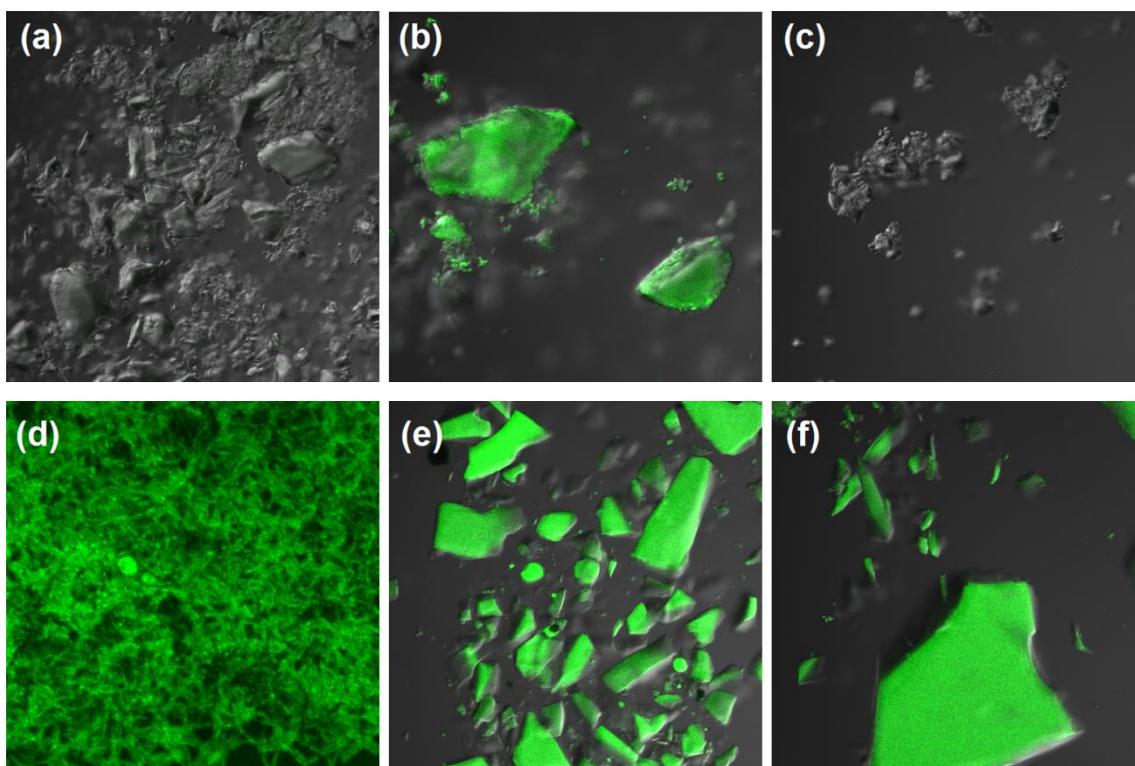


Figura 11. Imagens obtidas através da microscopia confocal de varredura à laser. (a) SG-NIP (b) SG-Gen (c) SG-MIP (d) P-NIP (e) P-Gen (f) P-MIP.

Nas Figura 11d-f o mesmo comportamento do material sol-gel não é observado. O material P-NIP, quando excitado em 510 nm também emite na faixa do verde, assim como a gentamicina. O que podemos observar é uma estrutura mais filamentosa do material P-NIP em contraste aos outros dois materiais (P-Gen e P-MIP), que se mostram mais densos. Na Figura 11f também é possível confirmar a incompleta extração da gentamicina do polímero orgânico devido ao fato das imagens de P-Gen e P-MIP apresentarem o mesmo comportamento. Podem ser razões para esse comportamento o uso de água como solvente extrator, visto que materiais molecularmente impressos com matrizes orgânicas não se comportam bem frente a esse solvente. Outra razão seria o próprio método extrator. O uso do processador ultrassônico aliado ao solvente aquoso pode ter colaborado para o inchamento dos poros do material MIP, impedindo a extração completa da gentamicina.

5.3. ESTUDO DE ADSORÇÃO

Tendo feito as análises de caracterização estrutural, textural e morfológica, os materiais foram encaminhados para os testes de adsorção. Os resultados obtidos para os estudos de adsorção foram avaliados em termos cinéticos pelos modelos de pseudo primeira ordem (PPO) e pseudo segunda ordem (PSO). As isotermas de adsorção foram estudadas pelos modelos de Langmuir, Freundlich e BET modificado⁹.

Nas Figura 12 estão apresentados os gráficos correspondentes dos modelos cinéticos de pseudo primeira ordem e pseudo segunda ordem, escolhidos para análises cinéticas dos processos de adsorção. Os gráficos de q_t em função do tempo indicam que para todos os materiais, as quantidades adsorvidas aumentam com o tempo até alcançarem o estado de equilíbrio, sendo este o estado de máxima capacidade de adsorção, tendo em vista um tempo já pré-estabelecido (300 min).

⁹ O uso direto da equação BET clássica (que foi desenvolvida para adsorção em fase gasosa) à adsorção em fase líquida leva a resultados ambíguos e errôneos. Assim, uma forma adequada da equação BET para adsorção em fase líquida foi desenvolvida, chamada BET modificado.

