

BRUNA BERGAMIN

POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS HÍBRIDOS PARA SUBSTÂNCIAS
ESTROGÊNICAS VISANDO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA
APLICAÇÃO NA ÁREA BIOTECNOLÓGICA.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Araraquara-SP
2017

BRUNA BERGAMIN

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em biotecnologia.

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

B493p Bergamin, Bruna
Polímeros biomiméticos híbridos para substâncias estrogênicas visando desenvolvimento de sensores para aplicação na área biotecnológica / Bruna Bergamin. – Araraquara : [s.n.], 2017
86 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Maria del Pilar Taboada Sotomayor

1. Estrogênios. 2. Polímeros impressos.
3. Nanopartículas. 4. Hormônios. 5. Síntese. I. Título.

BRUNA BERGAMIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 06 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Luis Francisco Moreira Gonçalves
Faculdade de Ciências – Universidade do Porto, Portugal



Profª Drª Débora Gonçalves
Instituto de Física – USP, São Carlos - SP

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Bruna Bergamin

Nascimento: 04/10/1989

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Araraquara-Brasil

Estado Civil: Casada

Filiação: Ovídio Bergamin e Maria José Pereira Bergamin

Endereço: Rua Treze de maio nº: 350, Bairro Centro, CEP 14920-000, Nova Europa/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação: Licenciatura em Química – *Universidade Estadual Paulista-Instituto de Química, Araraquara – SP. Período: 03/2008 a 12/2014.*

2.2 Pós-graduação: Mestrado em Biotecnologia - *Universidade Estadual Paulista-Instituto de Química, Araraquara – SP. Período: 05/2015 a 04/2017.*

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Participação em seminário técnico

Bruna Bergamin. “Seminário técnico de cromatografia: HPLC - GC - Preparação de amostra”. FCF - UNESP, Araraquara - SP, 25 de novembro de 2015.

Dedico essa dissertação a minha mãe Zezé ao meu pai que se estivesse entre nós com certeza estaria orgulhoso e ao meu marido Fabiano por todo apoio e amor incondicional, por toda dedicação e por me ajudar a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me dar força e coragem para continuar.

A Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, pela orientação, pela confiança para realização do meu trabalho, compreensão, pelo apoio, pelas discussões e broncas que com certeza foram para meu crescimento profissional e principalmente por sua paciência.

Ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP) pela oportunidade.

Ao Grupo de Eletroanalítica de Araraquara (GEAr); principalmente ao pessoal da salinha: Rafael Rovatti Pupin pela colaboração no trabalho, Marcos Vinícius Foguel por ajudar com minhas dúvidas e pelos puxões de orelha, Lucas Moreira Silva, Juliana Ferreira Brito, Mariele Mucio Pedroso, Fernanda Rodrigues, Pedro Henrique Pradella Chimello e Sabir Khan.

A minha mãe Zezé por sempre me mostrar o caminho certo e me apoiar em todas as decisões e em todos os momentos.

A toda minha família: tios, primos, avós e aos meus amigos que sempre me deram coragem para chegar até aqui.

Ao Fabiano Fernando da Silva pelo companheirismo, paciência e amor.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior CAPES pela bolsa concedida.

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

(Chico Xavier)

RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande importância para uma melhor qualidade na determinação de espécies químicas, aumentando assim a confiabilidade dos resultados obtidos. Com isso, o emprego e otimização das etapas de separação/concentração se faz necessário. O emprego de polímeros molecularmente impressos (do inglês - "Molecularly Imprinted Polymers" - MIP) tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta analítica com grande potencialidade para minimizar as limitações das técnicas de separação/concentração tradicionalmente empregadas. No caso deste trabalho, o *template* utilizado será o valerato de estradiol, principalmente pela sua importância inerente na reposição hormonal feminina e por se tratar de um disruptor endócrino (hormônio) lançado ao meio ambiente sem nenhum controle. Assim a síntese do polímero para identificação do valerato de estradiol foi realizada por diferentes rotas (*bulk* e precipitação) através de duas vias de polimerização (termopolimerização e fotopolimerização) variando o monômero funcional (MAA, acrilonitrila, 2-vinil-piridina e 1-vinilimidazol). O MIP e NIP foram colocados, um de cada vez, em sistema soxhlet contendo metanol/ácido acético na proporção 70/30 a 60° C, para remoção da molécula impressa, através de cinco lavagens sucessivas em períodos de 24 h. Essas águas de lavagem foram analisadas utilizando espectrofotometria UV/Vis. Posteriormente com os parâmetros otimizados o polímero que apresentou melhor resultado foi modificado com nanopartículas magnéticas (core@shell), sendo assim sintetizado MIP magnético (MMIP) para valerato de estradiol, usando ácido metacrílico (MF) e TRIM (ME); aumentando o reconhecimento do MIP e, além de, facilitar a separação do material da solução pela aplicação de um campo magnético externo. Todos os materiais sintetizados foram amplamente caracterizados, física e físico-quimicamente. O material sintetizado apresentou um excelente magnetismo (2,0 emu g⁻¹), uma alta porcentagem de retenção (superior a 80%) e um Q_{máx} acima de 24 mg g⁻¹, indicando que é promissor para adsorção de valerato de estradiol.

Palavras-chave: Estrogênios. Polímeros impressos. Nanopartículas. Hormônios.

ABSTRACT

The development of selective and sensitive analytical methods has significant importance for an improvement at determination of chemical species; increasing the reliability of the results obtained. So, the use and optimization of separation and concentration steps is necessary. The use of Molecularly Imprinted Polymers (MIP) has been shown to be an efficient analytical tool with great potential to minimize the limitations of separation/concentration techniques traditionally employed. In the case of this study, the template used will be estradiol valerate, once of its inherent importance in female hormone replacement and because it is an endocrine disruptor (hormone) released into the environment without any control. Thus, the synthesis of the polymer for the identification of estradiol valerate was performed by different routes (bulk and precipitation) through two polymerization techniques (thermopolymerization and photopolymerization) by varying the functional monomer (MAA, acrylonitrile, 2-vinyl pyridine and 1-vinylimidazole). MIP and NIP were placed in a soxhlet system containing 70/30 methanol/acetic acid at 60 ° C for removal of the imprinted molecule through five successive washes in 24 h periods. These wash waters were analyzed using UV/Vis spectrophotometry. Subsequently, with the optimized parameters, the polymer that presented the best result was modified with magnetic nanoparticles (core@shell); being synthesized magnetic MIP (MMIP) for estradiol valerate, increasing the recognition of the MIP and, furthermore, facilitating the separation of the material from the solution by the application of an external magnetic field. It was used methacrylic acid as functional monomer, TRIM as structural monomer and all the synthesized materials were widely characterized, physically and physico-chemically. The synthesized material showed excellent magnetism (2.0 emu g^{-1}), an elevate percentage retention (higher than 80%) and a Q_{max} above 24 mg g^{-1} , indicating that MMIP is a promising material for adsorption of estradiol valerate.

Keywords: Estrogens. Printed polymers. Nanoparticles. Hormones. Syntheses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do núcleo ciclopentano – fenantreno.	21
Figura 2 - Estruturas moleculares (a) estrona; (b) estriol; (c) 17 β –estradiol; (d) 17 α –estradiol; (e) etinilestradiol; (f) valerato de estradiol.	22
Figura 3 - Esquema genérico da síntese e utilização de MIP.	25
Figura 4 - Esquema da síntese do MIP por polimerização UV.	35
Figura 5 - Síntese e modificação da magnetita.	36
Figura 6 – Foto ilustrativa do esquema de síntese por fotopolimerização.	37
Figura 7 - Valores de energia de ligação entre o VE com os 20 monômeros tabelados.	40
Figura 8 - Estrutura molecular dos três monômeros escolhidos para síntese do MIP para VE: (a) MP8; (b) MP12 e (c) MP17.	40
Figura 9 - Duas diferentes propostas de interação (destacadas em vermelho) entre ácido metacrílico e VE: (a) interação entre grupo hidroxila do VE e carbonila e hidrogênio do ácido metacrílico e (b) interação entre hidrogênio ácido e carbonila do VE.....	41
Figura 10 - Espectros de absorção na região UV-VIS para soluções com diferentes concentrações do hormônio valerato de estradiol dissolvido em metanol.	42
Figura 11 - Curvas analíticas para o VE nos dois comprimentos de onda: a) 285 nm e b) 225 nm.	43
Figura 12 – Cromatograma obtido para o VE a 50 mg L ⁻¹ (a) para quantificação do analito por CLAE e (b) curva analítica em intervalo de concentrações de 20 a 700 μ mol L ⁻¹ e em acetonitrila/água 70/30 v/v. Dados obtidos a λ = 280 nm. ..	44
Figura 13 - Espectros de absorção na região ultravioleta para as soluções de limpeza do MIP (a) e do NIP (b) utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).	46
Figura 14 - Espectros no FTIR para o valerato de estradiol.	47
Figura 15 - Espectros no FTIR para o ácido metacrílico.	48
Figura 16 - Espectros no FTIR para o TRIM.	49
Figura 17 - Espectros no FTIR para o AIBN.	50
Figura 18 - Comparação entre as bandas de FTIR do MIP com o TRIM, usado como monômero estrutural.	51

Figura 19 - Comparação entre as bandas de FTIR do MIP com o ácido metacrílico, usado como monômero funcional.	52
Figura 20 - Comparação entre as bandas de FTIR do MIP com o ácido metacrílico, usado como monômero funcional.	52
Figura 21 - Espectros no FTIR para MIP e NIP convencionais (não magnético).	53
Figura 22 – Espectros no FTIR para MIP e NIP magnéticos utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).....	54
Figura 23 - Curvas de TG e DSC para as nanopartículas magnéticas.	55
Figura 24 - Curvas de TG e DSC para a segunda etapa da modificação das nanopartículas magnética com TEOS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$).	56
Figura 25 - Curvas de TG e DSC para a terceira etapa da modificação das nanopartículas magnética com MPS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$).	57
Figura 26 - Curvas de TG e DSC para a síntese do a) MIP e do b) NIP convencionais utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).....	58
Figura 27 - Curvas de TG e DSC para a síntese do a) MMIP e do b) MNIP utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).....	59
Figura 28 - Imagens de MEV-FEG com ampliação de 10.000X. a) magnetita; b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$; e c) ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$).....	61
Figura 29 - Imagens de MEV-FEG com ampliação de 25.000X. a) MIP convencional; b) NIP convencional; c) MIP magnético; d) NIP magnético; utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).....	62
Figura 30 – Nanopartícula na ausência e presença de campo magnético.....	63
Figura 31 - Curvas de histerese magnética para Fe_3O_4 magnetita; $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$; $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MPS}$, MMIP e MNIP.	64
Figura 32 - Estudo de ligação no solvente metanol entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional ácido metacrílico.	67
Figura 33 - Estudo de ligação no solvente metanol entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional 1-vinilimidazol.....	67

Figura 34 - Estudo de ligação no solvente orgânico acetonitrila entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional ácido metacrílico.	68
Figura 35 - Estudo de ligação no solvente orgânico acetonitrila entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional 1-vinil-imidazol.	69
Figura 36 - Estudo de ligação no solvente orgânico etanol entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional ácido metacrílico.	70
Figura 37 - Estudo de ligação no solvente orgânico etanol entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional 1-vinil-imidazol.	70
Figura 38 – Cromatogramas para o MIP (a) e NIP (b) preparados com ácido metacrílico e TRIM (monômero funcional e estrutural, respectivamente) em diferentes concentrações.	72
Figura 39 - Foto das soluções preparadas de acordo com a Tabela 3 para avaliação da solubilidade do VE.....	73
Figura 40 - Curva analítica para proporção etanol/água (50/50-v/v) como solvente.	74
Figura 41 - Porcentagem retenção de cada MMIP/MNIP para valerato de estradiol ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) com diferentes solventes orgânicos (acetonitrila, metanol e etanol).....	74
Figura 42 - Porcentagem de retenção de MMIP/MNIP pelo valerato de estradiol ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes proporções de solvente orgânico (acetonitrila, metanol ou etanol) e água (orgânico: água, v/v nas proporções 50/50, 70/30 e 90/10-v/v). M=0,27 mg	75
Figura 43 – Avaliação de dosagem da massa de MIP e NIP (5,0 até 75,0 mg de polímeros) para interação com solução de VE ($300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).	76
Figura 44 - Avaliação do tempo MMIP e MNIP (20 mg de polímero) para interação com solução de VE ($300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).	77
Figura 45 – Isotermas de adsorção do MMIP e MNIP para a interação com soluções de VE entre 20 até $700 \mu\text{mol L}^{-1}$	79
Figura 46 - Isotermas de adsorção segundo a classificação de BRUNAUER, Tipo I–V, e segundo PIERCE, Tipo VI.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Monômeros comumente utilizados na síntese de MIP, sendo os escolhidos para os experimentos destacados em azul.....	33
Tabela 2 - Atribuição das bandas do espectro de IV para o monômero funcional utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.	48
Tabela 3 - Atribuição das bandas do espectro de IV para o monômero estrutural (TRIM) utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.	49
Tabela 4- Atribuição das bandas do espectro de IV para o iniciador radicalar (AIBN) utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.....	50
Tabela 5 - Atribuição das bandas do espectro de FTIR para os reagentes utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.	54
Tabela 6 - Resultados da porosidade obtidos através das isotermas de adsorção (BET) para as amostras MIP e NIP convencionais e magnéticos para o VE sintetizados por fotopolimerização.	65
Tabela 7 - Proporções utilizadas no estudo da solubilidade do VE (v/v).	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

VE: Valerato de estradiol

TRH: Hormônio liberador de tireotrofina (Thyrotropin-releasing hormone)

AIBN: 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrila

EDGMA: Etileno glicol dimetacrilato

TRIM: Trimetacrilato de trimetilopropano

TEOS: Tetraortosilicato

MAA: ácido metacrílico

MF: monômero funcional

ME: monômero estrutural

MPS: 3-metacriloxipropiltrimetoxissilano

MIP: Polímero Molecularmente Impresso (*Molecularly Imprinted Polymer*)

NIP: Polímero sem impressão molecular (*Non-Imprinted Polymer*)

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

BET: Isoterma Brunauer, Emmett, Teller

VSM: Magnetometria de amostra Vibrante (*Vibrating Sample Magnetometer*)

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

CLAE ou HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

DSC: Calorimetria exploratória diferencial (*Differential scanning calorimetry*)

TG: Termogravimetria ou análise termogravimétrica (*Thermogravimetric analysis*)

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1 Hormônios	19
1.2 Valerato de Estradiol	23
1.3 Polímeros molecularmente impressos (MIPs)	24
2. Objetivos	29
2.1 Objetivos específicos	29
3. Materiais e métodos	30
3.1 Reagentes e soluções	30
3.1.1 Síntese dos polímeros e das nanopartículas magnéticas	30
3.1.2 Experimentos de otimização do MIP	30
3.2. Instrumentação	30
3.2.1 Medidas analíticas	30
3.2.2 Caracterização dos materiais	31
3.2.3 Simulação computacional	32
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	34
4.1 Sínteses	34
4.1.1 Síntese do MIP convencional pelo método de polimerização por aquecimento (termopolimerização)	34
4.1.2 Síntese do MIP convencional pelo método de polimerização por radiação UV (fotopolimerização)	34
4.1.3 Síntese e modificação de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ e do magneto-MIP (MMIP) para o valerato de estradiol	35
4.2 Estudos de otimização e avaliação da eficiência dos polímeros	37
4.3 Avaliação da eficiência do MIP por meio de experimentos de afinidade	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

5.1 Simulação Computacional	39
5.2 Parâmetros de análise para quantificação do valerato de estradiol.....	42
5.3 Síntese e otimização de síntese do MIP para VE.....	45
5.4 Caracterizações	46
5.4.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	46
5.4.1.1 Analito	47
5.4.1.2 Monômero funcional	47
5.4.1.3 Monômero estrutural.....	48
5.4.1.4 Iniciador radicalar	49
5.5 Análise termogravimétrica	55
5.6 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	60
5.7 Magnetometria de amostra vibrante (VSM)	62
5.8 Análise pelo método BET da adsorção e dessorção de N ₂ dos polímeros magnéticos	64
5.9 Avaliação da eficiência do MIP sintetizado por meio de experimentos de afinidade	65
5.9.1 Estudos de afinidade dos MIP pelo VE	65
5.9.1.1 Primeira Metodologia.....	66
5.9.1.2 Segunda Metodologia.....	71
5.9.2 Avaliação da quantidade de massa para estudos de afinidade usando os polímeros magnéticos	75
5.9.3 Otimização do tempo de interação polímero - VE	77
5.10 Caracterização dos polímeros por experimentos de afinidade por meio da análise de isotermas de adsorção.....	78
6. CONCLUSÃO	81
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios

A química analítica associada à biotecnologia tem sido de grande importância no controle de processos industriais e no monitoramento ambiental, com diferentes aplicações. O aumento da demanda de análises químicas e a necessidade do desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e de baixo custo, capazes de fornecer informações sobre a composição de um sistema para o monitoramento de espécies químicas tem evoluído de maneira rápida e acentuada.

Assim, dentre a ampla variedade de analitos que poderiam ser monitorados usando estas novas plataformas sensoras, foram escolhidos os hormônios femininos, especificamente o valerato de estradiol (VE) apresenta uma importância na reposição hormonal feminina e se trata de um disruptor endócrino (hormônio) lançado ao meio ambiente sem nenhum controle.

Muitas definições têm sido propostas para um disruptor endócrino. Entretanto, para todas elas, existe um ponto em comum: trata-se de uma substância química (como os ftalatos, fenóis, HPAs - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, BCPs - bifenilas policloradas, pesticidas, hormônios sintéticos) e que interfere no funcionamento do sistema endócrino de espécies de animais, incluindo os humanos (GHISELLI, 2007).

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

Os hormônios podem ser divididos em quatro grupos: esteroides, peptídeos, aminas e eicosanoides; sendo essa separação baseada na sua estrutura química, forma de síntese e armazenagem, solubilidade, meia-vida, forma de transporte, receptores na célula e mecanismo de ação (GONZALEZ; SILVA, 2006).

Os peptídeos são compostos por aminoácidos, podendo ser de 3 aminoácidos (TRH- thyrotropin-releasing hormone), até mais de 180 aminoácidos. Podem ser

referidos como peptídeos ou polipeptídeos, ou proteínas, dependendo do seu comprimento de cadeia específica. É o grupo mais numeroso de hormônios. Os principais locais de produção são o hipotálamo, hipófise, ilhotas pancreáticas, placenta, paratireóide e trato gastrointestinal.

As aminas são produzidas pela medula adrenal, algumas células nervosas, e a tireóide. Tem as catecolaminas e as iodotironinas. Os mecanismos de ação das catecolaminas são similares aos peptídeos, enquanto que as iodotironinas têm o seu mecanismo similar aos hormônios esteroidais.

Os eicosanóides são produzidos exclusivamente na membrana plasmática das células de quase todos os tecidos e podem ser considerados como segundos mensageiros intracelulares. São derivados do ácido araquidônico, liberado por fosfolipídeos originados da ação das fosfolipases, ativadas por estímulos hormonais. O ácido araquidônico é formado essencialmente por ácidos graxos, principalmente o ácido linoléico. Os eicosanóides incluem as prostaglandinas, os leucotrienos e os tromboxanos. (GONZALEZ; SILVA, 2006).

Os esteroides são produzidos a partir do colesterol, nos tecidos esteroideogênicos das adrenais, gônadas, placenta. Nas adrenais são produzidos os glicocorticóides (cortisol, corticosterona e cortisona), e os mineralocorticóides (aldosterona). As gônadas produzem os andrógenos (testosterona), estrógeno e progesterona. A placenta, durante a gestação é uma fonte de estrógeno e progesterona. (GONZALEZ, 2002)

Dentro da classe dos esteroides, os principais hormônios femininos são a progesterona e o estrogênio (ou estrógeno). A progesterona é produzida pelos ovários durante a liberação de um óvulo maduro, ajudando na preparação do revestimento do útero para aceitação do embrião. Se o óvulo não é fertilizado, há uma queda nos níveis de progesterona e ocorre o ciclo menstrual (KOMESAROFF, 2001).

Em geral, os hormônios esteroides estão relacionados à maturação sexual e a fertilidade, e determinam o desenvolvimento físico, desde a puberdade até a velhice, bem como os ciclos de fertilidade (LEHNINGER, 1985).

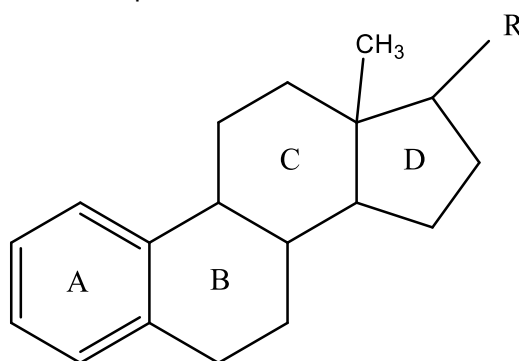
O estrogênio é um hormônio produzido na adolescência e responsável pelo aparecimento de sinais sexuais nas mulheres, indo até a menopausa. A falta dele pode causar sintomas como onda de calor em 80% das mulheres. Tal hormônio estimula as células locais a se proliferarem, ou seja, que se multipliquem como, por exemplo, a musculatura lisa do útero, após a puberdade, chegam a duplicar ou triplicar

de tamanho. Em resumo, as características que distinguem homens e mulheres são devidas ao estrogênio (GUYTON, 1989).

As substâncias estrogênicas, tal como o hormônio VE, são importantes disruptores endócrinos, que interfere no funcionamento natural do sistema endócrino (COMBALBERT, 2010).

O esqueleto estrogênico é constituído por 18 átomos de carbono, distribuídos em três anéis hexagonais, denominados A, B e C, e um pentagonal (D) (Figura 1). O que diferencia as moléculas estrogênicas é a posição dos substituintes no carbono 17 do núcleo ciclopentano-fenantreno (Figura 2) (GAMA, 2010).