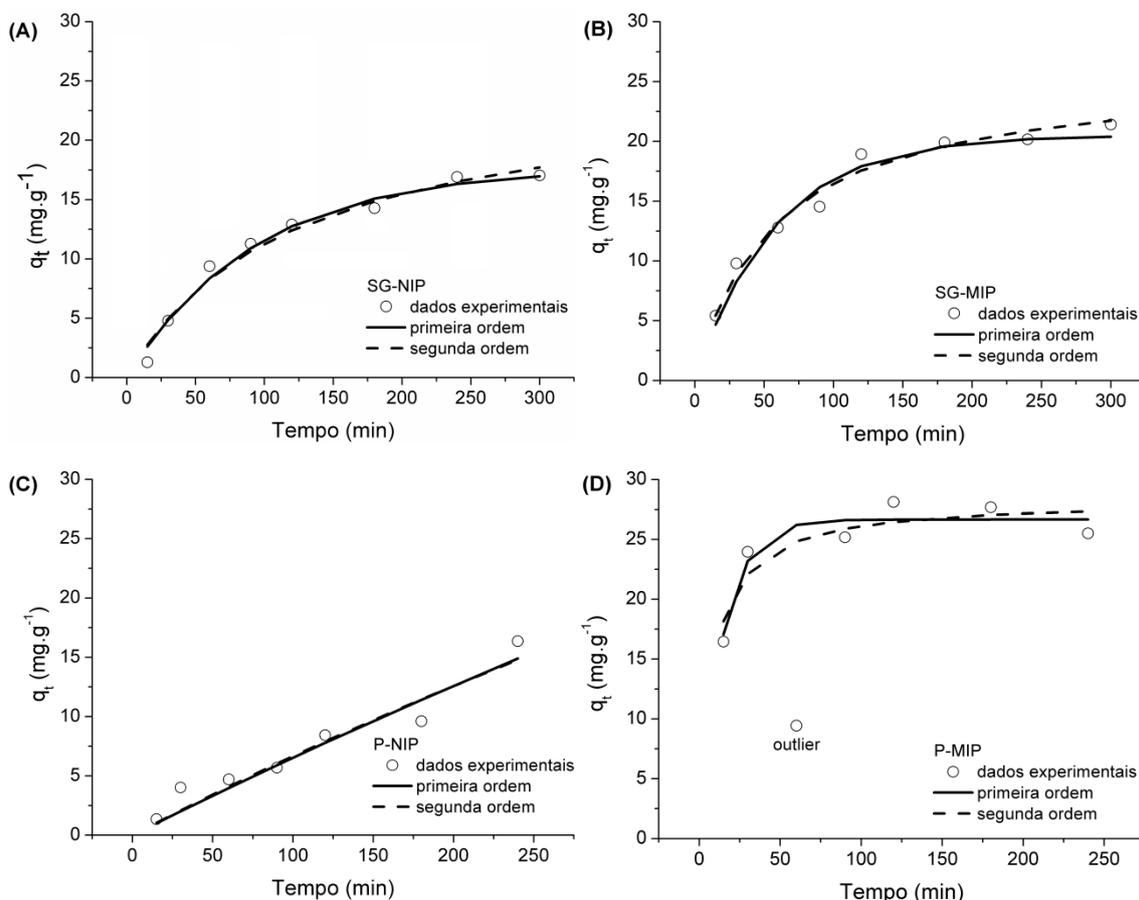


Figura 12. Gráficos dos modelos de PPO e PSO obtidos do estudo cinético dos MIPS sintetizados. (A) SG-NIP, (B) SG-MIP, (C) P-NIP e (D) P-MIP.

Observa-se, ao analisar os gráficos da Figura 12 para PPO e PSO, que para os materiais sol-gel, tanto para o branco quanto para o MIP, a taxa de adsorção aumenta nos primeiros minutos. Aos 90 min, as quantidades de gentamicina adsorvida são de 12 e 15 mg g⁻¹ para SG e SG-MIP, respectivamente, sendo logo alcançado valores máximos de adsorção. Para os materiais poliméricos um comportamento diferente é observado, principalmente no material branco, que passado o tempo pré-estabelecido ainda não alcançou um valor máximo de saturação para gentamicina, apresentando um perfil linearmente crescente de adsorção do fármaco, enquanto que o material P-MIP alcança muito rapidamente o equilíbrio, adsorvendo 25 mg g⁻¹ nos primeiros 30 min.

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentados os parâmetros determinados para cada modelo não linear obtido para todos os materiais estudados.

Tabela 8. Parâmetros estimados de primeira ordem.

	Parâmetro				
	1ª ordem				
	q_e	k_f	r^2	v_{exp}^2	C
SG-NIP	17,6975 (±1,6489)	0,0106 (±0,0025)	0,9818	0,6713	$\begin{bmatrix} 1 & -0.8655 \\ -0.8655 & 1 \end{bmatrix}$
SG-MIP	20,5095 (±1,4855)	0,0172 (±0,0040)	0,9663	1,2933	$\begin{bmatrix} 1 & -0.7395 \\ -0.7395 & 1 \end{bmatrix}$
P-NIP	90,0776 (±544,8363)	7,4663 (±48)×10 ⁻⁴	0,9267	2,1126	$\begin{bmatrix} 1 & -0.9997 \\ -0.9997 & 1 \end{bmatrix}$
P-MIP	26,6649 (±1,4536)	0,0681 (±0,0186)	0,9165	1,8753	$\begin{bmatrix} 1 & -0.4674 \\ -0.4674 & 1 \end{bmatrix}$

Tabela 9. Parâmetros estimados de segunda ordem.

	Parâmetro				
	2ª ordem				
	q_e	k_f	r^2	v_{exp}^2	C
SG-NIP	24,7460 (±4,1895)	3,3880 (±1,8867)×10 ⁻⁴	0,977	0,8482	$\begin{bmatrix} 1 & -0.9760 \\ -0.9760 & 1 \end{bmatrix}$
SG-MIP	25,7898 (±2,3121)	6,8955 (±2,5348)×10 ⁻⁴	0,9772	0,8734	$\begin{bmatrix} 1 & -0.9407 \\ -0.9407 & 1 \end{bmatrix}$
P-NIP	114,5776 (±457,5063)	5,3899 (±45,482)×10 ⁻⁶	0,9271	2,0996	$\begin{bmatrix} 1 & -0.9998 \\ -0.9998 & 1 \end{bmatrix}$
P-MIP	28,3029 (±2,6689)	0,0042 (±0,0031)	0,8513	3,3405	$\begin{bmatrix} 1 & -0.7886 \\ -0.7886 & 1 \end{bmatrix}$

O tempo definido no estudo cinético de adsorção possibilita uma otimização para trabalhos futuros, pois permite aperfeiçoar e estabelecer tempos exatos de contato do adsorvente com o adsorvato.

Para as isotermas de adsorção, através da Figura 13, é possível observar uma elevação na quantidade de gentamicina adsorvida de 77,38 e 24,94 mg g⁻¹ para os materiais SG-MIP e P-MIP, respectivamente. Através desses resultados é possível observar que o reconhecimento específico mais notável é sem dúvida no material SG-MIP com uma capacidade de adsorção (q_e) três vezes maior que o material P-MIP, o que considera o primeiro um ótimo material adsorvente para gentamicina.

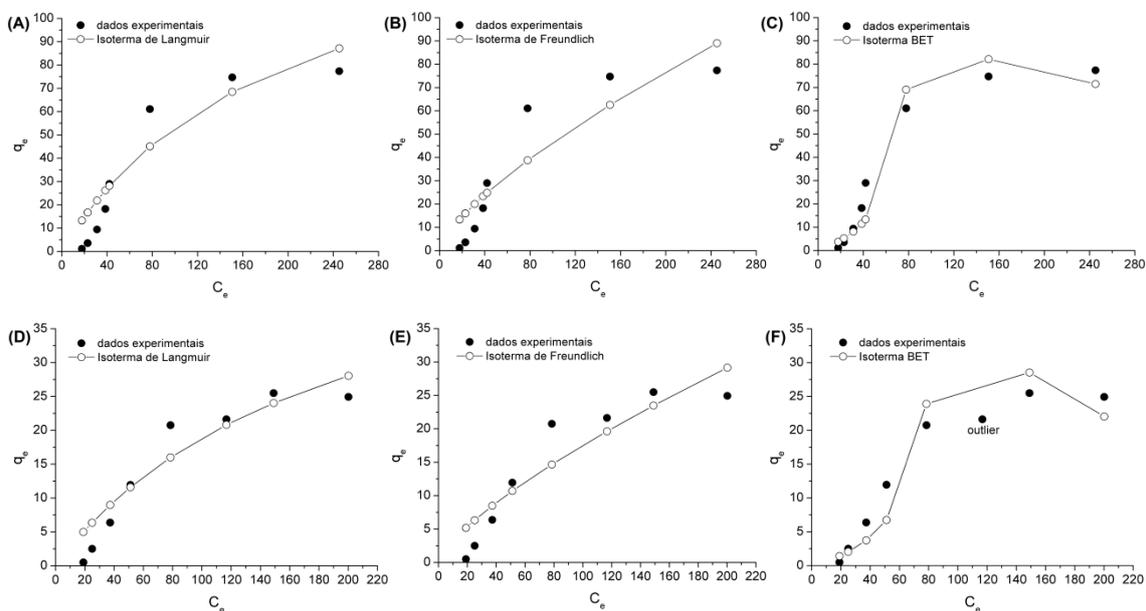


Figura 13. Gráfico dos modelos de Langmuir, Freundlich e BET modificado para SG-MIP em (A), (B) e (C) e para P-MIP em (D), (E) e (F), respectivamente.

Nas Tabelas 10, 11 e 12 são apresentados os valores dos parâmetros determinados pelos modelos usados para cada um dos sistemas de adsorção. Os valores de correlação r^2 0.9474 e 0.9065 para o SG-MIP e para o P-MIP, respectivamente, indicam o melhor ajuste ao modelo de BET modificado. A partir dessas isotermas é possível inferir sobre a capacidade de adsorção dos materiais.

Tabela 10. Parâmetros estimados para a isoterma de Langmuir.

Parâmetro		SG-MIP	P-MIP
Langmuir	q_m	153.9496 (± 142.4298)	54.6530 (± 53.8636)
	k_a	0.0053 (± 0.0085)	0.0053 (± 0.0086)
	r^2	0.8703	0.8950
	v_{exp}^2	154.6179	12.8097
	C	$\begin{bmatrix} 1 & -0.9672 \\ -0.9672 & 1 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & -0.9829 \\ -0.9829 & 1 \end{bmatrix}$

Tabela 11. Parâmetros estimados para a isoterma de Freundlich.

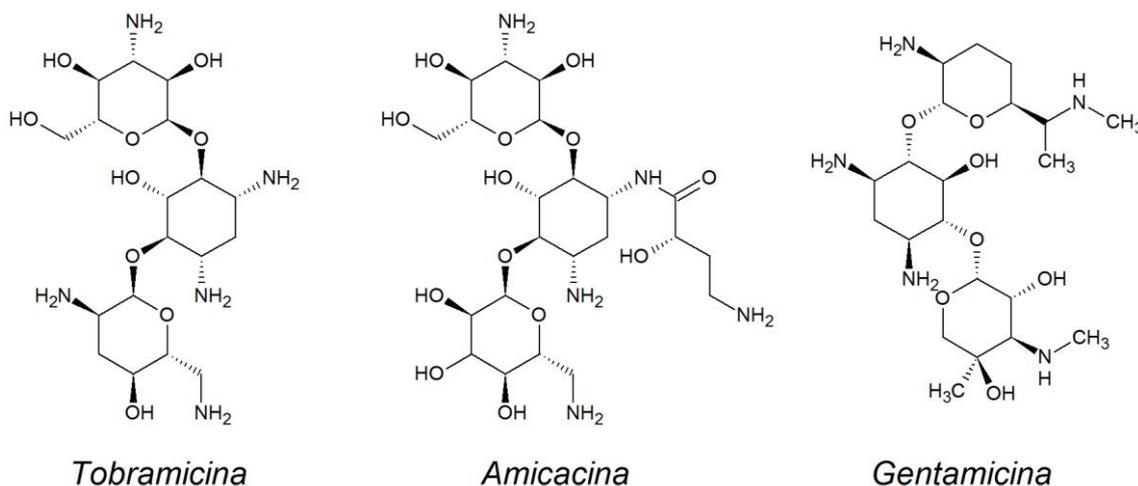
Parâmetro		SG-MIP	P-MIP
Freundlich	K	145	125
	k_f	1.7087 (± 0.4745)	0.5497 (± 0.1377)
	$(1/n)$	0.7230 (± 0.4029)	0.7337 (± 0.4666)
	r^2	0.8259	0.8364
	v_{exp}^2	207.5367	19.9571
	C	$\begin{bmatrix} 1 & 0.0402 \\ 0.0402 & 1 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 0.0539 \\ 0.0539 & 1 \end{bmatrix}$

Tabela 12. Parâmetros estimados para a isoterma de BET Modificado.