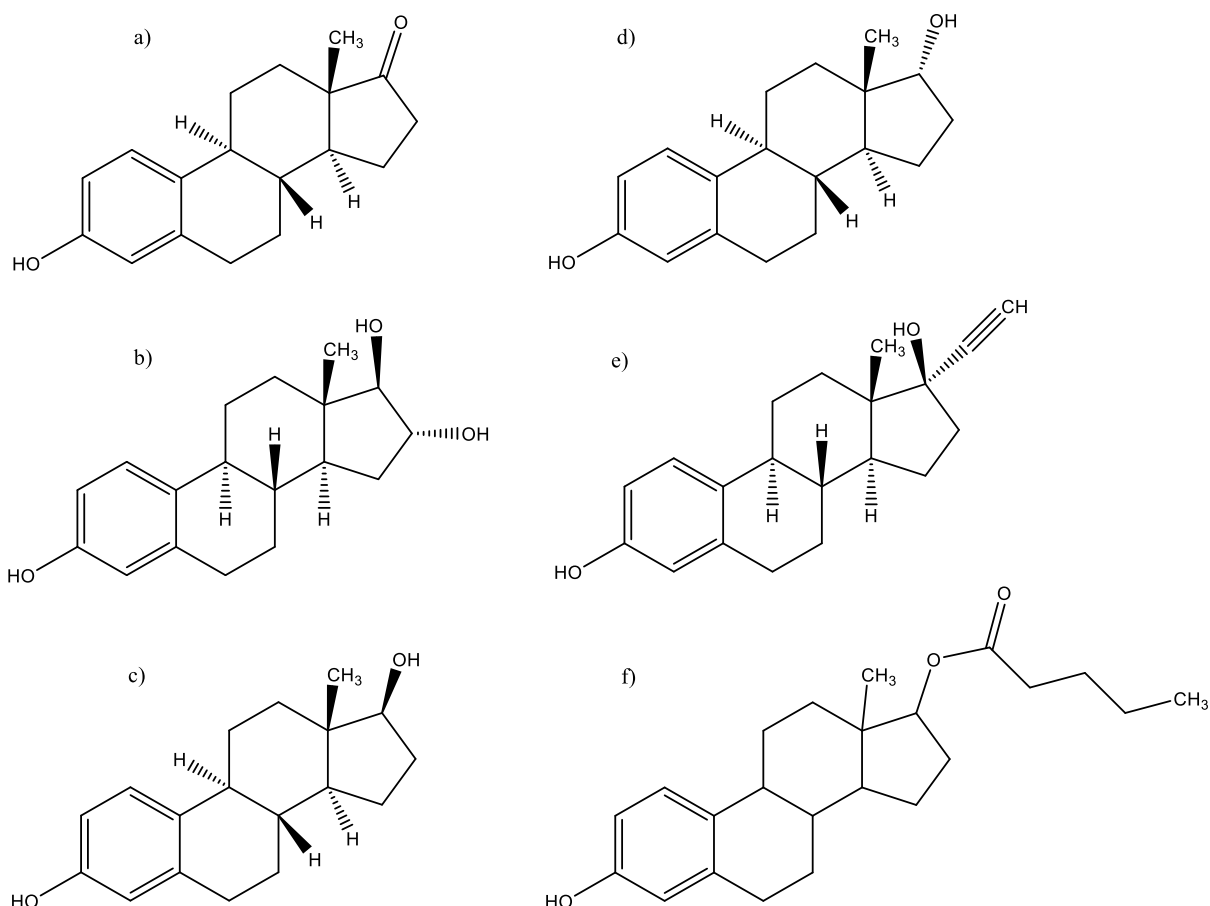
Figura 1 - Estrutura química do núcleo ciclopentano – fenantreno.



Fonte: autora do trabalho.

Além de estrógenos naturais, tais como estrona, estriol e 17 β -estradiol, há também os sintéticos: 17 α -estradiol, 17 α -etinilestradiol e valerato de estradiol (Figura 2); esse último, estudado neste trabalho, tem sido utilizado em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos.

Figura 2 - Estruturas moleculares (a) estrona; (b) estriol; (c) 17 β -estradiol; (d) 17 α -estradiol; (e) etinilestradiol; (f) valerato de estradiol.



Fonte: autora do trabalho.

Os estrógenos sintéticos despertam uma maior preocupação, tanto pela sua atividade biológica como pela quantidade continua introduzida no ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida para os receptores estrógenos. Assim, resultam em respostas máximas de atividade estrogênica, e são considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição de efluentes. A principal preocupação na quantificação destes hormônios é centralizada nos efeitos adversos que esses produzem ao sistema reprodutor dos seres vivos como por exemplo a feminização de peixes, pois podem ser facilmente adsorvidos nos sedimentos dos sistemas aquáticos (CARBALLA, 2004).

Apesar de possuir um valor de meia vida relativamente curto, de pelo menos 10 dias, se comparados a outros compostos orgânicos (como alguns pesticidas), os

estrógenos são continuamente descartados ao ambiente, o que lhes confere um caráter de persistência (MAZELLIER, 2008).

1.2 Valerato de Estradiol

O valerato de estradiol (VE) é um hormônio sintético muito utilizado na medicina clínica. Sua nomenclatura oficial é 17-pentanoato, (17 β) - estra-1,3,5 (10) - trieno-3,17-diol. Este hormônio pode ser usado para tratar a síndrome da menopausa (climatério), câncer de próstata e quando utilizado juntamente com progesterona, para a inibição da ovulação (DUAN, 1999).

O acetato de ciproterona, associado ao VE, tem sido usado na terapia de reposição hormonal (TRH) no climatério, que é a transição do período reprodutivo, ou fértil, para não reprodutivo da mulher (DINÇ, 2003). Esse período ocorre após a menopausa (último ciclo menstrual), quando ocorrem transformações metabólicas e hormonais que repercutem sobre o organismo feminino. Cessando por completo a menstruação, endocrinologicamente ocorre a diminuição da atividade ovariana, biologicamente, reduzindo a fertilidade, acarretando em uma série de alterações no organismo da mulher (KHAN, 1994). Entre os sintomas climatéricos estão: ondas de calor (fogachos), insônia, nervosismo, vertigem, fadiga, palpitações, formigamento e incontinência urinária. Ao utilizar a TRH, estes sintomas amenizam-se; além disso, a reposição é indicada para prevenir doenças cardiovasculares e osteoporose e é utilizada também para aumentar os níveis de colágeno da pele e melhorar a sexualidade (SPRITZER, 1998). Recomenda-se em algumas mulheres na menopausa recebam estrogênio exógeno com a finalidade de manter ou melhorar os níveis de estrogênios, prevenindo os efeitos que a carência estrogênica exerce sobre os sistemas orgânicos.

Um breve levantamento da literatura revela diversas publicações relacionadas com a determinação de valerato de estradiol. Grande parte dos métodos descreve a análise em formulações contendo o fármaco em associação a outros hormônios, tais, como o acetato de megestrol, por espectrofotometria, enantato de testosterona e acetato de medroxiprogesterona por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (MENDEZ, 2010). Atualmente, o método oficial de detecção desse hormônio é HPLC, preconizado pela Farmacopeia Inglesa (REYNOLDS, 1989).

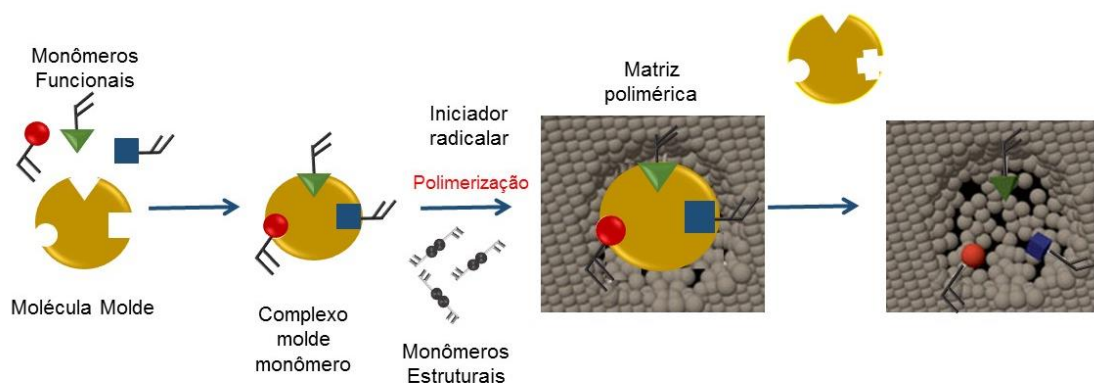
O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande importância para uma melhor determinação de espécies químicas, para assim, aumentando a confiabilidade dos resultados analíticos. Devido à complexidade de algumas matrizes, aos baixos teores dos constituintes de interesse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

1.3 Polímeros molecularmente impressos (MIPs)

Os MIPs são comumente preparados pelo método em *bulk* (fase volumétrica), considerado o mais simples porque é um sistema de preparo homogêneo. O monômero funcional, solvente, analito, monômero estrutural e iniciador radicalar são selados em tubo de ensaio. A reação ocorre em ausência de oxigênio e é induzida por aquecimento ou radiação UV, o MIP é formado (Figura 3). Mediante a interação do analito por meio de ligação covalente ou não com as moléculas do monômero funcional. (TARLEY, 2005).

Polímeros preparados por ligação covalente possuem sítios mais seletivos, dada a uniformidade gerada nos mesmos. Por outro lado, quando esta estratégia é adotada, a necessidade do uso de monômeros e analitos que estabeleçam ligações covalentes restringe a aplicabilidade dos MIP para poucos analitos. Adicionalmente, estudos têm mostrado que tais polímeros apresentam uma cinética lenta de retenção dos analitos na cavidade do polímero. Por outro lado, polímeros preparados a partir de ligações não covalentes frequentemente apresentam diâmetros de partículas e sítios seletivos menos uniformes. Porém, apesar destas desvantagens, apresenta mais vantagens em relação às outras, como fácil preparação do complexo monômero/analito, fácil remoção do analito do polímero e aplicação em grande número de diferentes tipos de moléculas alvo (CORMACK; ELORZA, 2004).

Figura 3 - Esquema genérico da síntese e utilização de MIP.



Fonte: autora do trabalho.

Inicialmente são colocados molécula molde juntamente com monômeros funcionais para interagir, covalente, não covalente ou semi-covalentemente. Posteriormente são adicionados os monômeros estruturais responsáveis pela formação da matriz polimérica, para iniciar a reação de polimerização é adicionado um iniciador radicalar. Assim os MIPs realizam um reconhecimento altamente seletivo, pois formam cavidades complementares em tamanho e forma ao analito, como mostra a Figura 3. São denominados também de polímeros biomiméticos por mimetizarem sistemas de reconhecimento biológico baseados em afinidade como, por exemplo, antígeno - anticorpo (TARLEY, 2005).

A técnica de impressão para o preparo de MIPs mais comum é a não covalente já que apresenta mais vantagens em relação às outras, tal como fácil preparação do complexo monômero/analito, fácil remoção do analito e aplicação em grande número de moléculas alvo (KOMIYAMA, 2003). Posteriormente um monômero estrutural é adicionado ao meio reacional promovendo a ocorrência de ligações cruzadas no polímero e a formação de uma matriz polimérica rígida. A reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar e o oxigênio do meio deve ser removido por inibir a reação de polimerização (CORMACK; ELORZA, 2004).

Cada reagente apresenta uma função distinta na síntese dos MIPs. O monômero funcional é responsável pelas interações entre o polímero e analito na cavidade específica formada ele pode ser, no caso de interações não covalentes, do tipo ácido, básico ou neutro (SOUZA; BARBOSA, 2009). O monômero estrutural tem como finalidade a estabilização dos pontos de ligação com reconhecimento molecular e a estabilização mecânica da matriz polimérica, sendo o tipo e a quantidade do agente têm grande impacto na seletividade dos MIPs (ITURRALDE, 2014). O iniciador

radicalar tem como papel promover a reação de polimerização via radicais livres e pode ser ativo de duas maneiras: termicamente ou por radiação UV (SOUZA E BARBOSA, 2009). O solvente é o meio onde estão todos os componentes, não devendo interferir na interação analito/monômero e também são responsáveis pela formação dos poros no polímero, por isso a designação de solvente porogênico (SOUZA; BARBOSA, 2009) e (GORMACK; ELORZA, 2004).

Embora a ideia de reconhecimento molecular dos MIPs seja baseada em sistemas biológicos, eles apresentam diversas vantagens baixo custo e fácil preparação; resistência mecânica e térmica; possibilidade de preparo em diversos formatos e de armazenamento por anos sem perder a eficiência (MAHONYA et al, 2005).

Os MIPs podem ser aplicados com algumas outras técnicas, tais como extração em fase sólida (MASQUEË, 2001), fase estacionária em colunas cromatográficas (ANSELL, 2013) e até mesmo no preparo de amostras (MARTÍN-ESTEBAN, 2013); aumentando a eficiência das técnicas. Ademais, os MIPs podem ser modificados para aumentar ainda mais a sensibilidade do reconhecimento seletivo com o uso de nanopartículas, que possuem maior área superficial, (SUBRAHMANYAM et al, 2013) ou exercer uma função além do reconhecimento, tal como na liberação controlada de fármacos (SUEDEE, 2013).

Porém os MIP produzidos pelos métodos convencionais de síntese, embora muito eficientes, ainda apresentam alguns problemas no seu desempenho de reconhecimento. As partículas formadas possuem os sítios de ligação específica distribuídos de maneira não homogênea e no interior da partícula, o que diminui a acessibilidade do analito na cavidade do MIP. (SHAHAR et al, 2016)

Assim, um dos modos encontrados de minimizar e/ou acabar com os inconvenientes mencionados foi através da junção dos polímeros impressos com nanopartículas. Essa união gerou materiais nanocompósitos do tipo core@shell, no qual o núcleo é formado por nanopartículas sólidas recobertas com uma camada de MIP. (WACKERLIG; SCHIRHAGL, 2015)

Nanopartículas são sólidos com tamanho na ordem de 10-100 nm e que apresentam excelentes propriedades devido ao seu tamanho, como elevada área superficial em relação ao seu volume – o que permite modificações em sua superfície. (REYES-GALLARDO et al, 2015)

Dos materiais mais aplicados como núcleo para o MIP encontram-se as

nanopartículas magnéticas, dentre as quais os óxidos de ferro são os mais utilizados devido suas excelentes propriedades: superparamagnetismo, zero coercitividade e alta estabilidade. A maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a magnetita (Fe_3O_4) são os óxidos com maior uso por apresentarem todas as propriedades já citadas e, ademais, possuem baixa toxicidade e biocompatibilidade comprovadas. (ZHU et al, 2016)

A síntese de nanopartículas de magnetita pode ser realizada de diversas maneiras, sendo os métodos mais comuns co-precipitação (RASHAD et al, 2012), hidrotérmico (TOGASHI et al, 2011) e sonificação (ABBAS et al, 2013). A co-precipitação está entre os métodos mais utilizados devido à sua facilidade e rapidez na síntese. Nesse método normalmente é utilizado um sal de sulfato ou cloreto de ferro (II) e ferro (III) que precipitará em meio básico a magnetita nanométrica.

Entre as diversas vantagens apresentadas por essas partículas, as principais e mais importantes são suas características superficiais que permitem sua fácil encapsulação e modificação superficial para protegê-las da degradação, conservando sua boa resposta magnética. (TARTAJ et al, 2005). As modificações incluem desde simples funcionalizações na superfície com diferentes grupos funcionais até moléculas orgânicas (surfactantes, polímeros e componentes biológicos). (RAMIMOGHADAM et al, 2014)

Deste modo, ao se combinar as melhores propriedades do material magnético com as do MIP, foram obtidos os MIP magnéticos, que consistem em nanopartículas magnéticas decoradas/modificadas com polímeros molecularmente impressos.

Ao contrário do MIP convencional, o MIP magnético possui a vantagem de ter uma elevada relação entre área superficial e volume, o que torna as cavidades impressas mais acessíveis ao analito; melhorando a cinética de ligação (POMA et al, 2010). Além disso, após a reação de reconhecimento do MIP magnético com o analito, as partículas podem ser capturadas pelo campo magnético permitindo que uma maior quantidade de analito seja extraída da amostra, havendo assim um aumento na sensibilidade da análise. (KUKUSAMUDE et al, 2012)

Nesse sentido, a possibilidade de adaptar os MIPs com outros nanomateriais, tais como nanopartículas magnéticas, permitirá a obtenção de novas plataformas sensoras (TARLEY, 2005) para serem usadas, por exemplo, em magneto-eletrodos. A finalidade é se obter novos sensores com características desejadas de alta seletividade e robustez, visando aplicação real em diversos setores de produção, segurança ambiental, alimentação e saúde pública.

Desta forma, evidenciada a preocupação com o meio ambiente, assim como pela saúde pública, que está inerente no controle de qualidade de fármacos, é evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos de análise de hormônios estrogênicos, e que permitam um monitoramento seletivo, sensível e robusto e que adicionalmente possam ser usados *in situ* e com baixo custo financeiro e ambiental.

2. OBJETIVOS

Esta dissertação descreve a síntese de um material híbrido no formato *core@shell*, constituído de nanopartículas magnéticas (core) modificadas com MIP (shell) seletivo ao hormônio estrogênico feminino valerato de estradiol - VE.

2.1 Objetivos específicos

Síntese das nanopartículas magnéticas. Caracterização físico-química.

Modificação das nanopartículas magnéticas com MIP para VE (magneto-MIP).

Otimização dos parâmetros de síntese do magneto-MIP.

Caracterização físico-química do magneto-MIP.

Avaliação do desempenho do magneto-MIP sintetizado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

3.1.1 Síntese dos polímeros e das nanopartículas magnéticas

Os reagentes utilizados na a síntese dos polímeros foram; valerato de estradiol, ácido metacrílico, acrilonitrila, 2-vinil-piridina, 1-vinil-imidazol, trimetilolpropano trimetacrilato - TRIM, etilenoglicol dimetacrilato - EGDMA e 2,2-azobisisobutironitrila - AIBN, todos fornecidos pela Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados na síntese e remoção da molécula molde foram metanol (Panreac) e ácido acético glacial (Synth).

Na síntese das nanopartículas foram utilizados $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), NH_4OH (Synth), tetraetilortossilicato - TEOS (Acróis), metacriloxipropil trimetoxissilano - MPS (Aldrich), e etanol e tolueno, ambos fornecidos pela Synth.

3.1.2 Experimentos de otimização do MIP

A solução estoque de VE foi preparada em metanol. Foram preparadas soluções a $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água/etanol 50/50 (v/v), para os experimentos de otimização da massa de material adsorventes; do tempo de interação com a solução de analito; e para a construção da isoterma de adsorção.

3.2. Instrumentação

3.2.1 Medidas analíticas

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis com arranjo linear de diodos da Bel photonics modelo UV-M 51. Todas as medidas foram realizadas utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e em comprimentos de onda no intervalo de 200 a 400 nm.

As análises por HPLC foram realizadas utilizando um cromatógrafo Shimadzu modelo 20A, com detector UV-Visível modelo SPD-20A, amostrador automático SIL-20A e degaseificador DGU-20A5 acoplado a um microcomputador. A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa C18 Phenomenex Luna 5 μm (tamanho da partícula) 100 Å (diâmetro poro), comprimento de 250 mm e 4,60 mm de diâmetro interno. A fase móvel foi preparada em uma mistura de solução NH_4NO_3 0,08% com acetonitrila 30/70 (v/v) a uma vazão de 2 mL min^{-1} . A detecção foi realizada utilizando comprimento de onda de 280 nm e um volume de injeção de amostra de 50 μL ; essa metodologia foi baseada em BATISTA, et al. 2008.

3.2.2 Caracterização dos materiais

Foram realizadas análises em um espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier da Perkin Elmer®, Frontier. Para coleta dos espectros foram realizadas 128 varreduras no intervalo 4000 a 400 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos pela técnica de reflectância total atenuada (ATR), utilizando cristal de seleneto de zinco.

A estabilidade dos materiais sintetizados foi avaliada por análise térmica, utilizando termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial (TG-DSC). As curvas de TG foram obtidas em um sistema TG-DSC STARe, da Mettler Toledo. Utilizou-se uma mistura de ar comprimido e N_2 em um fluxo de 50 mL min^{-1} como gás de purga. A taxa de aquecimento foi de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$ com 10,0 mg de massa das amostras. As curvas de DSC foram obtidas usando um DSC Q10 da TA Instruments. A condição de gás de purga foi a mesma utilizada para a TG a uma taxa de aquecimento de 5 $^\circ\text{C min}^{-1}$ com 10,0 mg de massa de amostra.

A morfologia dos polímeros foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura com campo de emissão (FE-SEM; Jeol JSM 6330F). Os polímeros foram sonicados em álcool isopropílico por 10 min e recobertos com carbono para posterior análise no microscópio.

O estudo da porosidade dos MIPs em função da temperatura de pré-tratamento foi realizado por meio de estudos de adsorção de N_2 sob baixas temperaturas de operação e pressões relativas da ordem de 200 mmHg. Essa técnica consiste basicamente em preencher os poros do material com um líquido proveniente da condensação de um gás - normalmente N_2 - e, dessa forma, o tamanho ou volume

dos poros podem ser calculados a partir da pressão relativa com que há adsorção ou dessorção do nitrogênio (TEIXEIRA *et al*, 2001). As medidas de BET foram realizadas em um equipamento da Micromeritics modelo ASAP 2010.

A magnetometria é um método utilizado a fim de determinar o magnetismo de um material quando submetido à aplicação de um campo magnético. A forma clássica de análise é através da medida de atração ou repulsão do material por um campo magnético. Para a caracterização magnética foi usada o equipamento LakeShore VSM série 7300. As medidas foram realizadas pelo Dr. Luis Alvares, pesquisador do Centro Atômico Bariloche, Divisão de Ressonâncias Magnéticas, Argentina.

A bomba a vácuo utilizada foi a EIKONAL® (Modelo 131/132). Empregou-se o sistema Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore para a obtenção de água ultrapura.

3.2.3 Simulação computacional

Foram empregados os seguintes programas para a simulação computacional: HyperChem® 8.0.5, para a modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIPs (FOGUEL, M. V.; 2015) OpenEye® (pacote de softwares) contendo os programas:

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

utilitário que emprega química quântica semiempírica para os cálculos de aproximação.

Foram avaliados 20 monômeros, mostrados na Tabela 1, os quais foram nomeados como MP1 a MP20 para fins de simplicidade de análise dos resultados.

Tabela 1 - Monômeros comumente utilizados na síntese de MIP, sendo os escolhidos para os experimentos destacados em azul.

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

Fonte: autora do trabalho.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Sínteses

4.1.1 Síntese do MIP convencional pelo método de polimerização por aquecimento (termopolimerização)

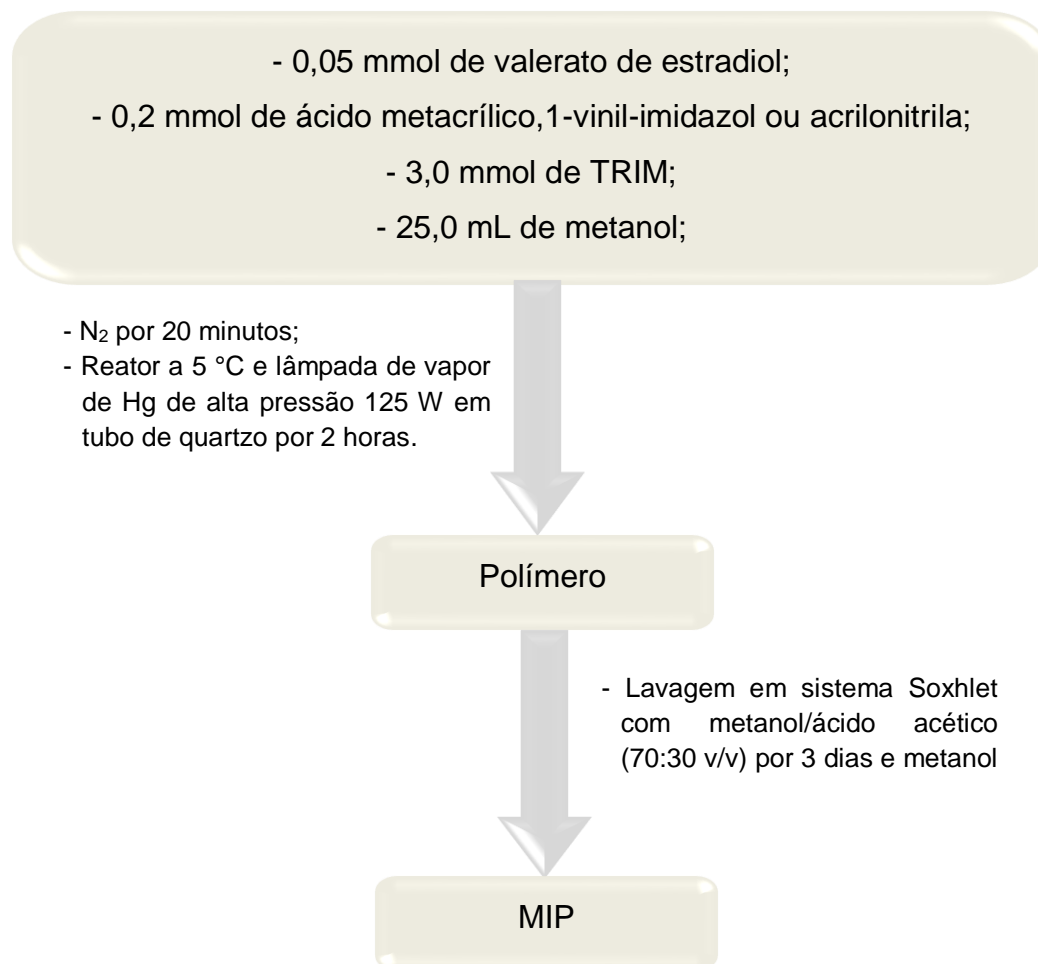
Para a síntese do MIP foram adicionados 0,05 mmol de valerato de estradiol (VE) (molécula molde) 0,20 mmol de ácido metacrílico ou 2-vinil-piridina ou acrilonitrila (monômeros funcionais), 1,0 mmol de EDGMA (monômero estrutural); 5,0 mL de metanol (solvente) e, por fim, 0,05 mmol de AIBN (iniciador radicalar). Uma vez que a presença de oxigênio inibe a síntese, foi borbulhado N₂ por 10 min no tubo de ensaio e, posteriormente, este foi selado e levado para o banho-maria a 60 °C por 20 h.

Ao final desse procedimento, o polímero obtido foi deixado na capela por 24 h para garantir completa evaporação do solvente. Em seguida, o polímero foi colocado para lavagem em sistema Soxhlet por 72 h com 100 mL da proporção 70/30 (v/v) metanol:ácido acético e por mais 48 h com metanol, para remoção da molécula molde e do excesso de reagentes. Com o intuito de verificar a eficiência de remoção do valerato de estradiol do polímero, as soluções do solvente de lavagem foram analisadas por espectrofotometria UV a cada 24 horas.

4.1.2 Síntese do MIP convencional pelo método de polimerização por radiação UV (fotopolimerização)

A síntese foi realizada segundo método proposto por KEMPE et al. 2010, cujo o procedimento e proporções dos reagentes utilizados na síntese estão descritos no fluxograma (Figura 4) a seguir.

Figura 4 - Esquema da síntese do MIP por polimerização UV.



Fonte: autora do trabalho.

Em todos os casos, foi sempre sintetizado um polímero controle (NIP) exatamente da mesma forma sem, contudo, conter o analito.

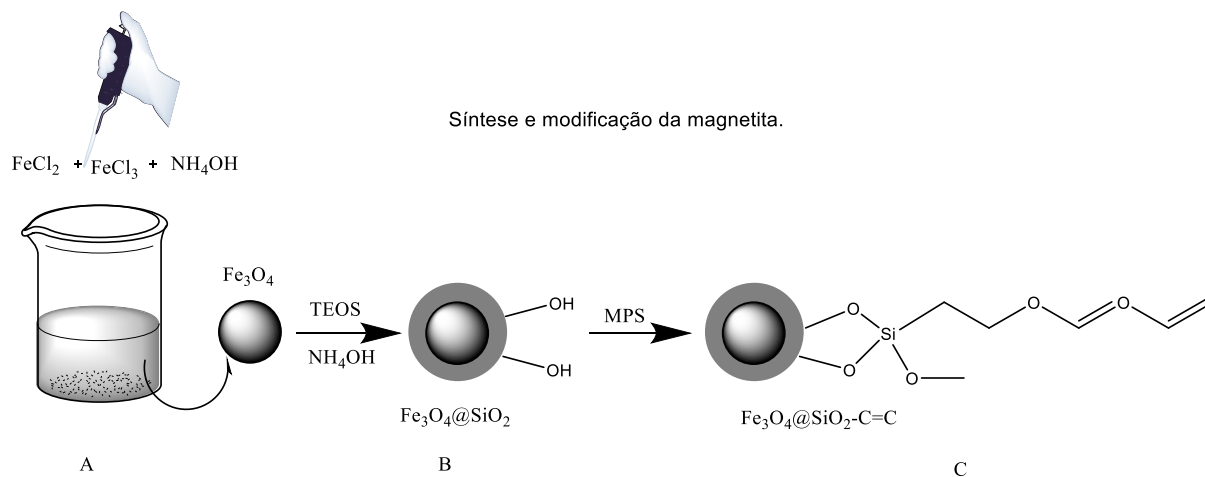
Uma vez que a síntese do MIP foi realizada pelo método de precipitação, as partículas obtidas são homogêneas e do mesmo tamanho.

4.1.3 Síntese e modificação de nanopartículas de Fe_3O_4 e do magneto-MIP (MMIP) para o valerato de estradiol

O procedimento para a obtenção de partículas de magnetita baseou-se no método apresentado por SÁNCHEZ et al. 2016 e a Figura 5 representa resumidamente o procedimento experimental de modificação das nanopartículas de magnetita com grupos silanóis. Brevemente, foi realizada a co-precipitação (Figura

5a) de 0,01 mmol de Fe^{2+} e 0,02 mmol de Fe^{3+} em meio básico (10,0 mL de NH_4OH em 80,0 mL de H_2O Milli-Q). Posteriormente, foi adicionado 0,8 mL de TEOS - responsável por revestir a magnetita com uma camada de sílica (Figura 5b). Finalmente, as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ foram adicionadas a 50,0 mL de tolueno anidro e 5,0 mL de MPS por 12 h, sendo o MPS utilizado para funcionalizar as nanopartículas por meio da inserção de um grupo metacrílico (Figura 5c).

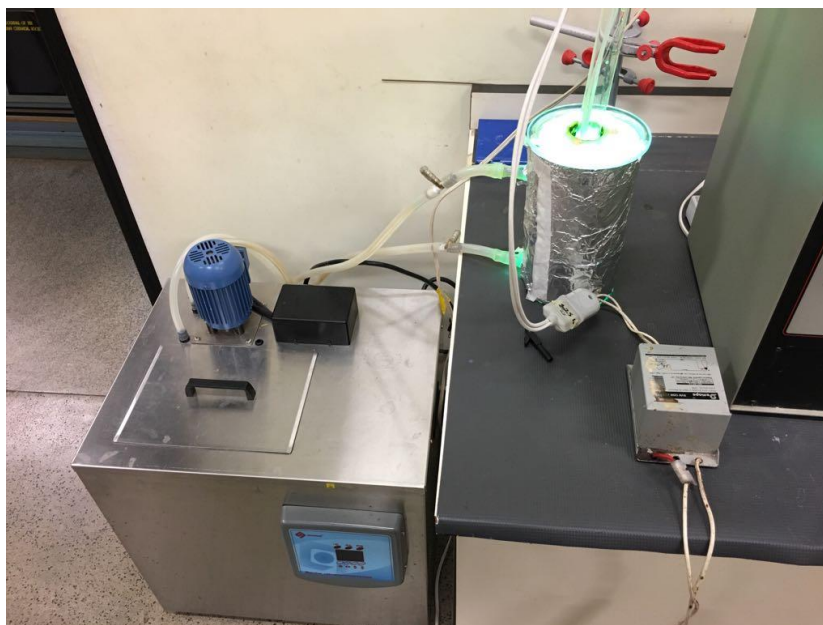
Figura 5 - Síntese e modificação da magnetita.



Fonte: autora do trabalho.

Para a síntese do MIP sobre as nanopartículas magnéticas funcionalizadas foi adotado o método por precipitação. Para isso foram misturados e deixados interagir VE (0,2 mmol), ácido metacrílico (0,08 mmol) e 25 mL de metanol (usado como solvente porogênico). A seguir, adicionou-se a esta solução 200 mg de nanopartículas de magnetita modificadas e manteve-se o sistema sob agitação constante durante 2 h. Por fim, acrescentou-se à mistura 3,0 mmol de TRIM e 0,05 mmol de AIBN (iniciador radicalar), sendo N_2 borbulhado à solução continuamente em baixo fluxo de maneira a impedir que o oxigênio interfira na polimerização, e acionada lâmpada de vapor de Hg de alta pressão (125 W) em tubo de quartzo por 2 h afim de iniciar a fotopolimerização.

Figura 6 – Foto ilustrativa do esquema de síntese por fotopolimerização.



Fonte: autora do trabalho.

Finalizada a síntese, lavou-se o polímero em sistema Soxhlet com metanol/ácido acético na proporção 70/30 (v/v) para remover o VE. Analogamente ao MMIP, foi sintetizado um MNIP como material de controle, cuja síntese foi idêntica à do MMIP, porém, sem a adição do analito.

4.2 Estudos de otimização e avaliação da eficiência dos polímeros

Para todos os procedimentos descritos a seguir, após transcorrido o tempo de agitação, as soluções foram filtradas e analisadas de forma indireta uma vez que foi quantificado o analito livre no sobrenadante da solução primeiramente por UV-Vis e depois por HPLC.

4.3 Avaliação da eficiência do MIP por meio de experimentos de afinidade

Para estes estudos de afinidade adotou-se o seguinte procedimento: em tubos *ependorf* foram preparadas diferentes concentrações de soluções poliméricas de M MMIP E MNIP; de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10 mg mL⁻¹, contendo 1,0 mL de solução de VE

0,21 mg mL⁻¹ (600 μmolL⁻¹) utilizando metanol, acetonitrila e etanol como solventes de extração. As soluções foram deixadas sob agitação por 2 h, envolvidas por papel alumínio e em temperatura ambiente (aqui denominada 1ª metodologia).

Posteriormente adotou-se um segundo procedimento: em tubos *ependorf* foram preparadas diferentes concentrações de soluções poliméricas de MIP e NIP; de 5; 10; 20; 30; 50 e 75 mg contendo 1,0 mL de solução de VE 0,21 mg mL⁻¹, sendo avaliados em diferentes solventes e suas misturas com água. As soluções foram deixadas sob agitação por 2 h, envolvidas por papel alumínio e em temperatura ambiente (2ª metodologia).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão discutidos inicialmente a partir da simulação computacional e a seguir, de ensaios de otimização. Serão discutidos primeiramente com os polímeros convencionais e, posteriormente, com os polímeros magnéticos já com os parâmetros (monômero funcional e solvente) otimizados. Os tópicos estão de acordo com o tipo de material sintetizado. Posteriormente, serão discutidas as caracterizações de ambos os materiais (polímeros convencionais e polímeros magnéticos) com o propósito de comparação.

5.1 Simulação Computacional

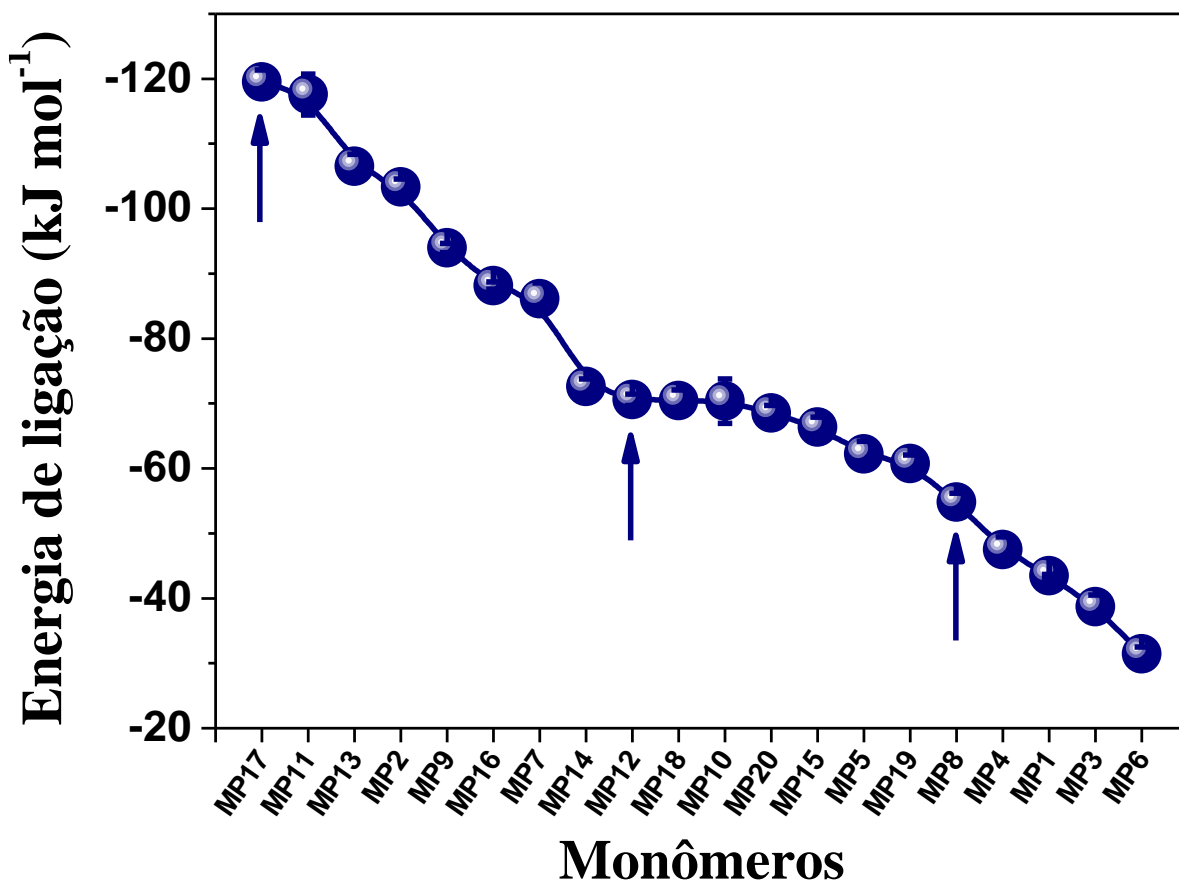
A simulação computacional foi utilizada com o intuito de verificar a variação da energia de ligação do VE com diversos monômeros funcionais. O intuito desses cálculos foi estimar qual deles apresentaria uma maior interação com o VE e, desta forma, seria o mais adequado para síntese do MIP e do magneto-MIP.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos a partir da simulação computacional. Os valores de energia podem ser interpretados como a energia liberada na aproximação entre cada monômero e o VE, sendo que quanto maior a energia liberada (mais negativo o valor), maior a afinidade entre eles, e teoricamente mais seletivo o polímero resultante.

Observando os resultados obtidos na Figura 7, nota-se que os monômeros mais adequados para o VE seriam a 2-vinilpiridina (MP17) e o ácido metilenosuccínico (MP11), por apresentarem maior energia de ligação. No entanto, trabalhar com apenas esses monômeros pode não ser o adequado porque, experimentalmente, uma alta energia de afinidade pode significar que será mais difícil remover o analito da cavidade seletiva. Assim sendo, foram escolhidos, para realizar as sínteses e avaliar o comportamento frente ao reconhecimento do VE, três monômeros de diferentes energias (destacado em azul na Tabela 1: 2-vinilpiridina – MP17 (alta energia de ligação), ácido metacrílico – MP12 (energia de ligação intermediária) e acrilonitrila – MP8 (baixa energia de ligação). As estruturas destes monômeros funcionais estão

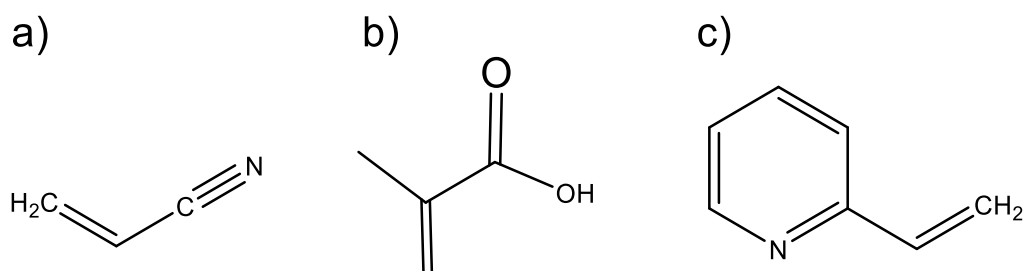
representadas na Figura 8 e são de grande importância para a análise da interação deles com o VE.

Figura 7 - Valores de energia de ligação entre o VE com os 20 monômeros tabelados.



Fonte: autora do trabalho.

Figura 8 - Estrutura molecular dos três monômeros escolhidos para síntese do MIP para VE: (a) MP8; (b) MP12 e (c) MP17.



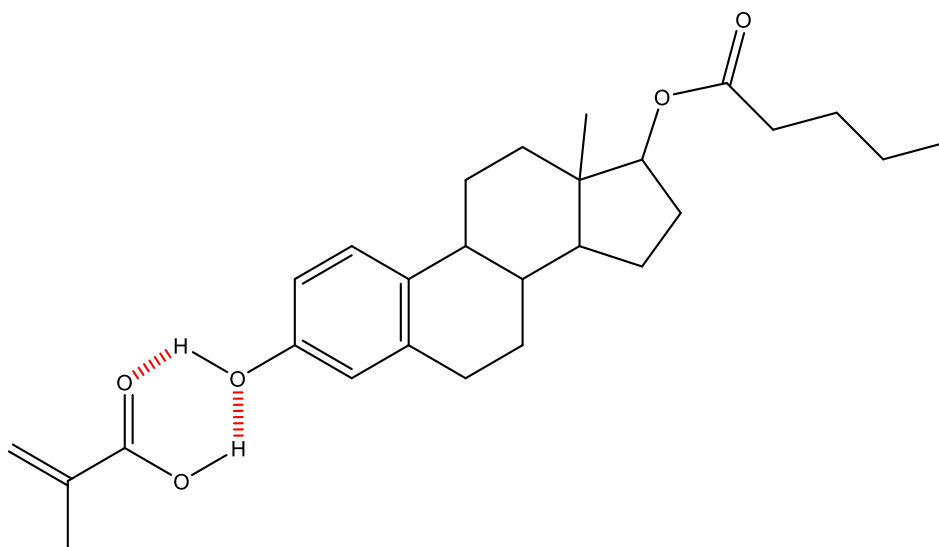
Fonte: autora do trabalho.

Uma proposta de interação apresentada para o ácido metacrílico, que seria o de maior energia dos monômeros funcionais escolhidos, pode ser visualizada na

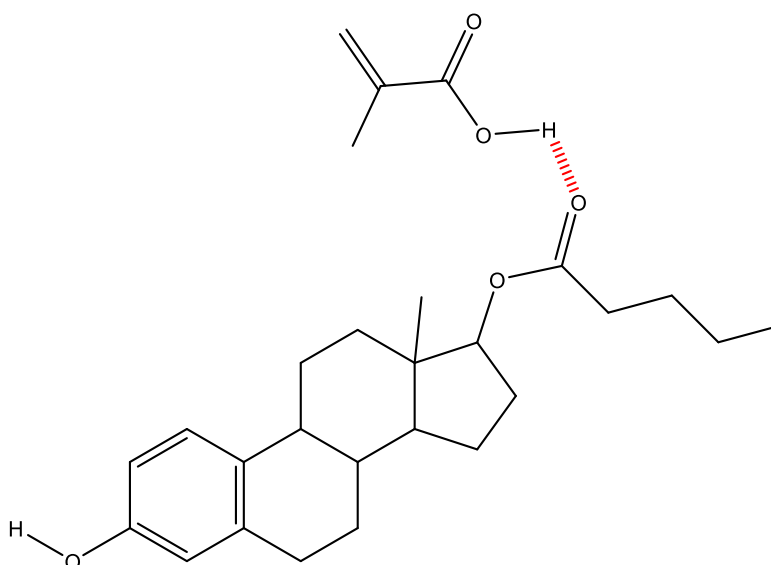
Figura 9. Dentre essas, a representação (a) pode ser mais viável, devido à formação do intermediário de 6 membros, que através de interações de hidrogênio, torna-se o mais estável e favorecido termodinamicamente, quando comparado à estrutura em (b), que é menos viável por não ser tão estável.

Figura 9 - Duas diferentes propostas de interação (destacadas em vermelho) entre ácido metacrílico e VE: (a) interação entre grupo hidroxila do VE e carbonila e hidrogênio do ácido metacrílico e (b) interação entre hidrogênio ácido e carbonila do VE.

(a)



(b)



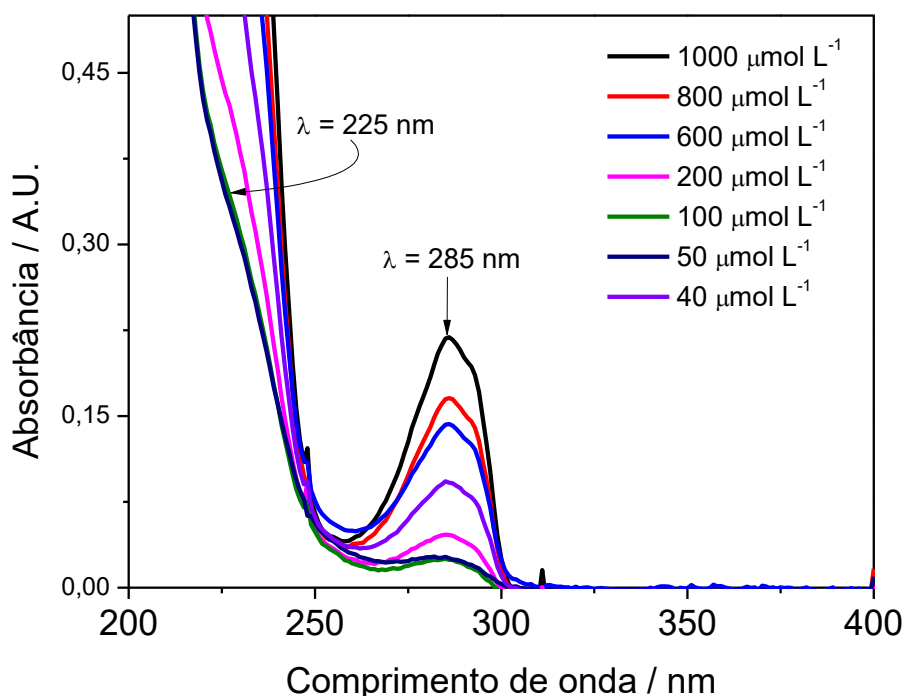
Fonte: autora do trabalho.