Parâmetro		SG-MIP	P-MIP
BET modificado	y_1	20.6249 (± 15.0876)	7.7432 (± 10.1140)
	y_2	0.7250 (± 0.0620)	0.7726 (± 0.3617)
	y_3	100.9993 (± 19.7173)	102.3049 (± 35.5593)
	r^2	0.9474	0.9065
	v_{exp}^2	75.2929	15.6534
	C	$\begin{bmatrix} 1 & 0.6915 & 0.9674 \\ 0.6915 & 1 & 0.5706 \\ 0.9674 & 0.5706 & 1 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 0.8952 & 0.9823 \\ 0.8952 & 1 & 0.8485 \\ 0.9823 & 0.8485 & 1 \end{bmatrix}$

5.3.1. Estudo comparativo de fármacos

Para o estudo comparativo de fármacos foram utilizados dois fármacos semelhantes à gentamicina (tobramicina e amicacina). Suas estruturas estão demonstradas no Esquema 10.



Esquema 10. Estruturas dos fármacos utilizados para o teste de seletividade.

O gráfico correspondente ao estudo de adsorção seletiva é mostrado na Figura 14, no qual a capacidade de adsorção desenvolvida nos MIPs com a gentamicina de SG-MIP e P-MIP de 22,80 e 14,61 mg g⁻¹, respectivamente, em comparação com a adsorção da Tobramicina e da Amicacina traçados na Tabela 13.

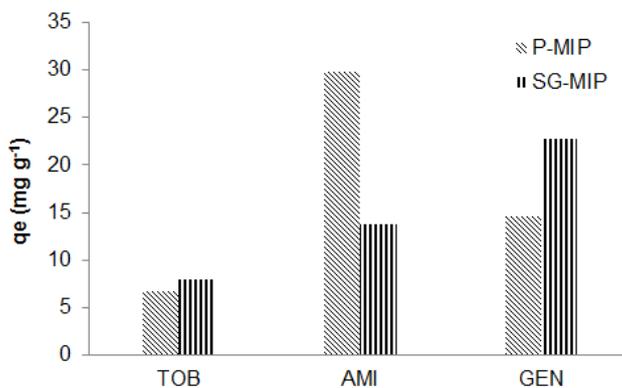


Figura 14. Gráfico do estudo de seletividade de adsorção dos MIPs em relação à gentamicina e seus análogos. Onde TOB = tobramicina; AMI = amicacina e GEN = gentamicina.

Nota-se que houve uma baixa adsorção em ambos os materiais para a Tobramicina, enquanto que para os outros dois fármacos ocorreu comportamento distinto entre os materiais: enquanto o P-MIP se mostrou mais seletivo para Amicacina, o SG-MIP se mostrou mais seletivo para a Gentamicina, uma explicação para tal comportamento seja, talvez, a conformação de suas estruturas químicas, visto que todos os fármacos usados nesses estudos apresentavam os mesmos grupos funcionais.

Tabela 13. Capacidade de adsorção (q_e) dos materiais P-MIP e SG-MIP para cada um dos três fármacos avaliados no estudo de seletividade.

	q_e (mg g ⁻¹)		
	GEN	TOB	AMI
P-MIP	14.61	6.74	29.90
SG-MIP	22.80	7.99	13.88

6. CONCLUSÃO

O presente estudo destacou as características entre materiais distintos sendo o primeiro sintetizado a partir do monômero funcional de ácido metacrílico e o segundo um sol-gel, do qual foi utilizado TEOS como fonte de sílica. Dessa forma cada qual apresentou uma matriz diferente, orgânica e inorgânica, porém com a mesma proposta de uso: materiais seletivos sintetizados a partir de impressão molecular.

Para o material polimérico molecularmente impresso o que se observou foi um material com a presença de poucos microporos, no qual a incorporação da gentamicina durante o processo de síntese se manteve, na sua maioria, no núcleo do material. Além disso, a etapa de extração não se mostrou efetiva para esse material e provocou o inchamento do mesmo. Apesar do material não ter se mostrado um eficiente adsorvente para a molécula de gentamicina, seu desempenho quando utilizado uma molécula análoga (amicacina) se mostrou satisfatório.

O material sol-gel molecularmente impresso, diferentemente do material polimérico, demonstrou-se um adsorvente adequado para a molécula de gentamicina. Durante a etapa de síntese, através dos estudos de FTIR e ATR, observou-se que houve a incorporação do fármaco à rede de sílica e a etapa de extração para obtenção do MIP se mostrou efetiva, comprovada através da microscopia confocal.

Os resultados obtidos tanto dos estudos de adsorção quanto das análises de caracterização nos mostraram a importância de estudos que avaliem e compare o desempenho de materiais molecularmente impressos frente uma molécula específica, principalmente aliada ao uso futuro como MISPE.

O tempo de equilíbrio na adsorção da gentamicina pelos materiais impressos foi de 90 minutos para o material SG-MIP, enquanto que para o material P-MIP foi de 30 min, tendo esse último alcançado um valor máximo de adsorção do fármaco de 25 mg g⁻¹, superior as 15 mg g⁻¹ adsorvidas pelo

material sol-gel. No entanto, ao avaliar as isotermas de adsorção o desempenho dos materiais se mostraram contrários ao teste anterior, nesse caso, observou-se um comportamento de reconhecimento frente à molécula de gentamicina mais específico para o material SG-MIP superior a três vezes ao material P-MIP.