5.2 Parâmetros de análise para quantificação do valerato de estradiol

Para a quantificação do VE, avaliação das condições de lavagem do MIP; a adsorção do analito e, conseqüentemente, a eficiência do MIP sintetizado. Primeiramente foram definidas as condições analíticas para tal, usando a espectrofotometria UV-Vis e a HPLC/UV-Vis.

A Figura 10, mostra os espectros UV-Vis para soluções de VE a diferentes concentrações. À banda em 285 nm apresenta melhor resolução e maior definição em altas concentrações de VE. Por essa razão, esse sinal de absorção foi usado para a quantificação do analito.

Figura 10 - Espectros de absorção na região UV-VIS para soluções com diferentes concentrações do hormônio valerato de estradiol dissolvido em metanol.

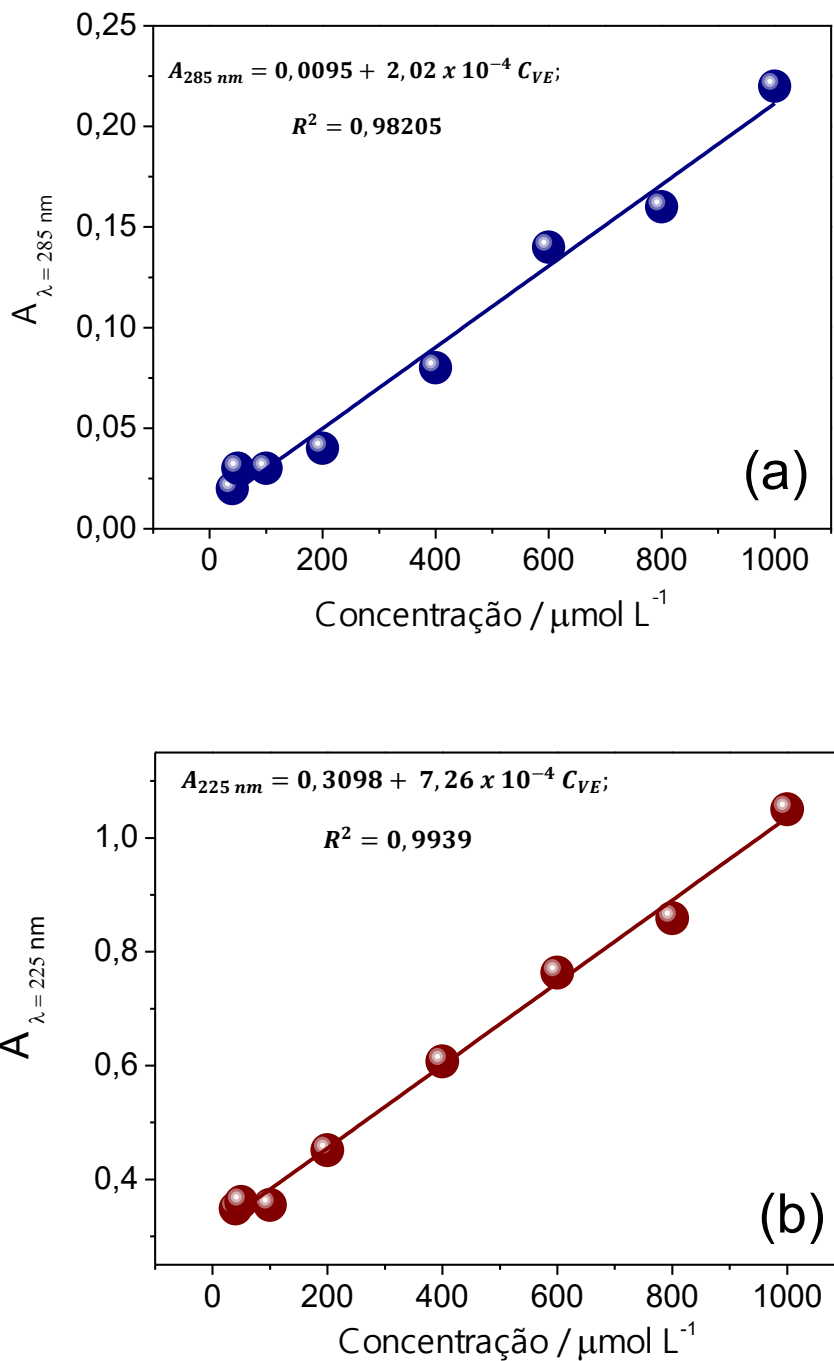


Fonte: autora do trabalho.

Adicionalmente, observa-se, que na Figura 11, no intervalo entre 40 e 1000 µmol L⁻¹ o sistema obedece a lei de Lambert-Beer. Para os testes de otimização, a

concentração de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,21 \text{ mg L}^{-1}$) foi a escolhida como a mais adequada pois se encontra dentro da faixa linear da curva analítica.

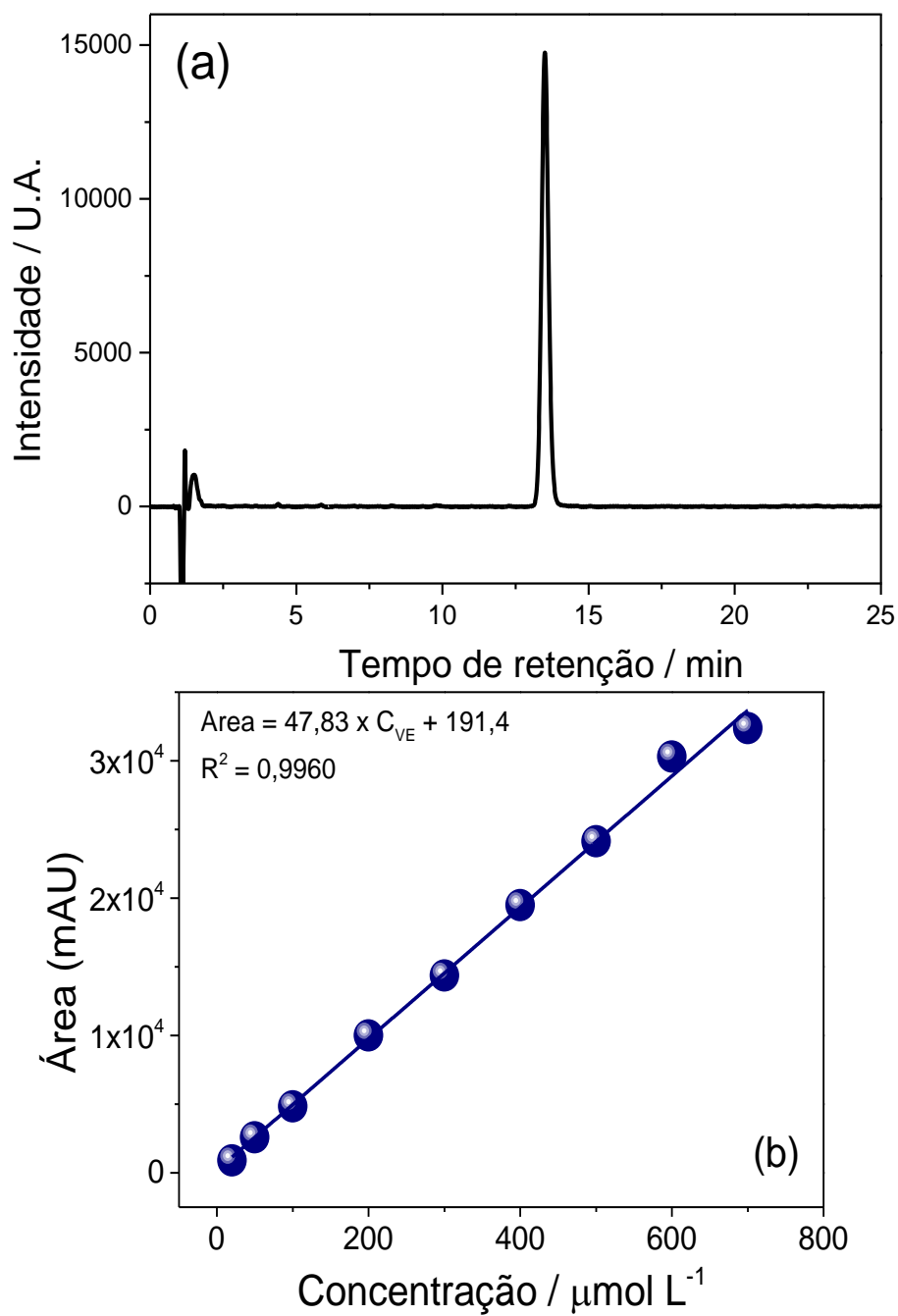
Figura 11 - Curvas analíticas para o VE nos dois comprimentos de onda: a) 285 nm e b) 225 nm.



Fonte: autora do trabalho.

Baseando se no método descrito por BATISTA *et al.* 2008, a Figura 12(a) mostra o cromatograma obtido para o VE em uma concentração de 50 mg L^{-1} em metanol.

Figura 12 – Cromatograma obtido para o VE a 50 mg L^{-1} (a) para quantificação do analito por CLAE e (b) curva analítica em intervalo de concentrações de 20 a $700 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e em acetonitrila/água 70/30 v/v. Dados obtidos a $\lambda = 280 \text{ nm}$.



Fonte: autora do trabalho

Como pode ser observado na Figura 12 o pico simétrico apresentou um tempo de retenção de 13 min, com boa intensidade e sem encaudamento. A Figura 12b) apresenta-se a curva analítica correspondente ao método cromatográfico, que ajustou os dados de área de pico com um coeficiente de correlação linear de 0,998, na faixa de concentração entre 20 e 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

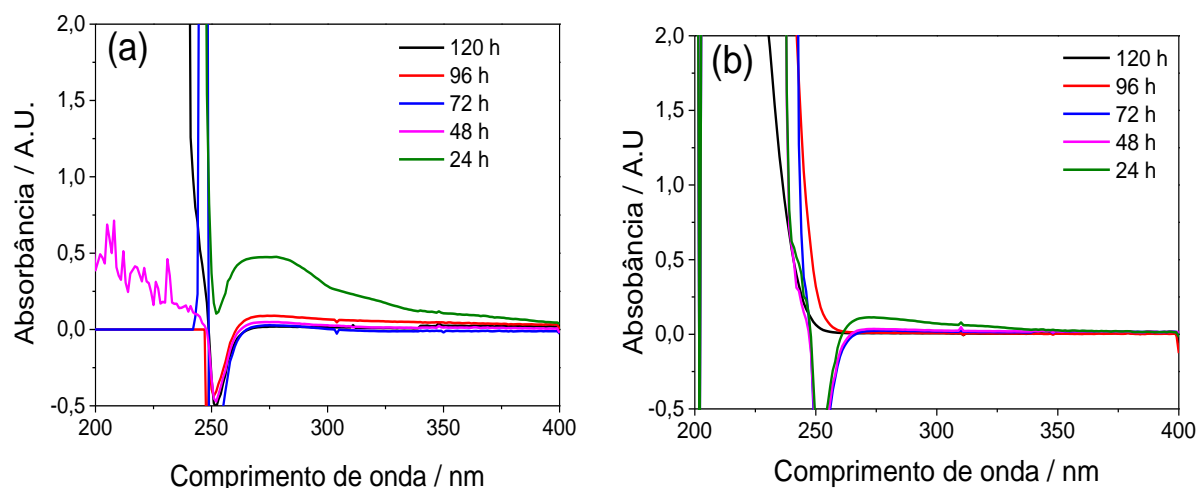
5.3 Síntese e otimização de síntese do MIP para VE

Inicialmente, testou-se o método de polimerização por aquecimento (termopolimerização), tal como descrito na seção 4.1.1. Entretanto, os resultados mostraram que o analito degradava na temperatura de síntese de 60°C, e desta forma, optou-se por mudar o método.

Assim, passou-se a realizar a síntese por fotopolimerização, utilizando neste caso radiação UV, tal como foi descrito na seção 4.1.2. Porém, nem todas as tentativas de síntese foram realizadas com sucesso. Dentre elas, o monômero estrutural até então utilizado, EDGMA, e o monômero funcional, 2-vinil-piridina, não reagiram, e nenhum polímero foi obtido. Assim sendo, ambos compostos foram substituídos, pelo TRIM (trimetilolpropano-trimetacrilato) e 1-vinilimidazol (MP16), que apresentou uma energia de interação de magnitude média, sendo menor do que a 2-vinilpiridina e maior do que a do ácido metacrílico. Obteve-se pelo método de *bulk* um polímero compacto e rígido, que não apresentava partículas de tamanho homogêneo. Visando obter partículas mais homogêneas, alterou-se o método de síntese para o de precipitação, que exige uma quantidade relativamente alta de solvente no meio reacional. Nesse caso, as partículas se precipitam e apresentam maior homogeneidade de tamanho. Adicionalmente, foram sintetizados MIPs com os monômeros funcionais ácido metacrílico e acrilonitrila e todos foram avaliados na extração do analito e caracterizados.

Com o intuito de verificar a eficiência de remoção do VE dos polímeros sintetizados, as soluções do solvente de lavagem foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis a cada 24 h, como mostra a Figura 13.

Figura 13 - Espectros de absorção na região ultravioleta para as soluções de limpeza do MIP (a) e do NIP (b) utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).



Fonte: autora do trabalho.

Como pode-se observar nos gráficos da lavagem, (Figura 13) a remoção da molécula molde ocorre a partir de 48 h, pois não é mais observada a banda correspondente ao analito (banda larga ao redor de 285 nm, que não aparece no espectro do NIP). Para garantir também a remoção total dos componentes da síntese que ficaram em excesso, o procedimento adotado de limpeza a partir de então para ambos os polímeros foi de 48 h; sendo as 24 primeiras utilizou-se uma solução de metanol: ácido acético na proporção 70/30 (v/v) e as últimas, 24 apenas metanol.

5.4 Caracterizações

5.4.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para caracterizar a estrutura do polímero molecularmente impresso, medidas espectrométricas no infravermelho com transformada de Fourier foram realizadas com o MIP e com cada um dos reagentes empregados para à sua síntese.

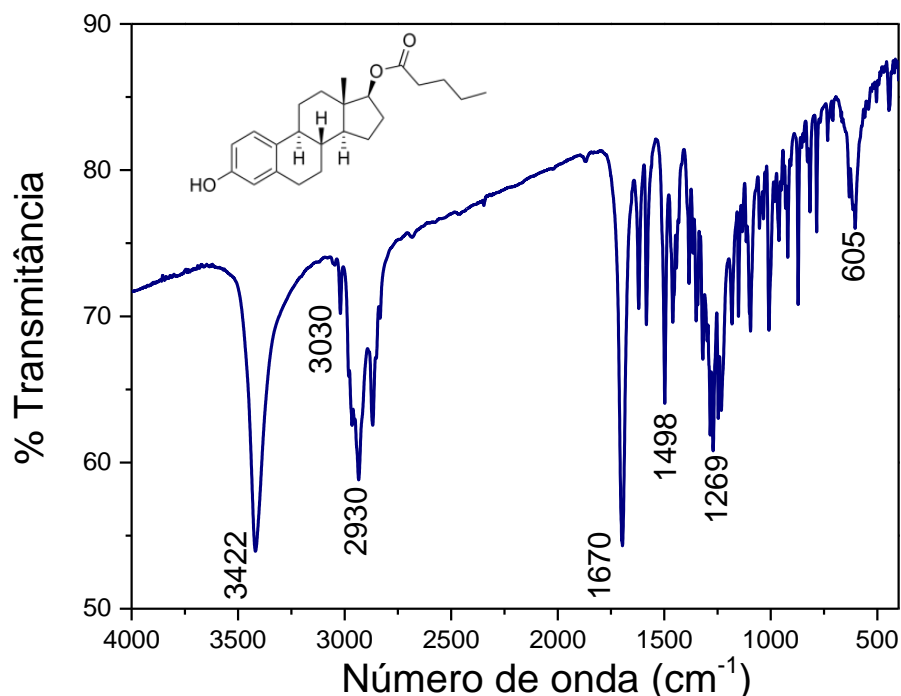
Os espectros na região do infravermelho por reflectância difusa (DR-FTIR) foram obtidas através da diluição da amostra em KBr na proporção de 10:1 (m/m).

As bandas observadas nos espectros provêm basicamente de vibrações de estiramento (ou deformação axial), representada por ν , ou de dobramento (deformação angular), representada por δ . As atribuições observadas estão detalhadas a seguir para cada espectro nas Tabelas 2 a 5, que contêm a estrutura de cada reagente envolvidos nas sínteses do MIP e de magneto-MIP.

5.4.1.1 Analito

A Figura 14 exibe as bandas de IV características do VE. A banda em 3422 cm^{-1} com estiramento do grupo carbonila e 1670 cm^{-1} e estiramentos C=C aromáticos. Em 3030 cm^{-1} , observa-se os estiramentos C-H sp^2 , e de 2970 até 2850 cm^{-1} , os estiramentos C-H sp^3 . O grupo éster é identificado pelas bandas em 1700 cm^{-1} (estiramento C=O da carbonila) e 1269 cm^{-1} (estiramento C-O).

Figura 14 - Espectros no FTIR para o valerato de estradiol.



Fonte: autora do trabalho.

5.4.1.2 Monômero funcional

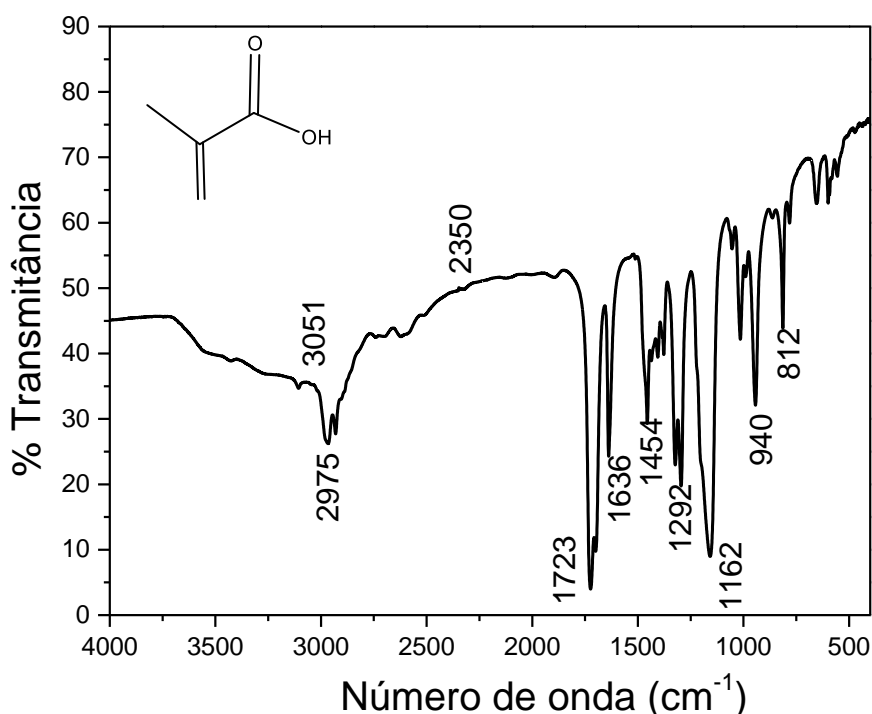
O monômero funcional mais adequado para a síntese, ou seja, aquele que pode interagir com os grupos funcionais do analito a fim de formar a cavidade seletiva, foi o

ácido metacrílico. As principais bandas nos espectros de FTIR do ácido metacrílico (Figura 15) são devido ao estiramento O-H entre 3100 e 2800 cm^{-1} e que se sobrepõe às absorções dos grupos C-H. A absorção mais forte do espectro corresponde à carbonila, em 1729 cm^{-1} (Figura 15). Em 3051 cm^{-1} observa-se os estiramentos C-H sp^2 e de 2970 até 2850 cm^{-1} os estiramentos C-H sp^3 . Em 2350 cm^{-1} o grupo CO_2 do grupo éster é identificado pelas bandas em 1723 cm^{-1} (estiramento C=O da carbonila) e 1636 cm^{-1} (estiramento ν C=C). Em 1454 cm^{-1} CH_2 , em 1454 cm^{-1} δ CH_3 , em 1292 cm^{-1} C-H, 1162 cm^{-1} , 940 cm^{-1} e 812 cm^{-1} δ OH fora do plano.

Tabela 2 - Atribuição das bandas do espectro de IV para o monômero funcional utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.

Principais bandas / cm^{-1}	3051	1723	1636	1292	1162,940 e 812
Atribuição	ν CH sp^3	ν C=C	CH_2	C-H	δ OH fora do plano

Figura 15 - Espectros no FTIR para o ácido metacrílico.



Fonte: autora do trabalho.

5.4.1.3 Monômero estrutural

O espectro FTIR do monômero estrutural TRIM, conforme observado na Figura 16, expõe todas as bandas devido a presença do éster, que são as mais intensas

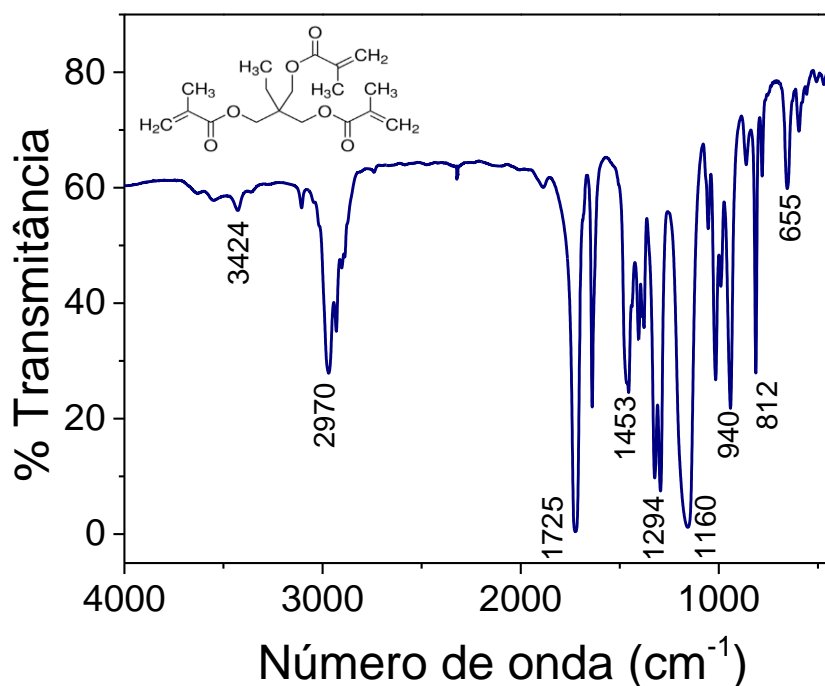
(1715 e 1290 cm^{-1}) e C-H sp^2 e sp^3 de estiramento e dobramento; além dos dobramentos angulares referentes às ligações duplas em 1453 cm^{-1} .

Em 3424 cm^{-1} observa-se os estiramentos C-H sp^2 e de 2970 até 2850 cm^{-1} , os estiramentos C-H sp^3 . O grupo C=O é identificado pelas bandas em 1725 cm^{-1} (estiramento C=O da carbonila) e 1140 cm^{-1} (estiramento C-O).

Tabela 3 - Atribuição das bandas do espectro de IV para o monômero estrutural (TRIM) utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.

Principais bandas / cm^{-1}	2970-2850	1725	1453	1294 e 1160	940, 812 e 655
Atribuição	ν CH sp^3	ν C=O	δ CH ₂	ν C-O	δ C-O fora do plano

Figura 16 - Espectros no FTIR para o TRIM.



Fonte: autora do trabalho.

5.4.1.4 Iniciador radicalar

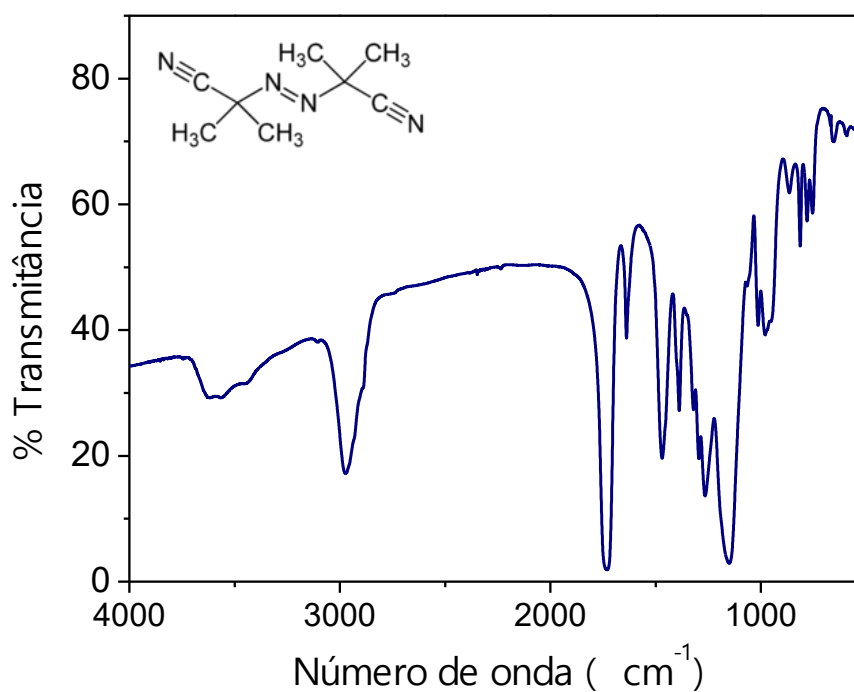
Na Figura 17 pode-se observar o espectro FTIR do iniciador radicalar em 2972 cm^{-1} há uma banda de estiramento C-H de intensidade fraca e seria banda de estiramento intensa em 1260 e 1148 cm^{-1} C-N, caracterizando a estrutura do iniciador radicalar (Figura 17). O grupo azo não apresenta absorção no infravermelho.

Tabela 4- Atribuição das bandas do espectro de IV para o iniciador radicalar (AIBN) utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.

Principais bandas /cm ⁻¹	2972	1469	1387	1260	1148
Atribuição	ν CH sp ³	δ CH ₂	δ CH ₃	ν C-N	

Fonte: autora do trabalho.

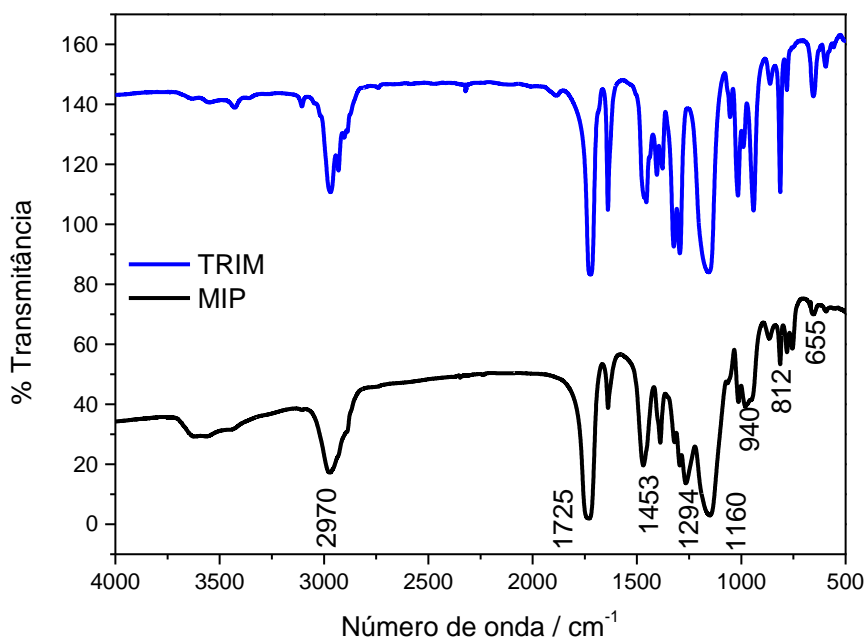
Figura 17 - Espectros no FTIR para o AIBN.



Fonte: autora do trabalho

Comparando os espectros de FTIR do TRIM e do MIP (Figura 18), observa-se que eles apresentam as mesmas bandas, exceto a banda, devido a presença do grupo C=C em 1636 cm⁻¹, onde ocorre a reação de polimerização.

Figura 18 - Comparação entre as bandas de FTIR do MIP com o TRIM, usado como monômero estrutural.

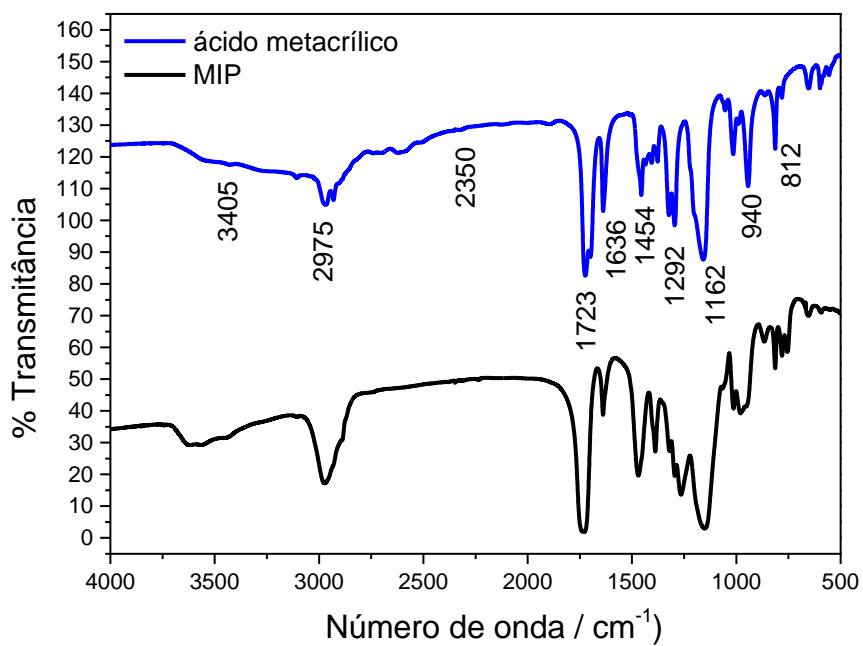


Fonte: autora do trabalho

Observa-se também nos espectros de FTIR do MIP e do TRIM, que a cadeia polimérica é constituída basicamente pelo monômero estrutural, pela semelhança entre ambos os espectros. Adicionalmente, em 2970 cm^{-1} conserva-se no espectro do MIP o estiramento axial de carbono sp^3 , em 1725 cm^{-1} identifica-se a carbonila do éster e 1160 cm^{-1} de estiramento C-O. Todas as transições devido aos grupos funcionais presentes no monômero estrutural também são observadas no espectro.

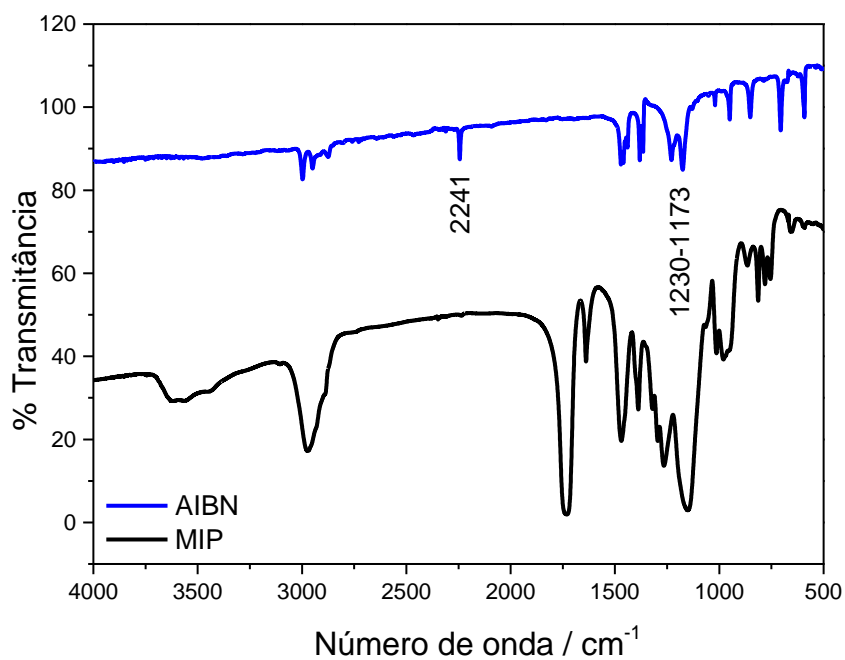
Como esperado, os espectros apresentam uma diminuição ou até o desaparecimento das bandas mais intensas do monômero funcional (Figura 19) e do iniciador radicalar (Figura 20), uma vez que o primeiro origina as cavidades seletivas e o segundo é consumido para iniciar a reação de polimerização. Além disso, a ausência de bandas correspondentes ao ácido metacrílico é devido à baixa concentração dele na amostra, que faz com que as intensidades das bandas do mesmo sejam pequenas e sobrepostas pelos outros reagentes.

Figura 19 - Comparação entre as bandas de FTIR do MIP com o ácido metacrílico, usado como monômero funcional.



Fonte: autora do trabalho

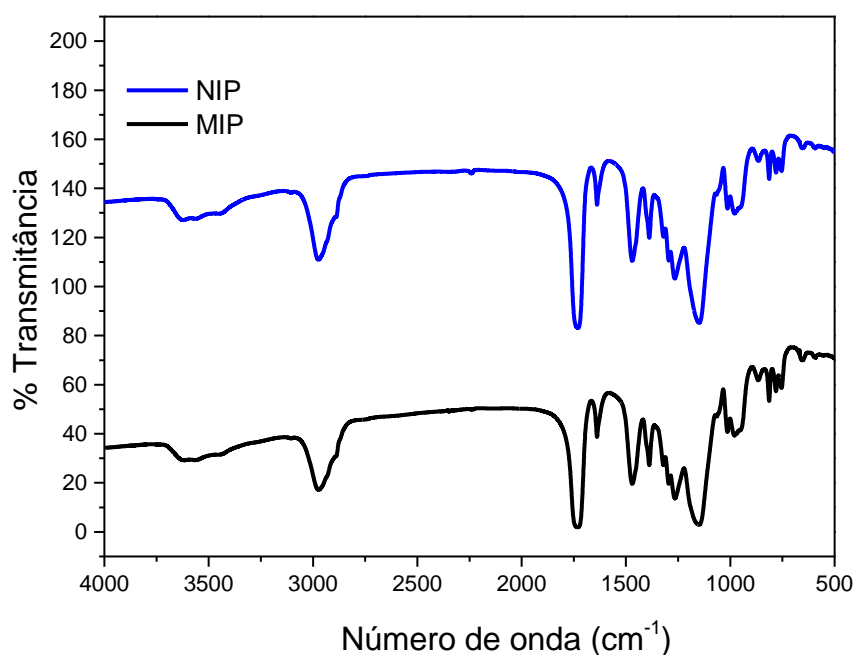
Figura 20 - Comparação entre as bandas de FTIR do MIP com o ácido metacrílico, usado como monômero funcional.



Fonte: autora do trabalho.

Ao analisar as bandas do NIP e do MIP, tanto o convencional quanto o magnético, Figura 21 e Figura 22, pode-se concluir que elas são as mesmas (ou seja, correspondem ao mesmo material), mudando apenas o valor de sua intensidade. Portanto, a cadeia polimérica do NIP também é constituída pelo monômero estrutural. Além disso, comparando os espectros, vê-se que o analito foi removido da cavidade seletiva do MIP, uma vez que as bandas correspondentes ao VE não estão presentes e os polímeros apresentam bandas idênticas.

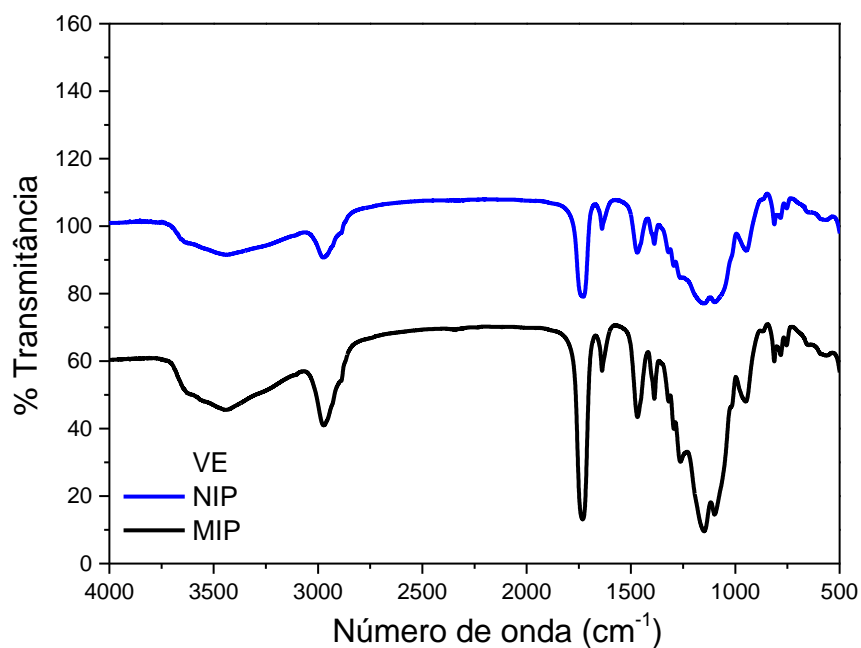
Figura 21 - Espectros no FTIR para MIP e NIP convencionais (não magnético).



Fonte: autora do trabalho.

Já para o magneto-MIP (MMIP) e o MIP convencional, apresentam bandas similares no FTIR uma vez que ambos são formados pelo mesmo polímero, com a diferença que no MMIP as nanopartículas magnéticas ficam confinadas no interior do material e, desta forma, não aparecem no espectro registrado. Estes resultados sugerem que o MMIP foi sintetizado com sucesso.

Figura 22 – Espectros no FTIR para MIP e NIP magnéticos utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).



Fonte: autora do trabalho.

Tabela 5 - Atribuição das bandas do espectro de FTIR para os reagentes utilizados nas sínteses e os diferentes tipos de polímeros.

Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)				
	VE	Ácido Metacrílico	TRIM	MIP/NIP Convencional	MIP/NIP Magnético
ν (OH)	3422	3051	3424	3628	3442
ν (CH)	2937	2975	2968	2971	2973
ν (C=O)	1699	1723	1750	1733	1723
ν (C=C)	1621	1636	1636	1636	1636
ν (CO) + δ (OH)	1497	1454	1453	1387	1466
ν C-O	1269	1162	1292	1140	1148
δ OH	872	940	812	811	942
δ =C-H fora do plano	-	-	-	970	-
ν (O-Si-O)	-	-	-	-	1095
ν (O-Si-O)	-	-	-	-	990
ν (Fe-O)	-	-	-	-	470

Fonte: PAVIA, D. L. et. al.

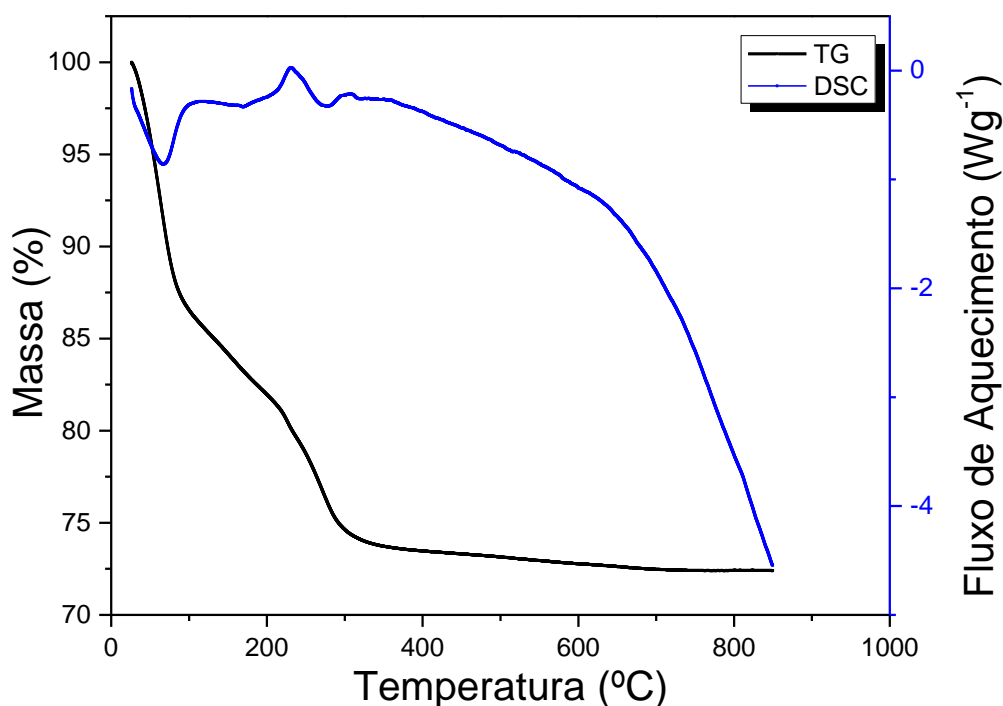
5.5 Análise termogravimétrica

Com o intuito de verificar a estabilidade térmica de todos os materiais sintetizados, realizaram-se análises termogravimétricas (TG) e de calorimetria diferencial exploratória (DSC).

Como mostra a Figura 23, as nanopartículas apresentam um efeito de perda de água adsorvida na sua estrutura ao redor de 100 °C, fenômeno exibido pelo pico endotérmico da DSC.

Além disso, a magnetita começa um processo de decomposição nessa temperatura, uma vez que há diminuição na quantidade de massa, de aproximadamente 15% a 100°C. Há a decomposição de quase 30% na temperatura de 300°C.

Figura 23 - Curvas de TG e DSC para as nanopartículas magnéticas.

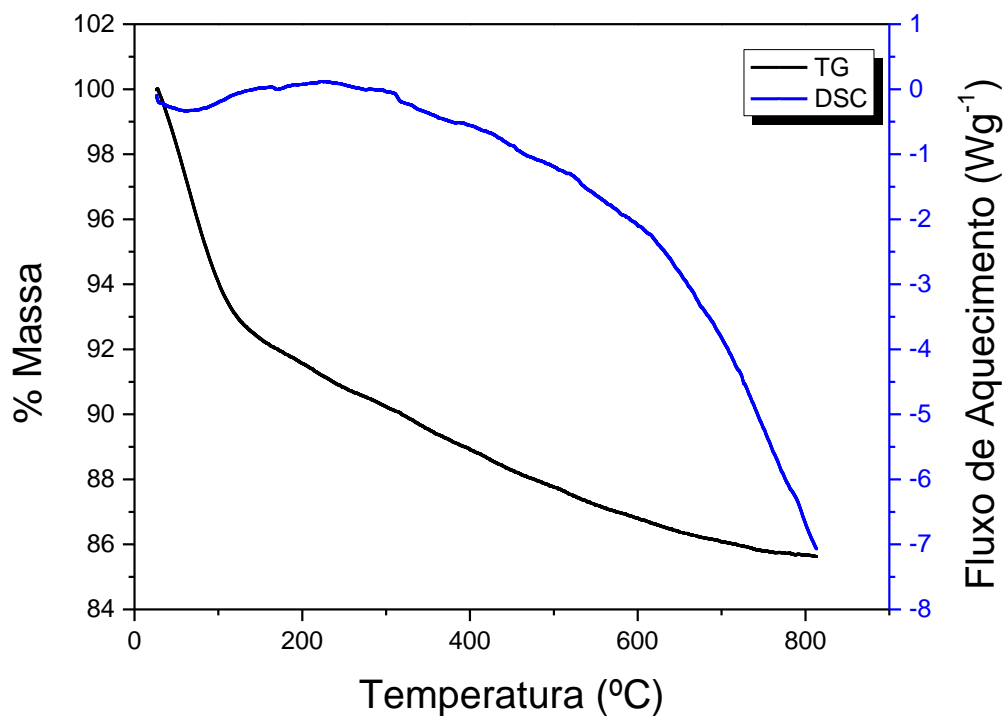


Fonte: autora do trabalho.

As curvas de TG e DSC para a segunda etapa de decomposição ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$; Figura 24) e a terceira etapa ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$; Figura 25) apresentam perfis semelhantes, uma vez que a composição majoritária de ambos é a mesma:

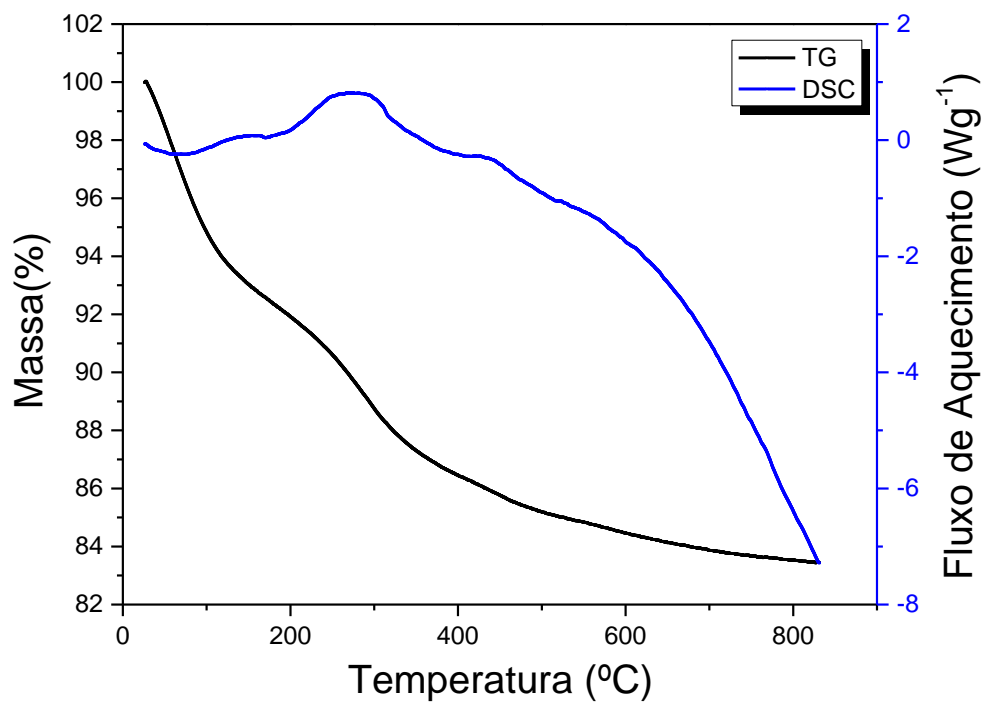
nanopartículas recoberta por sílica (SiO_2). Esses materiais apresentaram uma boa estabilidade, pois, com o aquecimento até 800°C , pode ser observada somente uma pequena diminuição na massa (aproximadamente 16 %) processos exotérmicos ou endotérmicos significativos.