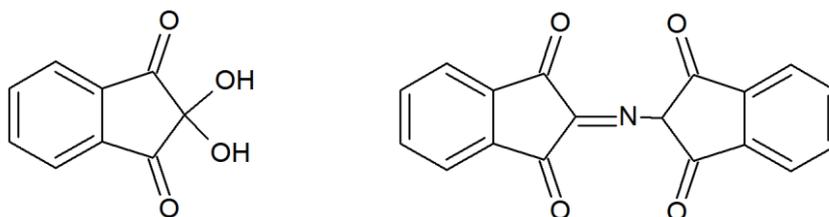
Para o estudo de comparação entre os fármacos, o material sol-gel se mostrou mais adequado para a gentamicina comparado aos outros dois fármacos, o polímero por sua vez, não se mostrou tão adequado para a gentamicina, apresentando uma maior atividade de adsorvente com a molécula do fármaco amicacina.

Por fim, o que foi possível notar é que ambos os materiais se mostraram adsorventes frente à molécula de gentamicina, porém com um desempenho superior do material SG-MIP. O material polimérico, porém, não se revelou um adsorvente ruim, apenas não específico para a molécula molde estudada, visto que a própria etapa de extração se mostrou mais efetiva com o material SG-MIP do que com o material P-MIP.

7. ANEXO

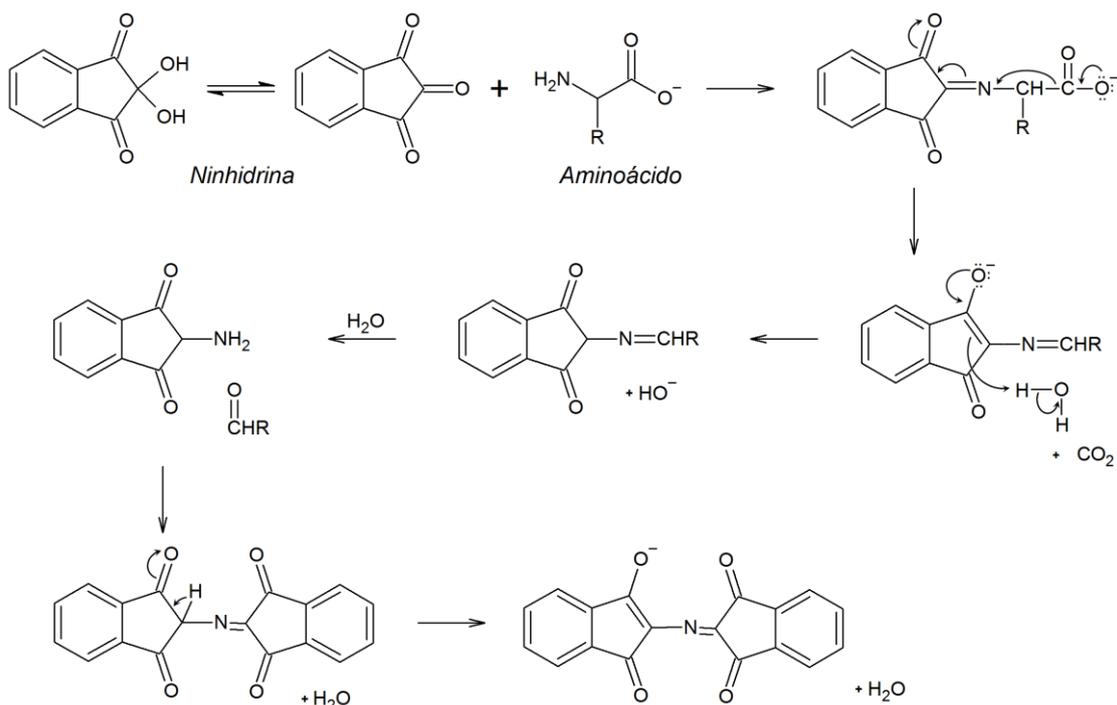
Reação colorimétrica aminoglicosídeo e ninhidrina

A ninhidrina (Esquema 11) é empregada para a determinação de grupos amino livres, ou seja, reage com aminas primárias e secundárias livres no meio formando um composto conhecido por Roxo de Ruhemann. [66] Esta reação acontece pelo fato da ninhidrina ser um forte agente oxidante e quando aquecido na presença de grupos amina forma esse composto corado. Seu uso é largamente empregado na identificação de aminoácidos e também serve na identificação de antibióticos aminoglicosídeos, como a própria gentamicina como descrito por Frutos *et al.*[67]

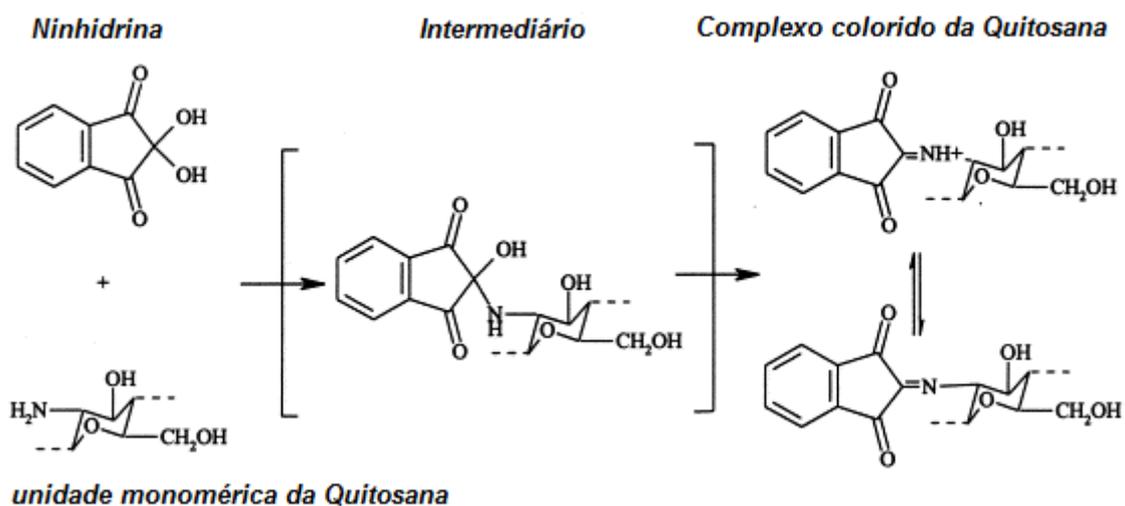


Esquema 11. Estrutura da ninhidrina a esquerda e do roxo de Ruhemann a direita.