Figura 24 - Curvas de TG e DSC para a segunda etapa da modificação das nanopartículas magnética com TEOS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$).



Fonte: autora do trabalho.

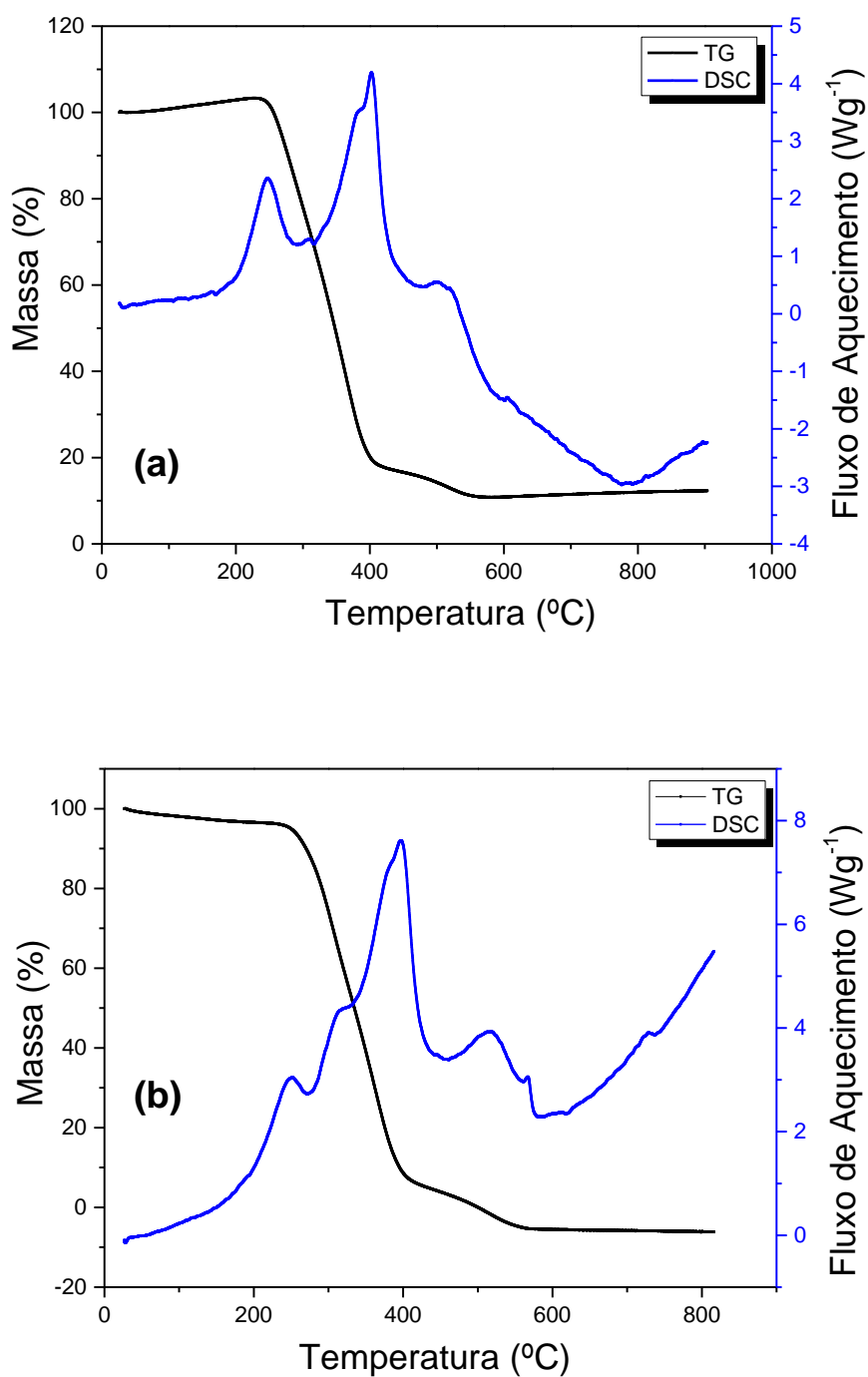
Figura 25 - Curvas de TG e DSC para a terceira etapa da modificação das nanopartículas magnética com MPS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$).



Fonte: autora do trabalho.

Como mostra a Figura 26, o MIP e o NIP convencionais (não magnéticos) são estáveis até aproximadamente 200°C, pois a partir dessa temperatura se inicia o processo de decomposição. A DSC apresenta uma característica típica para cada material já que ela mostra os processos exotérmicos e endotérmicos que ocorrem nos polímeros (IONASHIRO et al, 2014).

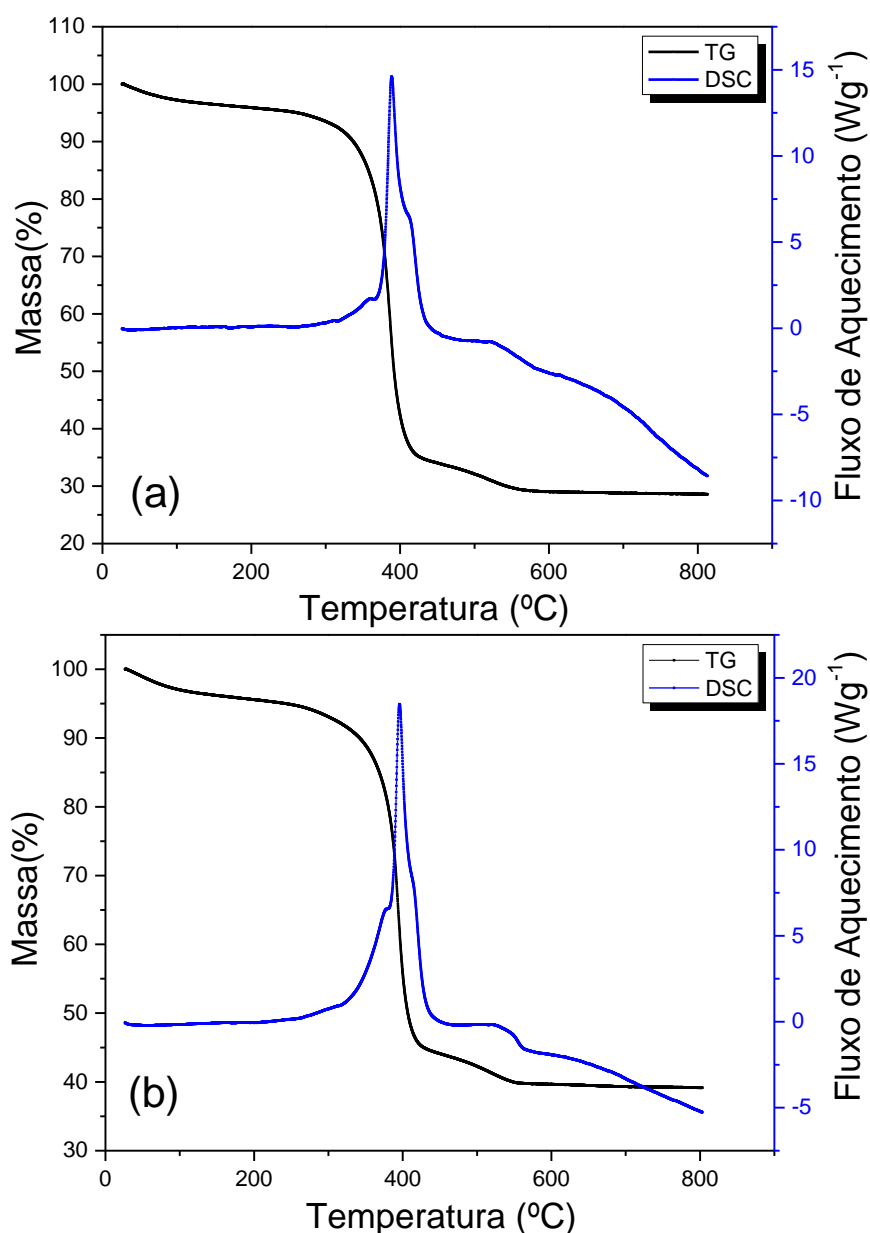
Figura 26 - Curvas de TG e DSC para a síntese do a) MIP e do b) NIP convencionais utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).



Fonte: autora do trabalho.

O magneto-MIP (MMIP) e o magneto-NIP (MNIP) apresentaram maior estabilidade, sem perda de massa significativa com o aumento da temperatura, provavelmente devido à presença de nanopartículas de magnetita, cuja temperatura de início de decomposição foi de 400°C e de um processo exotérmico em 600°C. Pôde-se observar também que a curva de DSC exibem perfis diferentes (Figura 27), uma vez que a presença das nanopartículas magnéticas leva à formação de materiais mais estáveis se comparados às curvas dos MIP convencionais, que sofrem de vários processos de decomposição.

Figura 27 - Curvas de TG e DSC para a síntese do a) MMIP e do b) MNIP utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).



Fonte: autora do trabalho

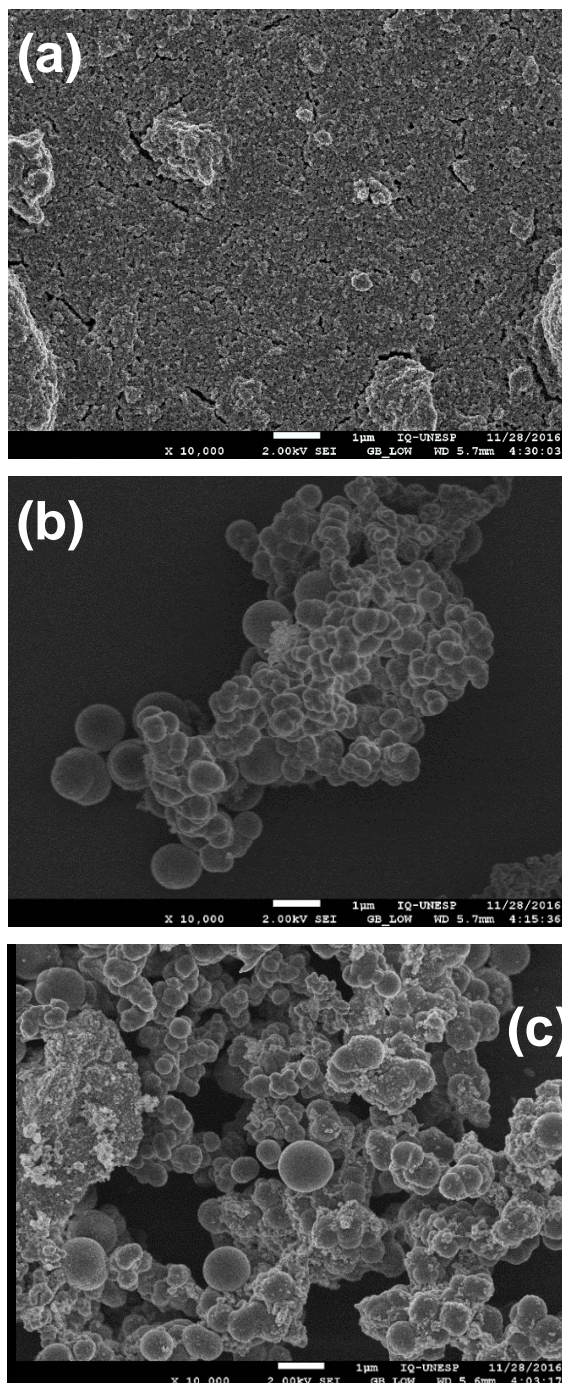
5.6 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Todos os polímeros sintetizados foram analisados por MEV-FEG com o intuito de observar diferenças na morfologia, distribuição e características superficiais das partículas.

Na Figura 28 pode-se observar as nanopartículas de magnetita obtidas nas três primeiras etapas antes da obtenção do MMIP. Na primeira etapa (a), as partículas estão bastante aglomeradas. Além disso, o aumento no tamanho das partículas em (b), deve-se ao recobrimento das mesmas pelo TEOS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), que, na terceira etapa (c), ao ser tratadas com MPS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$) aumenta ainda mais o tamanho devido ao processo de silanização (inserção de um grupo metacrílico).

Cabe ressaltar que a aglomeração das nanopartículas sugere um efeito de alta magnetização, apresentando o mesmo perfil de outros materiais sintetizados pelo grupo (UZURIAGA - SÁNCHEZ et al 2016).

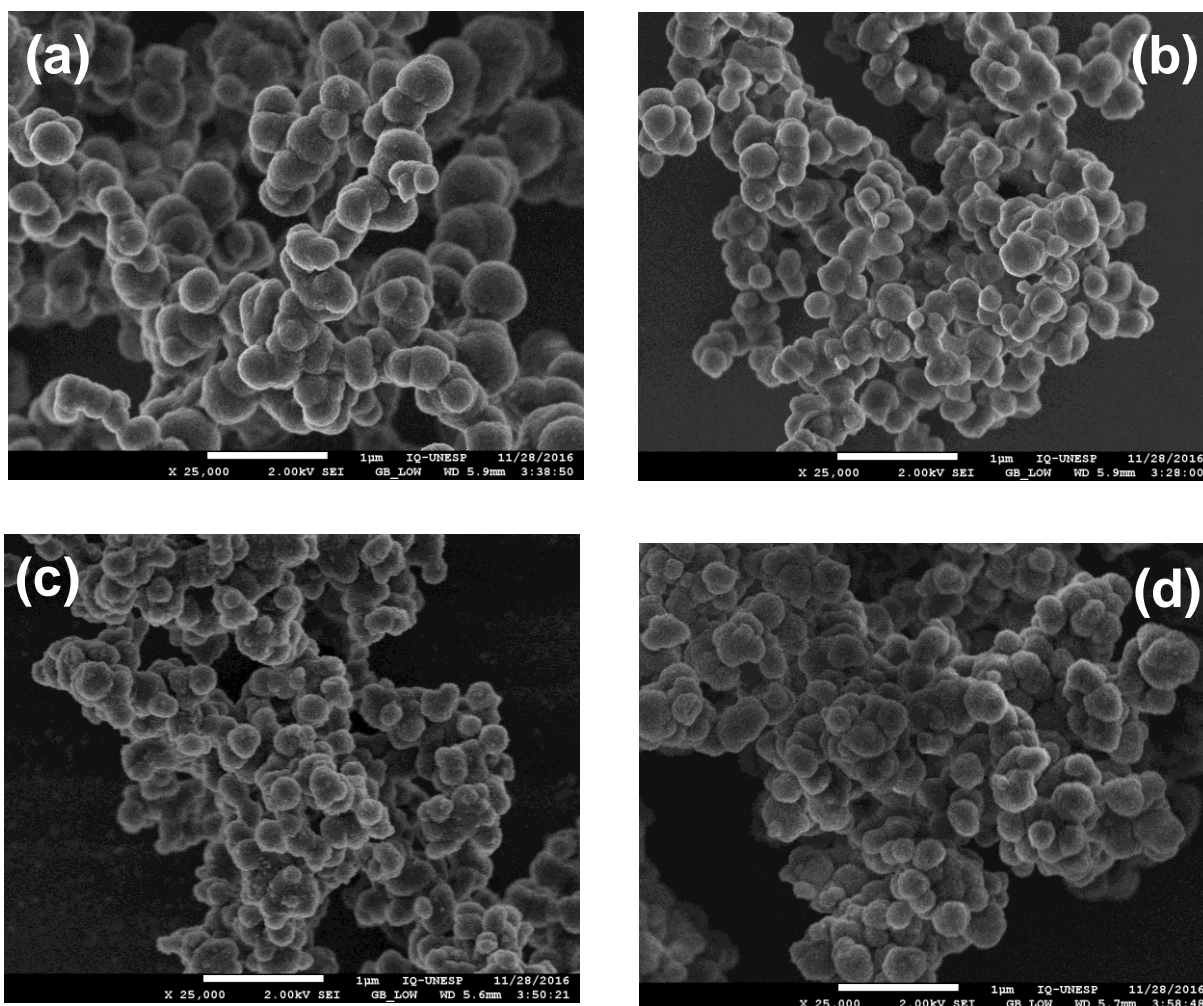
Figura 28 - Imagens de MEV-FEG com ampliação de 10.000X. a) magnetita; b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$; e c) ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-C=C}$).



Fonte: autora do trabalho

Pela Figura 29, pode-se observar que as partículas de MIP e NIP convencionais e das partículas híbridas apresentam um formato esférico e uniforme. Esse formato é o esperado pelo fato de as primeiras terem sido obtidas pelo método de precipitação e as híbridas, no formato *core@shell*.

Figura 29 - Imagens de MEV-FEG com ampliação de 25.000X. a) MIP convencional; b) NIP convencional; c) MIP magnético; d) NIP magnético; utilizando ácido metacrílico (monômero funcional) e TRIM (monômero estrutural).



Fonte: autora do trabalho.

5.7 Magnetometria de amostra vibrante (VSM)

É importante caracterizar tanto as nanopartículas de magnetita e os outros produtos (Fe_3O_4 ; $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS; $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MPS) quanto os polímeros magnéticos com o propósito de verificar se há conservação das propriedades magnéticas após as diversas modificações.

Na Figura 31 é possível observar que para Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MPS, MMIP e MNIP, não é observada histerese e nem magnetização remanescente, como esperado para materiais superparamagnéticos (SODIPO et al.,

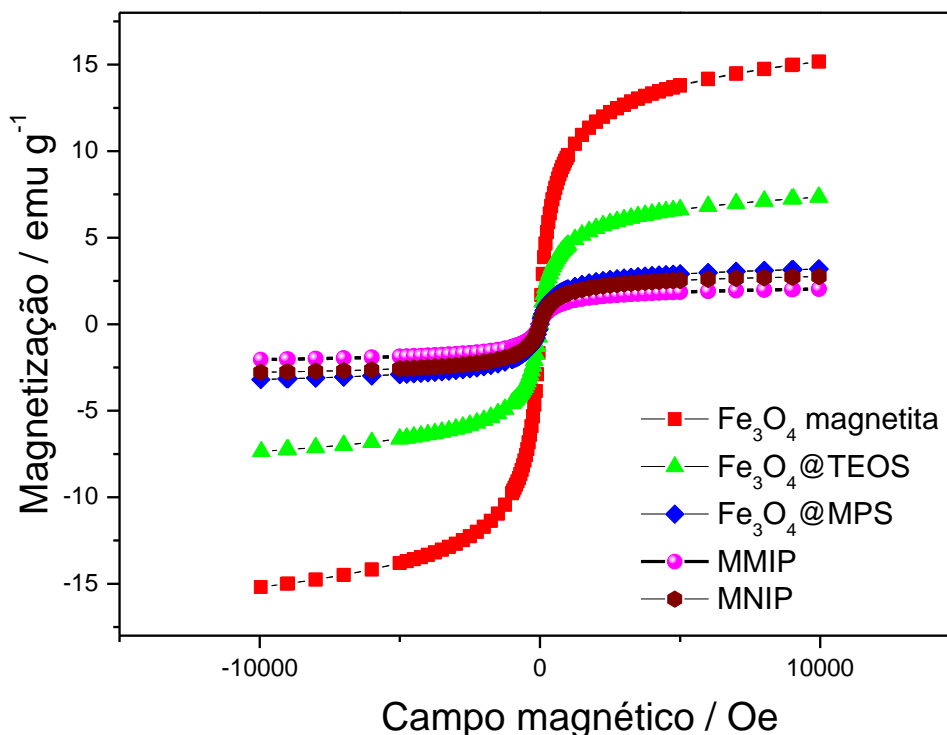
2016). No entanto, é possível visualizar uma queda nos valores de magnetização de saturação. Para a magnetita (Fe_3O_4), há um valor de aproximadamente $15,0 \text{ emu g}^{-1}$, enquanto que para o MMIP, esse valor cai para $2,0 \text{ emu g}^{-1}$. Isso pode ser explicado pelo recobrimento da nanopartícula, inicialmente, com TEOS, em seguida, com MPS e finalmente com o polímero (MIP/NIP). Portanto, há diminuição na força em uma maior quantidade de polímero e conseqüente maior recobrimento da nanopartícula magnética. No entanto, foi observado, durante a realização dos experimentos, que o material continua fortemente magnético, sendo separado de maneira eficiente da solução utilizando-se um ímã de neodímio (Figura 30).

Figura 30 – Nanopartícula na ausência e presença de campo magnético.



Fonte: autora do trabalho.

Figura 31 - Curvas de histerese magnética para Fe_3O_4 magnetita; $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS; $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MPS, MMIP e MNIP.



Fonte: autora do trabalho

5.8 Análise pelo método BET da adsorção e dessorção de N_2 dos polímeros magnéticos

Um dos principais parâmetros a ser avaliado quando se sintetiza polímeros impressos é a sua porosidade, pois o volume do poro e a área superficial mostrarão a principal diferença entre o MIP e o NIP. Os poros consistem em cavidades seletivas para o analito presente na estrutura do MIP, e que é responsável pelo reconhecimento molecular.

A técnica de adsorção/dessorção de N_2 usando a isoterma de BET foi utilizada para verificar a formação e o tamanho dos poros dos polímeros pela medida de área superficial, uma vez que uma maior área é diretamente proporcional à quantidade de cavidades formadas.

Pela Tabela 6 pode-se visualizar que o MIP e o NIP convencionais apresentam valores próximos áreas superficiais, porém os polímeros magnéticos possuem valores bem distintos de áreas. Isso ocorre porque o polímero é sintetizado sobre uma superfície nanométrica, o que deixa as cavidades seletivas mais expostas.

Tabela 6 - Resultados da porosidade obtidos através das isotermas de adsorção (BET) para as amostras MIP e NIP convencionais e magnéticos para o VE sintetizados por fotopolimerização.

Material	Área superficial / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Volume médio de poros / $\text{cm}^{-3} \text{g}^{-1}$	Tamanho dos poros / nm
MIP	18,38	0,025	8,9
NIP	16,03	0,026	11,8
Magneto-MIP	41,19	0,081	8,1
Magneto-NIP	23,42	0,055	10,6

Fonte: autora do trabalho.

Os polímeros convencionais, MIP e NIP não apresentaram tanta diferença nos valores dos volumes médios dos poros. No caso dos materiais magnéticos, pôde-se observar, atribuindo isto à formação das cavidades seletivas, uma vez que são diferentes ao tamanho de poro apresentado pelos polímeros não impressos. A maior área superficial para o MMIP, atribui-se às cavidades seletivas na superfície do material. No caso do MIP, as cavidades se encontram confinadas no mesmo. Em todos os casos, o tamanho de poro indica que se trata de materiais mesoporosos, com tamanhos variando entre 2 e 50 nm (MARESTONI et al, 2016).

5.9 Avaliação da eficiência do MIP sintetizado por meio de experimentos de afinidade

Depois de sintetizados e lavados adequadamente, os diversos MIPs (com diferentes monômeros funcionais) tiveram suas eficiências avaliadas pela capacidade de se religar ao VE. Antes da análise de afinidade propriamente dita, foram avaliados alguns parâmetros, tais como concentração do hormônio e melhor solvente para religação do analito ao polímero.

5.9.1 Estudos de afinidade dos MIP pelo VE

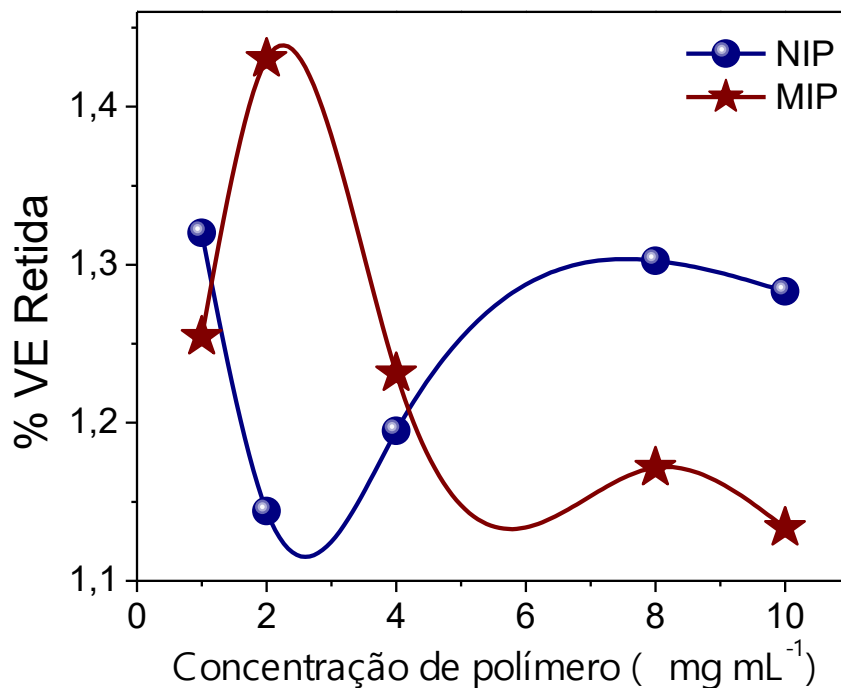
Para escolher o melhor MIP, foi realizada a avaliação da eficiência de retenção do analito pelos polímeros através de estudos de ligação. Neste sentido, também foram realizados estudos para avaliação da especificidade de ligação do MIP para VE em relação ao NIP. Estudos sobre a eficiência de retenção do polímero e o seu fator

de impressão (especificidade do MIP frente ao NIP em função de sua cavidade molecular) foram realizados por meio de análises em diferentes solventes a fim de verificar qual a influência deste parâmetro no reconhecimento do MIP pelo analito.

5.9.1.1 Primeira Metodologia

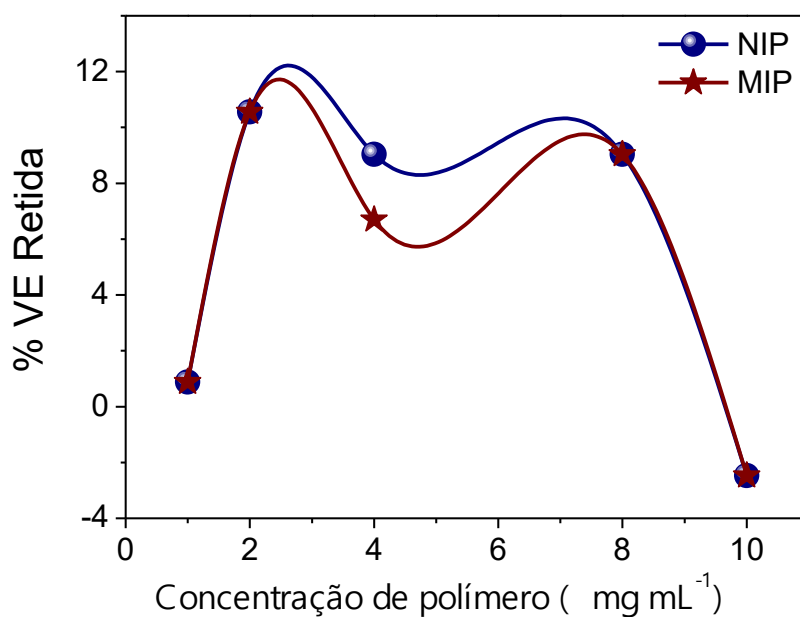
É possível analisar, segundo as Figura 32 e Figura 33, que a porcentagem de VE retida para o monômero ácido metacrílico foi muito pequena, menos de 1,5% e que não houve diferença significativa nas curvas de retenção do MIP e NIP. Quando se utilizou o monômero 1-vinil-imidazol, a diferença entre MIP e NIP foi menor ainda se comparada com o ácido metacrílico, embora a porcentagem de retenção tenha sido maior, ao redor de 11%. No entanto, esse valor ainda é muito pequeno e a diferença de retenção entre os dois polímeros não é a adequada. Desta forma, foi avaliada uma outra condição, que será descrita no item a seguir.

Figura 32 - Estudo de ligação no solvente metanol entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional ácido metacrílico.



Fonte: autora do trabalho.

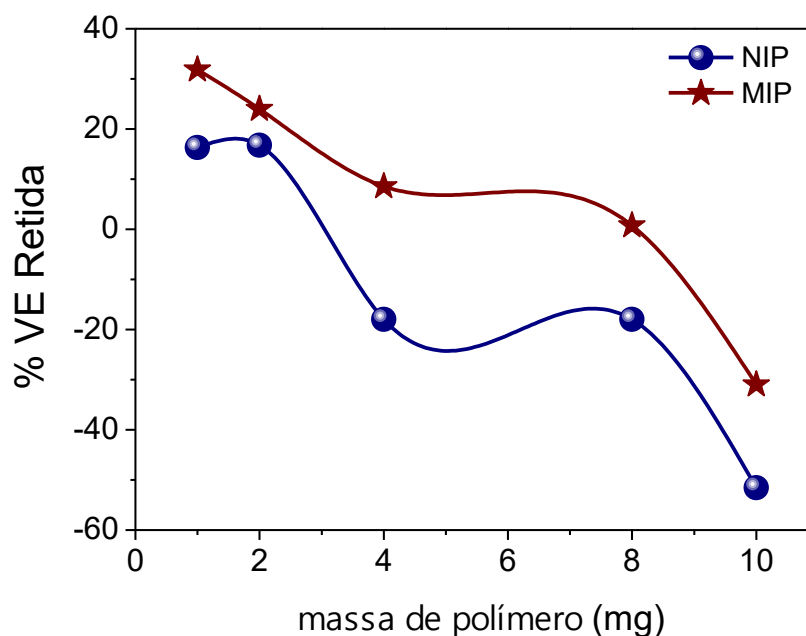
Figura 33 - Estudo de ligação no solvente metanol entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional 1-vinil-imidazol.



Fonte: autora do trabalho.

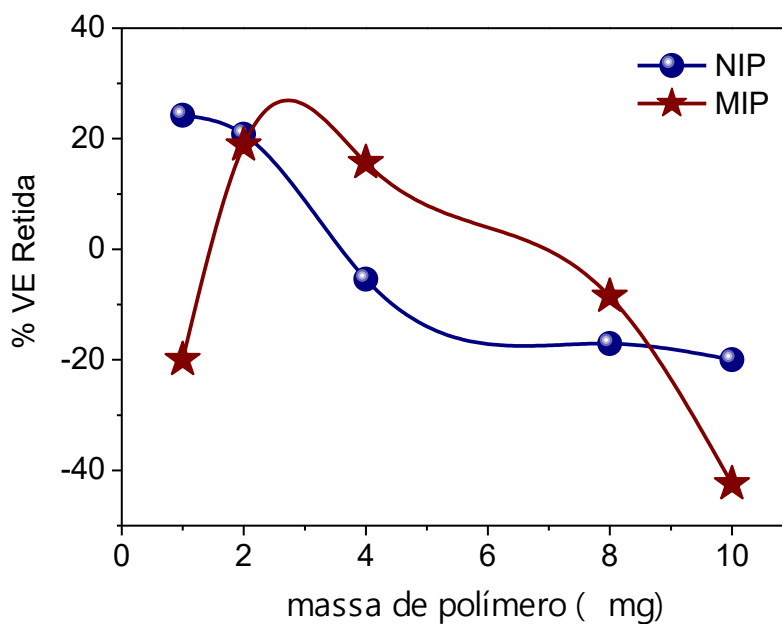
Nos estudos realizados no solvente acetonitrila, pode-se observar, nas Figura 34 e Figura 35, que a porcentagem de VE retida, tanto para o monômero ácido metacrílico quanto para o 1-vinil-imidazol, no solvente acetonitrila, foi maior, cerca de 30%, mas decaiu com o aumento da concentração. Não foi possível fazer a avaliação desse resultado valores maiores do que 10 mg de polímero. Adicionalmente, houve apenas uma pequena diferença entre MIP e NIP. Este resultado observado, se deve a que segundo estudos exploratórios neste trabalho, verificou-se que o VE se degradava neste solvente.

Figura 34 - Estudo de ligação no solvente orgânico *acetonitrila* entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional **ácido metacrílico**.



Fonte: autora do trabalho.

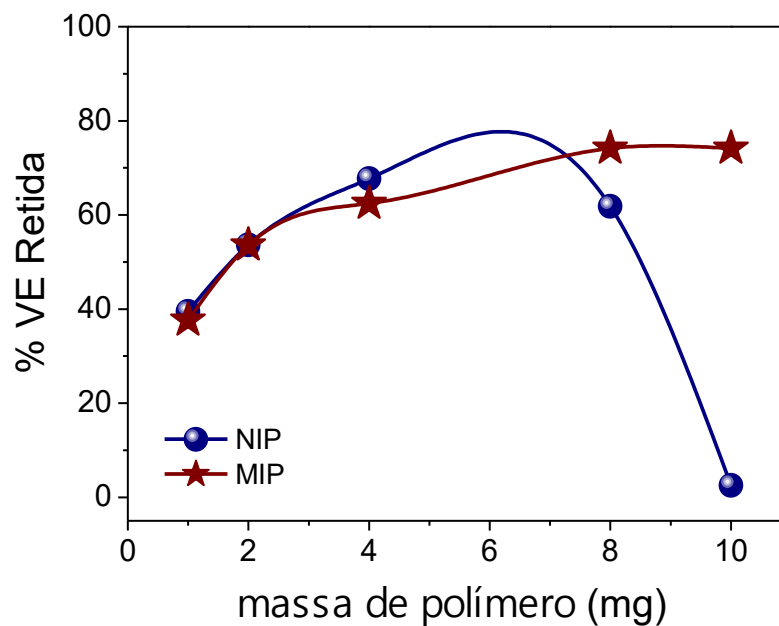
Figura 35 - Estudo de ligação no solvente orgânico acetonitrila entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o monômero funcional **1-vinil-imidazol**.



Fonte: autora do trabalho.

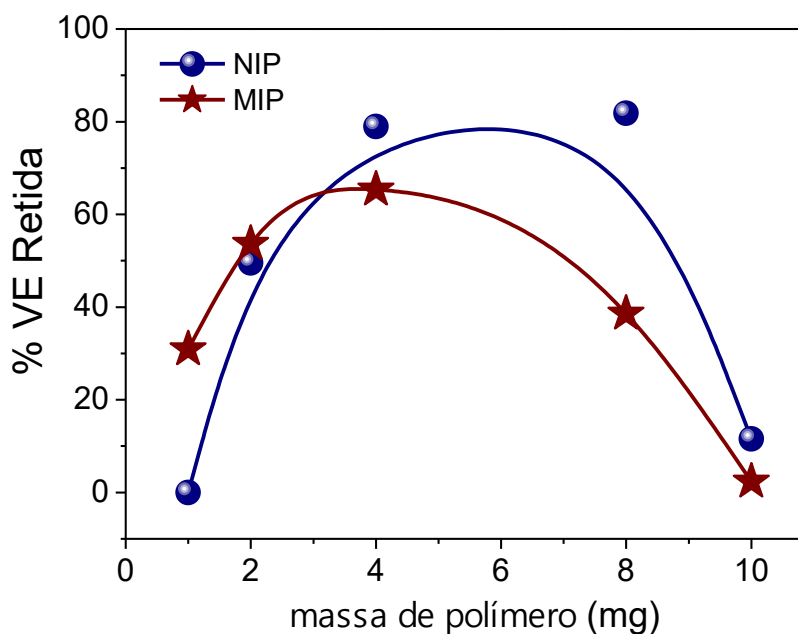
Quando foi avaliado o etanol como solvente de extração, pode-se observar, segundo as Figura 36 e figura 37 que a porcentagem de VE retida no MIP sintetizado usando o monômero ácido metacrílico foi maior, de até 80% e se manteve constante. Com o aumento da concentração, a diferença de retenção entre os polímeros aumentou. Inicialmente, para o monômero 1-vinilimidazol é observado o mesmo comportamento, no entanto, em 10 mg de polímero, tanto MIP quanto NIP, houve uma diminuição na porcentagem de retenção.

Figura 36 - Estudo de ligação no solvente orgânico *etanol* entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o **monômero funcional ácido metacrílico**.



Fonte: autora do trabalho.

Figura 37 - Estudo de ligação no solvente orgânico *etanol* entre o valerato de estradiol e o polímero sintetizado por fotopolimerização com o **monômero funcional 1-vinil-imidazol**.



Fonte: autora do trabalho

Os resultados da Figura 36, por serem promissores, mostraram que era importante explorar estes experimentos com maiores detalhes. Assim, foi aumentada

a quantidade de polímero para verificar se ocorria alguma diferença entre os polímeros impressos e não impressos utilizando uma maior quantidade de massa. Desta forma, passou-se a avaliar a segunda Metodologia, descrita no item 4.3 da parte Experimental.

5.9.1.2 Segunda Metodologia

Ao utilizar uma maior quantidade em massa dos polímeros, como é possível observar nos cromatogramas da Figura 38, tanto para o MIP quanto para o NIP, a intensidade dos picos permanecia igual, indicando que não houve retenção nem diferenciação dos polímeros pelo analito. Uma vez que não houve mudança, concluiu-se que o problema era utilizar o solvente puro, assim, realizou-se um estudo de solubilidade para os ensaios de ligação em misturas de solventes.

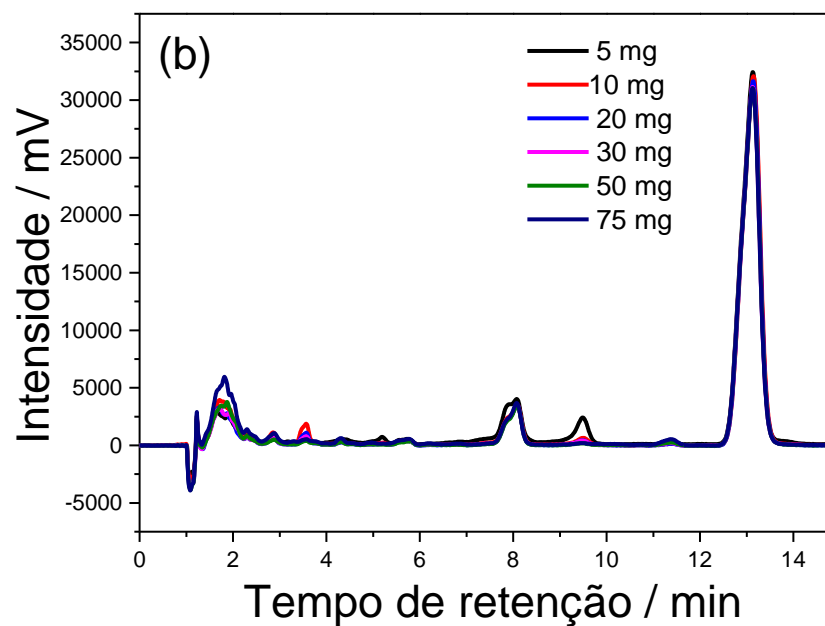
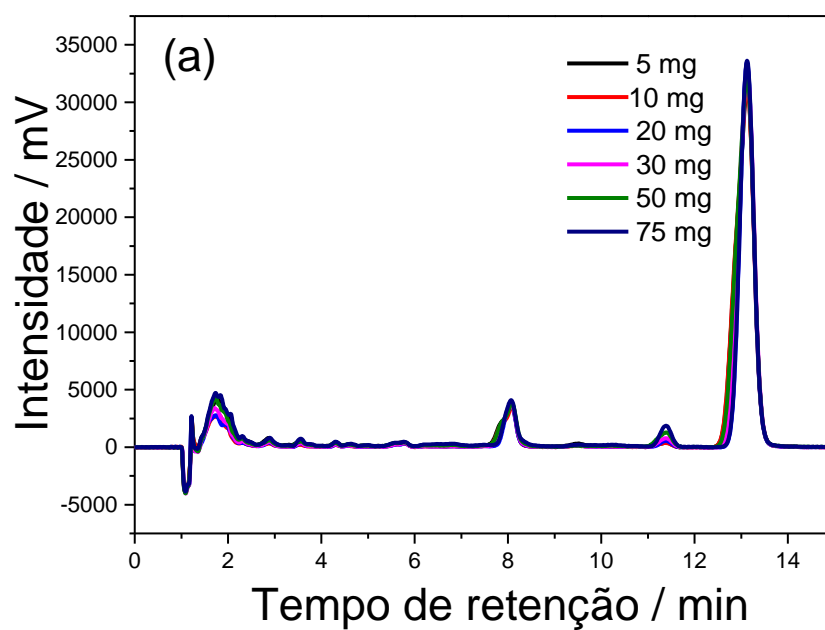
Mantendo as proporções da síntese, utilizou-se uma concentração de 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do hormônio e testou-se as seguintes proporções de solventes (Tabela 7), em um volume final de 25 mL.

Tabela 7 - Proporções utilizadas no estudo da solubilidade do VE (v/v).

Solução	H₂O	Etanol
1	10	90
2	30	70
3	70	30
4	90	10
5	50	50

Fonte: autora do trabalho.

Figura 38 – Cromatogramas para o MIP (a) e NIP (b) preparados com ácido metacrílico e TRIM (monômero funcional e estrutural, respectivamente) em diferentes concentrações.



Fonte: autora do trabalho.

Como observado na Figura 39, o hormônio se mostrou solúvel nas soluções 1, 2 e 5 já que não é solúvel em água, e nestas proporções a quantidade de água era menor.

Figura 39 - Foto das soluções preparadas de acordo com a Tabela 3 para avaliação da solubilidade do VE.

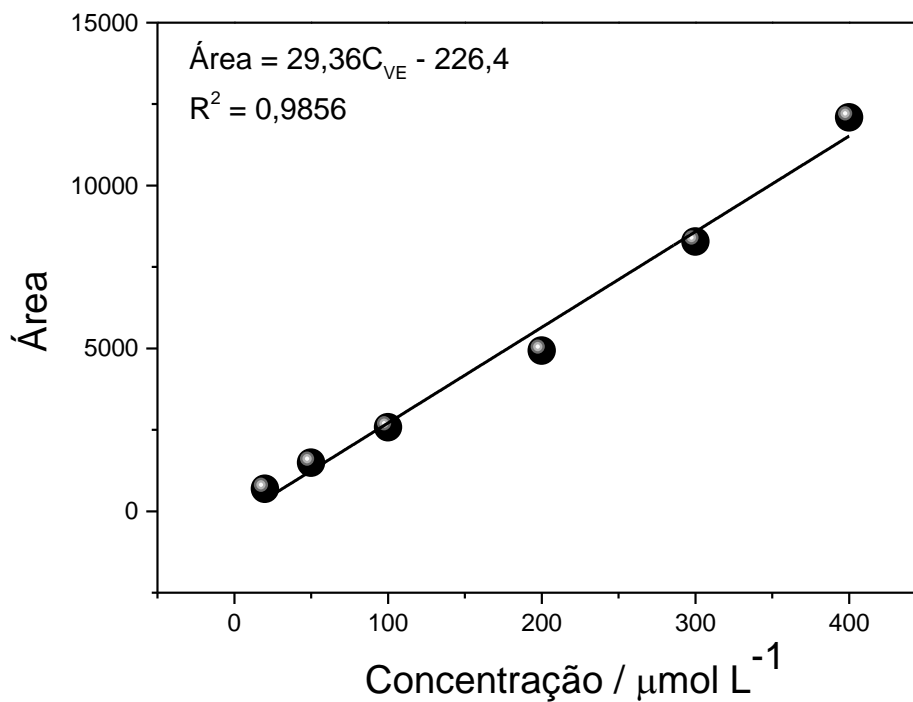


Fonte: autora do trabalho.

Assim, uma vez que se mudou a proporção dos solventes, foi construída uma nova curva analítica (Figura 40), onde se observa que a concentração até então utilizada de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ não estava mais dentro da faixa de linearidade (até a concentração de $400 \mu\text{mol L}^{-1}$). Desta forma, novos estudos de adsorção foram realizados usando $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de VE.

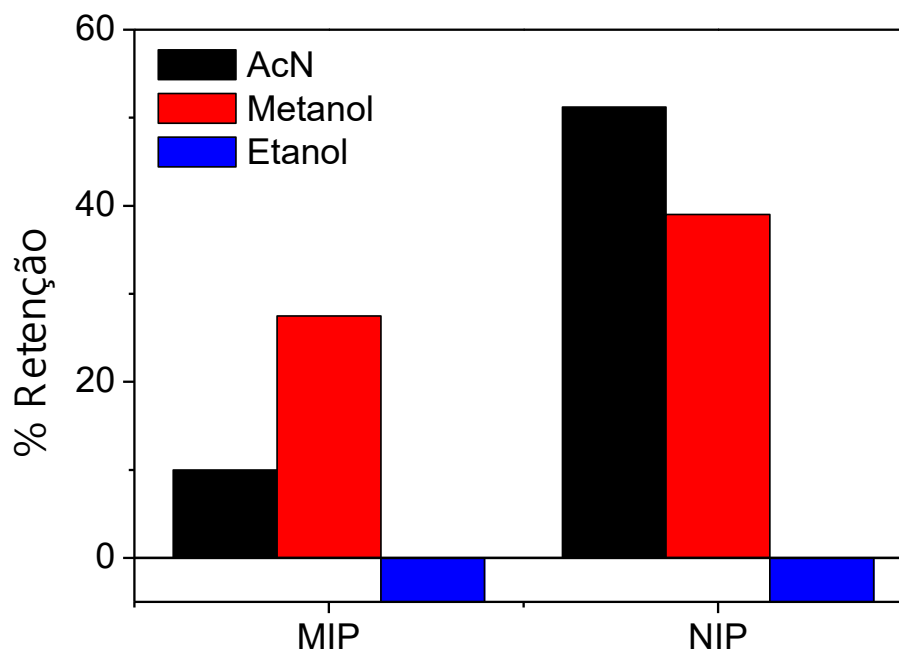
Observando a Figura 41, é possível concluir que a fase orgânica pura não leva a uma boa porcentagem de retenção com NIP apresentando maiores valores do que MIP.