A reação da ninhidrina na presença de aminas acontece conforme descrito no Esquema 12. Todo composto que apresenta na sua estrutura grupamentos amino livre produzem o composto Roxo de Ruhemann, no qual a intensidade é proporcional à concentração de espécies presentes (aminoácidos, peptídeos, proteínas ou aminoglicosídeos).



Esquema 12. Mecanismo de reação da ninhidrina com amina. [68]



Esquema 13. Representação esquemática da ninhidrina com quitosana (adaptado de Sabnis *et al.* [69]).

Outro esquema representativo da ninhidrina com aminas é demonstrado por Sabnis,[69] onde a reação da ninhidrina ocorre com quitosana (Esquema 13). A solução de ninhidrina assume uma forma colorida nessa reação e essa coloração é devida à presença da camada de valência livre ou pelo número

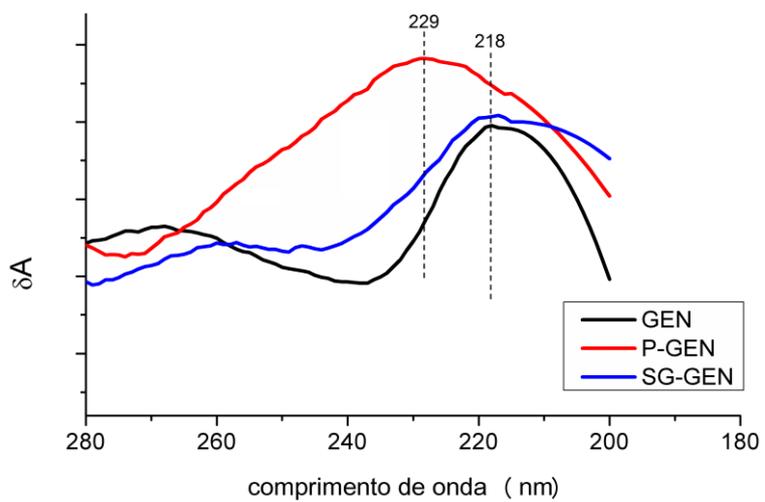
impares de elétrons (cromófagos)¹⁰ apresentando uma frequência baixa, o suficiente para absorver a luz do visível.

Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X – XPS

O XPS é uma técnica capaz de analisar a química da superfície de um material. Essa pode medir a composição elementar, fórmula empírica, o estado químico e o estado eletrônico dos elementos dentro do mesmo. Os espectros de XPS são obtidos por irradiação em uma superfície sólida por um feixe de raios X, medindo simultaneamente a energia cinética e os elétrons que são emitidos a partir da superfície do material. Um espectro de fotoelétrons é registrado pela contagem de elétrons ejetados em uma faixa de energias cinéticas eletrônicas. Picos aparecem no espectro de átomos emitindo elétrons com energia característica. Esta técnica vem sendo empregada para investigação e caracterização superficial de materiais, pois permite o cálculo da composição (porcentagem atômica) dos átomos da superfície (penetração média de 1-10 nm), podendo ainda fornecer informações a respeito de interações entre grupos funcionais. XPS é uma técnica de análise elementar que é única em fornecer informações sobre o estado químico dos elementos detectados.[70],[71]

¹⁰ Que se cora com dificuldade.

Espectros de Espectroscopia de Refletância Difusa – DRS UV-Vis



8. REFERÊNCIAS

- [1] B. Sellergren, "Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer," *Anal. Chem.*, vol. 66, no. November 1993, pp. 1578–1582, 1994.
- [2] D. A. Spivak, "Optimization , evaluation , and characterization of molecularly imprinted polymers B," vol. 57, pp. 1779–1794, 2005.
- [3] M. Polyakov, "Adsorption properties and structure of silica gel.," *Zhurnal Fizieskoj Khimii/Akademiya SSSR*, vol. 2, pp. 799–805, 1931.
- [4] G. Wulff and A. Sarhan, "On the use of enzyme-analogue-built polymers for racemic resolution," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 11, p. 341, 1972.
- [5] K. Mosbach, "Molecular imprinting " ~°~° ' II ~ I," no. January, 1994.
- [6] L. I. Andersson, "Molecular imprinting for drug bioanalysis A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay," vol. 739, pp. 163–173, 2000.
- [7] J. O. Mahony, K. Nolan, M. R. Smyth, and B. Mizaikoff, "Molecularly imprinted polymers — potential and challenges in analytical chemistry," vol. 534, pp. 31–39, 2005.
- [8] G. Vasapollo *et al.*, "Molecularly Imprinted Polymers : Present and Future Prospective," pp. 5908–5945, 2011.
- [9] E. Turiel, "Molecularly imprinted polymers-based microextraction techniques," *Trends Anal. Chem.*, vol. 118, pp. 574–586, 2019.
- [10] N. Idil and A. Denizli, "Molecularly imprinted poly (N -isopropylacrylamide) thermosensitive based cryogel for immunoglobulin G puri fi cation," vol. 80, no. January, pp. 181–189, 2019.
- [11] Z. Zhang, Y. Li, X. Zhang, and J. Liu, "Molecularly imprinted nanozymes with faster catalytic activity and better specificity," pp. 4854–4863, 2019.
- [12] L. Uzun and A. P. F. Turner, "Biosensors and Bioelectronics Molecularly-imprinted polymer sensors : realising their potential," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 76, pp. 131–144, 2016.
- [13] J. R. Choi, K. W. Yong, J. Y. Choi, and A. C. Cowie, "Progress in

- Molecularly Imprinted Polymers for Biomedical Applications,” vol. 1, no. 640, pp. 78–88, 2019.
- [14] P. Luli, “Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices : a way to application in modern pharmacotherapy . A review,” vol. 76, pp. 1344–1353, 2017.
- [15] A. Beltran, F. Borrull, and R. M. Marce, “Molecularly-imprinted polymers : useful sorbents for selective extractions,” vol. 29, no. 11, 2010.
- [16] B. Sellergren and A. M. Esteban, “The Use of Molecularly Imprinted Polymers for Sampling and Sample Preparation,” in *Handbook of Sample Preparation*, J. Pawliszyn and H. L. Lord, Eds. 2010, pp. 445–473.
- [17] E. C. C. Goh and H. D. H. Sto, “Cross-Linked Poly (methacrylic acid- co - poly (ethylene oxide) methyl ether methacrylate) Microspheres and Microgels Prepared by Precipitation Polymerization : A Morphology Study,” pp. 9983–9989, 2002.
- [18] L. Ye, P. A. G. Cormack, and K. Mosbach, “Molecular imprinting on microgel spheres,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 435, no. July 2000, pp. 187–196, 2001.
- [19] K. Yoshimatsu, K. Reimhult, A. Krozer, K. Mosbach, K. Sode, and L. Ye, “Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization : The control of particle size suitable for different analytical applications,” vol. 584, pp. 112–121, 2007.
- [20] J. Wang, P. A. G. Cormack, D. C. Sherrington, and E. Khoshdel, “Monodisperse, Molecularly Imprinted Polymer Microspheres Prepared by Precipitation Polymerization for Affinity Separation Applications**,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 42, no. 43, pp. 5336–5338, 2003.
- [21] J. Wackerlig and P. A. Lieberzeit, “Sensors and Actuators B : Chemical Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing – Synthesis , characterisation and application,” *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 207, pp. 144–157, 2015.
- [22] H. Jiang, H. Chen, Y. Liang, and X. Liu, “Preparation of monodisperse poly (St-co-PETEA) microspheres by precipitation polymerization using ethanol as solvent,” no. October 2009, 2011.
- [23] S. Pardeshi and S. Kumar, “RSC Advances Precipitation polymerization :

- a versatile tool for preparing molecularly imprinted polymer beads for chromatography applications,” *RSC Adv.*, vol. 6, pp. 23525–23536, 2016.
- [24] M. T. Gokmen and F. E. Du Prez, “Progress in Polymer Science Porous polymer particles — A comprehensive guide to synthesis , characterization , functionalization and applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 3, pp. 365–405, 2012.
- [25] C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-esteban, C. Pérez-conde, and C. Cámara, “Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 802, pp. 347–353, 2004.
- [26] S. R. de Medeiros, “Carta Insumos - Antibióticos na produção animal: Restrições à vista?,” 2018. [Online]. Available: <https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/cartas/49629/carta-insumos---antibioticos-na-producao-animal:-restricoes-a-vista>.
- [27] A. Mrozik and Z. Piotrowska-seget, “Antibiotics in the Soil Environment — Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity,” vol. 10, no. March, 2019.
- [28] G. Strip, “Toxicity of Amoxicillin and Erythromycin to Fish and Mosquitoes,” no. 2014, pp. 13–21, 2015.
- [29] M. Danner, A. Robertson, V. Behrends, and J. Reiss, “Science of the Total Environment Antibiotic pollution in surface fresh waters : Occurrence and effects,” *Sci. Total Environ.*, vol. 664, pp. 793–804, 2019.
- [30] US Department of Health and Human Services - CDC, “Antibiotic resistance threats,” *Cent. Dis. Control Prev.*, pp. 22–50, 2013.
- [31] C. T. de Carvalho, R. M. Junior, and J. H. P. Américo-Pinheiro, “O uso indiscriminado de antibióticos e os impactos nos ambientes aquáticos,” *Periódico Eletrônico Fórum Ambient. da Alta Paul.*, vol. 12, no. 2, pp. 123–131, 2016.
- [32] D. M. Bila and M. Dezotti, “Fármacos en el ambiente,” *Quim. Nova*, vol. 26, no. 4, pp. 523–530, 2003.
- [33] O. E. Fagade, “Prevalence of multiple antibiotic resistance among bacterial isolates from selected poultry waste dumps in Southwestern,” pp. 713–719, 2009.

- [34] R. Gene, "Functional Metagenome Mining of Soil for a Novel Gentamicin Resistance Gene," vol. 26, no. 0, pp. 521–529, 2016.
- [35] K. Zeina, A. K. Pamela, and S. Fawwak, "Quantification of Antibiotic Residues and Determination of Antimicrobial Resistance Profiles of Microorganisms Isolated from Bovine Milk in Lebanon," vol. 2013, no. July, pp. 1–9, 2013.
- [36] Y. Liu, H. Chang, Z. Li, Y. Feng, D. Cheng, and J. Xue, "Biodegradation of gentamicin by bacterial consortia AMQD4 in synthetic medium and raw gentamicin sewage," *Sci. Rep.*, no. August, pp. 1–11, 2017.
- [37] M. Campos, "Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos," 2007.
- [38] J. Fischer and C. R. Ganellin, *Analogue-based Drug Discovery*. John Wiley & Sons, 2006.
- [39] WHO, "Essential Medicines List," no. November, 2015.
- [40] Y. Lv *et al.*, "Determination of Tetracyclines Residues in Egg , Milk , and Milk Powder by Online Coupling of A Precolumn Packed with Molecular Imprinted Hybrid Composite Materials to RP-HPLC-UV Determination of Tetracyclines Residues in Egg , Milk , and Milk Powder by O," *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 6076, pp. 1–7, 2015.
- [41] N. Li *et al.*, "Recent advances in facile synthesis and applications of covalent organic framework materials as superior adsorbents in sample pretreatment," *Trends Anal. Chem.*, vol. 108, pp. 154–166, 2018.
- [42] X. Chen *et al.*, "Rapid Determination of Sulfonamides in Chicken Muscle and Milk Using Efficient Graphene Oxide-Based Monolith On-Line Solid-Phase Extraction Coupled with Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry," pp. 271–281, 2019.
- [43] B. Hu, M. He, and B. Chen, "Nanometer-sized materials for solid-phase extraction of trace elements," pp. 2685–2710, 2015.
- [44] C. Calderilla, F. Maya, L. O. Leal, and V. Cerd, "Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction," vol. 108, pp. 370–380, 2018.
- [45] L. L. Vallo, R. T. Laxamana, F. U. Paredes, I. Harvey, J. Arellano, and S. D. Arco, "Harnessing non-covalent interactions in molecular traps for

- probable human carcinogen butylated hydroxyanisole," *Mater. Lett.*, vol. 159, pp. 317–320, 2015.
- [46] A. Guinier, G. Fournet, and C. B. Walker, "Small Angle Scattering of X-Rays SCATTERING OF X-RAYS," 1955.
- [47] A. Guinier, *X-Ray Diffraction by Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies*. San Francisco: Freeman, 1963.
- [48] G. Porod, *General Theory In: Small Angle X-Ray Scattering*. London: Academic Press, 1982.
- [49] J. Ilavsky and P. R. Jemian, "Irena: tool suite for modeling and analysis of small-angle scattering," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 42, pp. 347–353, 2009.
- [50] G. Beaucage, "Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 28, pp. 717–728, 1995.
- [51] G. Lindfield and J. Penny, *Numerical methods Using Matlab*, 3rd ed. London: Ellis Horwood, 2012.
- [52] D. M. Himmelblau, *Process Analysis by Statistical Methods*, 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1967.
- [53] N. B. Colthup, L. H. Daly, and S. E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed. Academic Press: New York, 1990.
- [54] T. T. Tanaka, S. N. Nagao, and H. O. Ogawa, "Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy of Functional Groups of Humic Acid Dissolving in Aqueous Solution," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 17, pp. 1081–1084, 2001.
- [55] X. Li and T. A. King, "Spectroscopic studies of sol-gel-derived organically modified silicates," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 204, pp. 235–242, 1996.
- [56] D. M. Krol and J. G. van Lierop, "THE DENSIFICATION OF MONOLITHIC GELS," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 63, pp. 131–144, 1984.
- [57] N. P. Company and S. Process, "given of the gelation and of the changes in subsequent treatment of materials that were used to prepare bulk specimens of silica and silica-titania glasses . The principal methods used to study the changes in the materials were infra-red spectroscopy , DT," vol. 48, pp. 129–152, 1982.
- [58] H. H. Mungondori, L. Tichagwa, D. M. Katwire, and O. Aoyi, "Preparation

- of photo-catalytic copolymer grafted asymmetric membranes (N-TiO₂-PMAA-g-PVDF/PAN) and their application on the degradation of bentazon in water,” *Iran. Polym. J. (English Ed.)*, vol. 25, no. 2, pp. 135–144, 2016.
- [59] R. Rajan, S. Varghese, and K. E. George, “Role of Coagents in Peroxide Vulcanization of Natural Rubber,” *Rubber Chem. Technol.*, vol. 86, no. 3, pp. 488–502, 2013.
- [60] B. S. Brunauer and P. H. Emmett, “in Multimolecular,” no. 1c, 1938.
- [61] S. D. Section and K. A. Publishers, “Catalysts and the structure of SiO₂ sol-gel films,” vol. 5, pp. 1835–1841, 2000.
- [62] B. Journal *et al.*, “ADSORPTION PROCESS OF MOLECULARLY IMPRINTED SILICA FOR EXTRACTION OF LACTOSE FROM MILK,” vol. 33, no. 02, pp. 361–372, 2016.
- [63] M. Ghasemnejad, E. Ahmadi, Z. Mohamadnia, A. Doustgani, and S. Hashemikia, “Functionalized silica nanoparticles as a carrier for Betamethasone Sodium Phosphate : Drug release study and statistical optimization of drug loading by response surface method,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 56, pp. 223–232, 2015.
- [64] D. I. Svergun and M. H. J. Koch, “Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution,” vol. 66, pp. 1735–1782, 2003.
- [65] L. L. Hench and J. O. N. K. West, “The Sol-Gel Process,” *Chem. Rev.*, vol. 90, pp. 33–72, 1990.
- [66] S. Ruhemann, “Triketohydrindene hydrate,” *J. Chem. Soc.*, vol. 97, pp. 2025–2031, 1910.
- [67] P. Frutos, S. Torrado, M. E. Perez-Lorenzo, and G. Frutos, “A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 21, no. 6, pp. 1149–1159, 2000.
- [68] P. Y. Bruice, *Química Orgânica Vol II*, 4th ed. São Paulo: Ed. Pearson Prentice Hall, 2006.
- [69] S. Sabnis and L. H. Block, “Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems I . Molecular modifications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 27, pp. 181–186, 2000.
- [70] H. Konno, *Chapter 8 - X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Tsinghua University Press Limited, 2016.

- [71] R. W. Welker, *Size Analysis and Identification of Particles*, vol. 4. Elsevier, 2012.
- [72] A. R. M. de Oliveira, I. R. dos S. Magalhães, F. J. M. de Santana, and P. S. Bonato, "MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA (LPME): FUNDAMENTOS DA TÉCNICA E APLICAÇÕES NA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS," *Quim. Nov.*, vol. 31, no. 3, pp. 637–644, 2008.
- [73] P. Popp, C. Bauer, and L. Wennrich, "Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples," *Anal. Chim. Acta*, vol. 436, pp. 1–9, 2001.
- [74] K. Kocot, B. Zawisza, E. Margu, I. Queralt, M. Hidalgo, and R. Sitko, "Dispersive micro solid-phase extraction using multiwalled carbon nanotubes combined with portable total-reflection X-ray fluorescence spectrometry for the determination of trace amounts of Pb and Cd in water samples," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 28, pp. 736–742, 2013.