Figura 40 - Curva analítica para proporção etanol/água (50/50-v/v) como solvente.



Fonte: autora do trabalho.

Figura 41 - Porcentagem retenção de cada MMIP/MNIP para valerato de estradiol ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) com diferentes solventes orgânicos (acetonitrila, metanol e etanol).

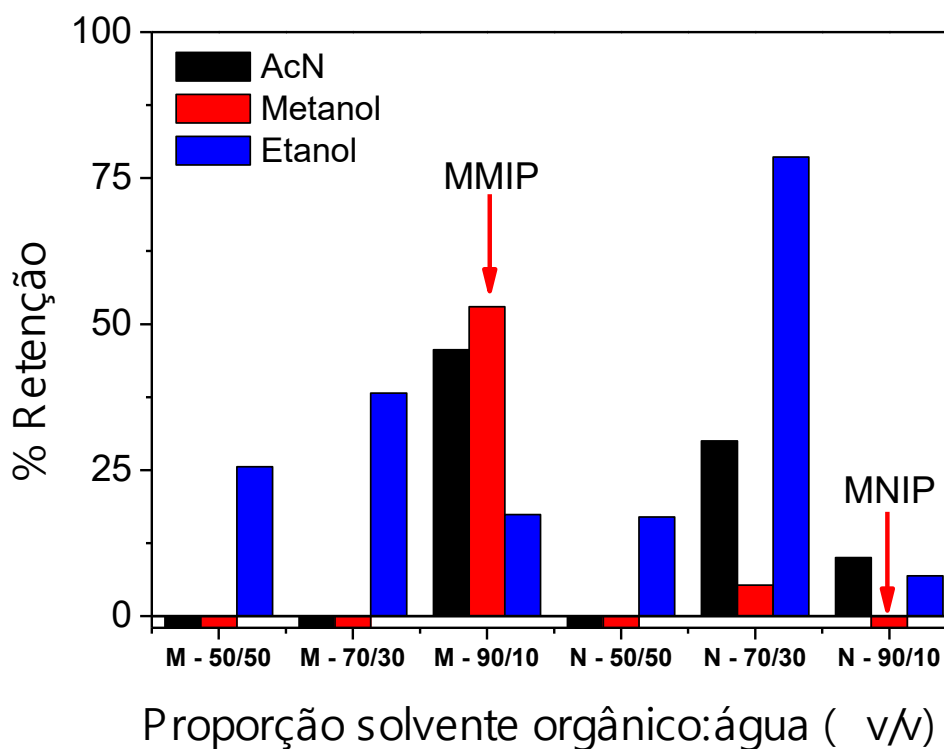


Polímeros em diferentes solventes orgânicos

Fonte: autora do trabalho.

Já nas proporções de fase orgânica com água (Figura 42), pode-se concluir que a melhor proporção foi a de 90/10-v/v metanol/água, pois tem-se uma boa porcentagem de retenção (53 %), além de uma excelente diferenciação entre MMIP e MNIP. Para o MNIP, que a porcentagem de retenção foi zero. Desta forma, esta foi a mistura de extração usada para os demais experimentos.

Figura 42 - Porcentagem de retenção de MMIP/MNIP pelo valerato de estradiol ($150 \mu\text{molL}^{-1}$) em diferentes proporções de solvente orgânico (acetonitrila, metanol ou etanol) e água (orgânico: água, v/v nas proporções 50/50, 70/30 e 90/10-v/v). M=0,27 mg



Fonte: autora do trabalho

5.9.2 Avaliação da quantidade de massa para estudos de afinidade usando os polímeros magnéticos

Com a proporção do MIP convencional otimizada (ácido metacrílico como monômero funcional e na proporção 50/50 etanol/água (v/v) seguiu-se com a otimização dos polímeros magnéticos. A concentração do VE foi reduzida ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$), pois, como observou na curva analítica da Figura 39, a concentração a ser usada estava muito alta.

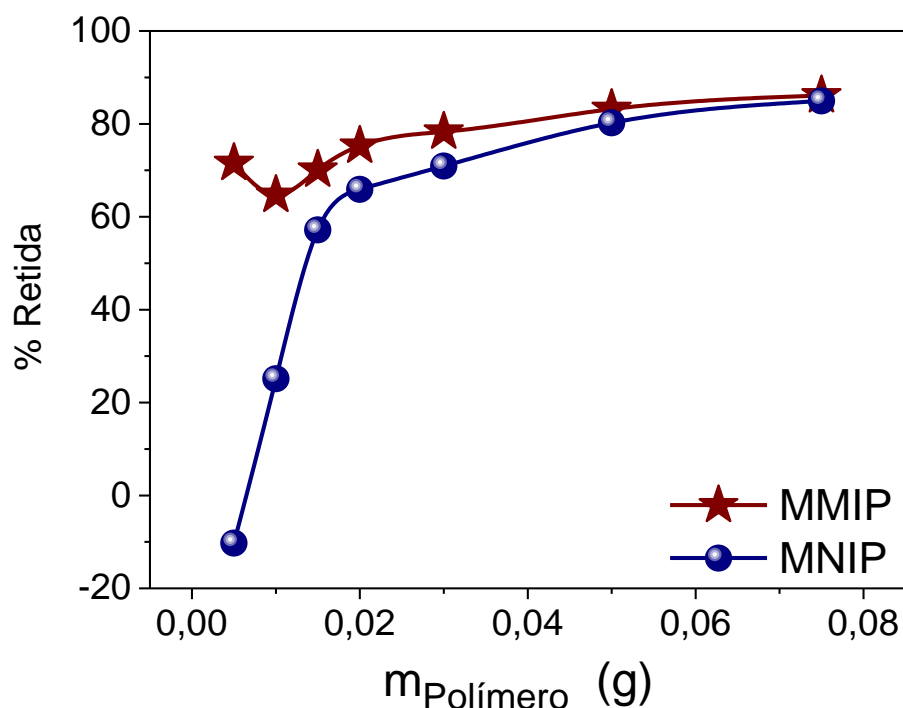
Como descrito na seção experimental, foi realizada inicialmente a síntese de nanopartículas pelo método de co-precipitação e, depois, a sua modificação com o

MIP, em um formato core@shell. Na modificação da superfície das nanopartículas, o TEOS é responsável por revesti-las com uma camada de sílica. Em meio básico, o TEOS forma tetra-hidróxido de silício $[\text{Si}(\text{OH})_4]$, que contém grupos silanóis (SiOH). Esses grupos silanóis polimerizam por condensação formando uma estrutura tridimensional que se liga à superfície da nanopartícula, recobrando-a. O MPS foi utilizado a fim de funcionalizar as nanopartículas com a inserção de um grupo metacrílico; por meio de uma reação de silanização. Posteriormente, as nanopartículas foram recobertas pelo MIP/NIP por fotopolimerização dando origem ao magneto-MIP/NIP.

Com o intuito de maximizar a retenção do VE no MMIP e MNIP, foram otimizadas diferentes condições de reação: tempo de interação para atingir o equilíbrio, solvente de ligação e massa adsorvente. Em todas as etapas, as quantificações foram realizadas por HPLC.

O segundo procedimento estudado foi a dosagem da massa do polímero para reconhecimento do VE, com variação de massa de 5,0 mg até 75,0 mg e concentração de VE fixa em 20,0 mg ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); cujo resultado é apresentado na Figura 43.

Figura 43 – Avaliação de dosagem da massa de MIP e NIP (5,0 até 75,0 mg de polímeros) para interação com solução de VE ($300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).



Fonte: autora do trabalho.

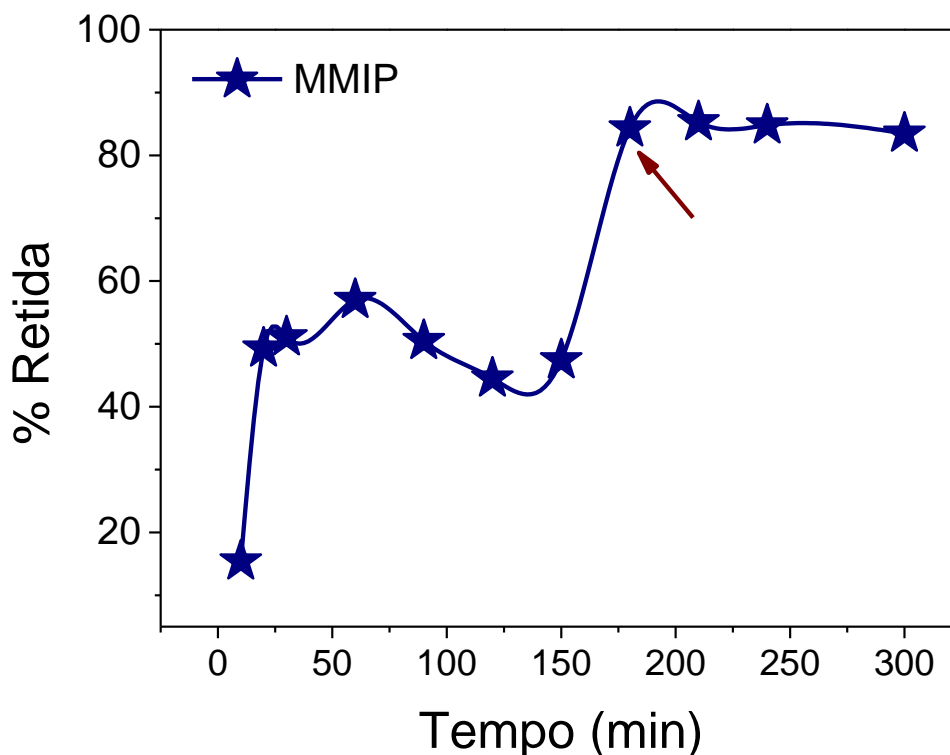
O estudo da variação de massa mostrou que a porcentagem de retenção do VE permaneceu praticamente constante, de 20,0 até 75,0 mg para o MNIP, entretanto para o MMIP a melhor diferença em relação ao MNIP é em 5 mg.

Porém, a massa escolhida para trabalhar foi de 20,0 mg (onde a retenção era maior) pois a partir desta a retenção foi máxima e, a partir desse valor, mesmo com o aumento da quantidade de massa não houve mudança significativa na quantidade retida.

5.9.3 Otimização do tempo de interação polímero - VE

O experimento (Figura 44) realizado foi para avaliar o melhor tempo de interação entre o analito e o polímero, ou seja, o tempo de equilíbrio; ocorre a adsorção da maior quantidade de VE no MMIP. Estudou-se tempos entre 10 min e 300 min, sendo fixada a massa em 20,0 mg e à concentração de VE $300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em uma mistura água/etanol na proporção 50/50-v/v.

Figura 44 - Avaliação do tempo MMIP e MNIP (20 mg de polímero) para interação com solução de VE ($300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).



Fonte: autora do trabalho.

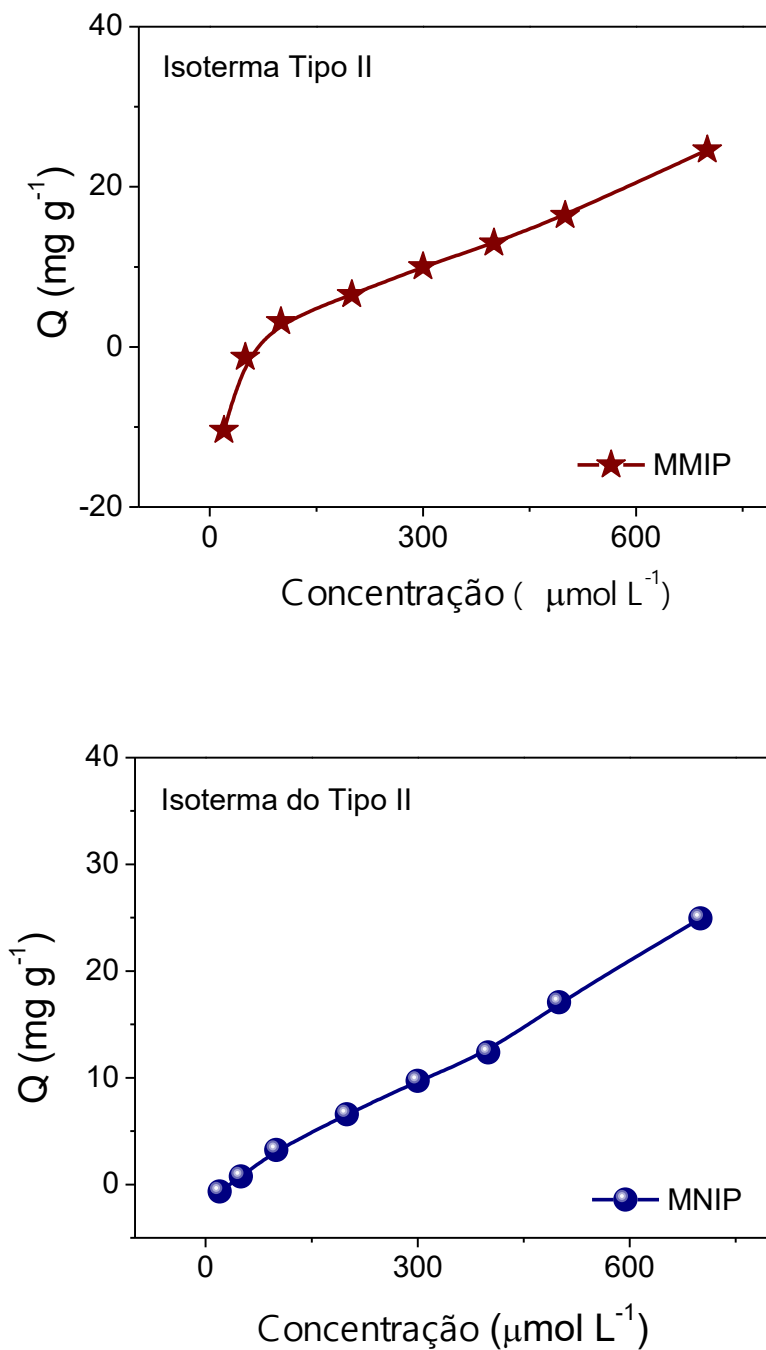
Pode-se observar que o melhor resultado foi o tempo de interação de 180 min porque a retenção, além de tornar-se estável, foi máxima (cerca de 85%). Outra observação interessante a diferença no salto de % de retenção, entre 150 e 180 min, isso atingido o tempo de equilíbrio de adsorção máxima (PORPINO, 2009).

5.10 Caracterização dos polímeros por experimentos de afinidade por meio da análise de isotermas de adsorção

A isoterma de adsorção representa a quantidade de determinado soluto adsorvido por uma superfície adsorvente. Esse ensaio de afinidade representa Q, a quantidade em massa de analito retido por massa de adsorvente em função da concentração de soluto (PORPINO, 2009).

Para a construção da isoterma de adsorção colocou-se em contato a solução contendo o componente a ser adsorvido em diferentes concentrações iniciais (de 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ até 700,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e em temperatura ambiente até o equilíbrio (de 180 min), com o adsorvente (20 mg dos polímeros). Assim foi possível determinar a quantidade de material adsorvido.

Figura 45 – Isotermas de adsorção do MMIP e MNIP para a interação com soluções de VE entre 20 até 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



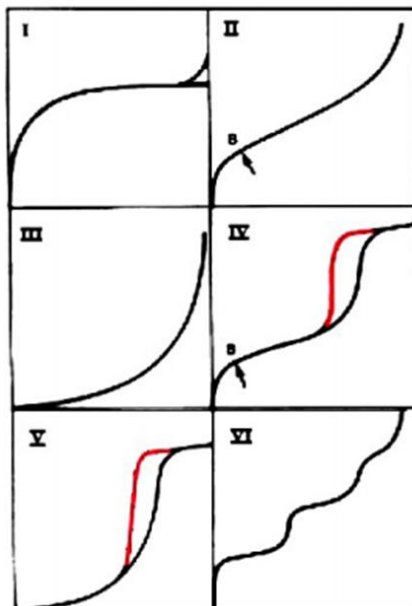
Fonte: autora do trabalho.

Como pode-se observar na Figura 45, obteve-se um excelente valor de adsorção do MMIP pelo analito ($24,3 \text{ mg g}^{-1}$), que aumentou gradativamente com o aumento da concentração de solução padrão. No entanto, não houve praticamente

uma diferença significativa entre as adsorções máximas de MMIP e MNIP (24,3 mg g⁻¹).

Existem diversos tipos de isotermas, que podem ser agrupadas em seis classes, enquadradas nos tipos de I a V da classificação proposta por Brunauer, Emmett e Teller (GREGG; SING, 1982). Na Figura 46 é apresentado as isotermas.

Figura 46 - Isotermas de adsorção segundo a classificação de BRUNAUER, Tipo I –V, e segundo PIERCE, Tipo VI.



Fonte: SMÍSEK, M.; CERNY, S. Active carbon: manufacture, properties and applications. New York: Elsevier, 1970.

A isoterma do tipo I pode ser observada a poucas camadas moleculares, onde os poros excedem um pouco o diâmetro molecular do adsorvente. As isotermas do tipo II e IV são as mais encontradas em medidas de adsorção, em sistemas não porosos ou com poros no intervalo de mesoporos ou macroporos. O ponto de inflexão da isoterma corresponde à ocorrência da formação da primeira camada adsorvida que recobre toda a superfície do material, na isoterma do tipo IV indica a presença de microporos associados aos mesoporos (RODELLA, 2001). Finalmente, as isotermas do tipo III e V estão relacionadas às interações fracas em sistemas contendo macro e mesoporos. Muitas equações teóricas ou semi-empíricas foram desenvolvidas para interpretar ou predizer as isotermas. As equações de Langmuir, Freundlich e BET (Brunauer, Emmett e Teller) são as mais utilizadas.

Contudo, o perfil das isotermas indicaram que os materiais adsorventes correspondem ao Tipo II (Figura 45), e que os materiais sintetizados são

mesoporosos, corroborando com os dados de adsorção/dessorção de N₂ da Tabela 6.

Adicionalmente, a inflexão mais acentuada na isoterma do MMIP indicou que as interações do analito com este polímero é maior do que aquelas apresentadas com o MNIP. Neste caso, trata-se apenas de interações não específicas com um monômero funcional remanescente na superfície dos polímeros não impressos.

Finalmente, como nossos resultados indicam, o MMIP e o MNIP, possuem a mesma capacidade de adsorção, estudos direcionados a eliminar a adsorção não específica do MNIP deverão ser ainda realizados.

6. CONCLUSÃO

Foi possível a síntese inédita de um MMIP para o VE, usando ácido metacrílico (MF) e TRIM (ME), contribuindo para a linha de pesquisa na área de polímeros impressos não apenas no Brasil, mas também no mundo.

Todos os materiais sintetizados foram caracterizados, física e físico-quimicamente. Considerando que a síntese, otimização da síntese e aplicação de novos polímeros impressos não são procedimentos triviais e consomem tempo deverão ser realizados estudos para se conseguir diferenciar a adsorção não-seletiva entre o MMIP e o MNIP. Entretanto, o material sintetizado apresentou um excelente magnetismo (2,0 emu g⁻¹), alta porcentagem de retenção (superior a 80%) e Q_{max} acima de 24 mg g⁻¹, indicando que é promissor para a realização de estudos que permitam avaliar a bio-acumulação de hormônios deste tipo em ambientes aquáticos, usando como base espécies aquáticas que absorvem este poluente.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Propõe-se as seguintes atividades:

Avaliação da seletividade;

Aplicação em amostras reais;

Aplicação do material obtido como fase sensora na construção de magneto-sensores e como atuadores em magneto-imunoensaios.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; TAKAHASHI, M.; KIM, C. Facile sonochemical synthesis of highmoment magnetite (Fe₃O₄) nanocube. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1354-1365, 2013.
- ANSELL, R. J.; KUAH, J. K. L.; WANG, D.; JACKSON, C. E.; BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A. A. Imprinted polymers for chiral resolution of (±)-ephedrine, 4: packed column supercritical fluid chromatography using molecularly imprinted chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1264, p. 117-123, 2013.
- BATISTA, I. V.; LANZA, M. R. V.; DIAS, I. L. T.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Electrochemical sensor highly selective for estradiol valerate determination based on a modified carbon paste with iron tetrapyridinoporphyrazine. **Analyst**, v. 133, n. 12, p. 1692-1699, 2008.
- CARBALLA, M.; OMILA, F.; LEMA, J. M.; LLOMPART, M.; GARCIA-JARES, C.; RODRIGUEZ, I.; GOMEZ, M.; TERNESD, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in sewage treatment plants. **Water Research**, v. 38, p. 2918-2926, 2004.
- COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUE, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.
- CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 804, p. 173-182, 2004.
- DINÇ, E.; YÜCESOY, C.; PALABIYIK, I. M.; ÜSTÜNDAG, Ö.; ONUR, F. Simultaneous spectrophotometric determination of cyproterone acetate and estradiol valerate in pharmaceutical preparations by ratio spectra derivative and chemometric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 539-547, 2003.
- DUAN, J. P.; CHEN, H. Q.; CHEN, G. N.; CHEN, M. L.; WU, X. U. Adsorptive and electrochemical behaviors of estradiol valerate at a mercury electrode. **The Analyst**, v. 124, p. 1651-1655, 1999.
- GAMA, M. R. **Degradação de hormônios por processos Fenton mediados por ciclodextrina**. 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- GONZALEZ, F. H. Características dos hormônios. In: _____ **Introdução a endocrinologia reprodutiva veterinária**. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, 2002. Cap. 1, p. 1-10.

GONZALEZ, F. H.; SILVA, S. C. da. Bioquímica hormonal. In: _____ **Introdução à bioquímica hormonal**. 2. ed. Porto Alegre: Ed da UFRGS. 2006. Cap. 7, p. 251-312.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, surface area and porosity**. London: Academic Press, 1982.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989.

HAUPT, K. **Molecularly imprinted polymers: general principle of molecular imprinting**. Disponível em: <http://www.utc.fr/~wmpi/index.php?option=com_content&view=article&id=4&Itemid=8>. Acesso em: 15 abr. 2017.

IONASHIRO, M.; CAIRES, F. J.; GOMES, D. J. C. **Giolito: fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. 2. ed. São Paulo: Giz, 2014.

ITURRALDE, I.; PAULIS, M.; LEIZA, J. R. The effect of the crosslinking agent on the performance of propranolol imprinted polymers. **European Polymer Journal**, v. 53, p. 282-291, 2014.

KEMPE, H.; KEMPE, M. Influence of salt ions on binding to molecularly imprinted polymers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 1599-1606, 2010.

KHAN, S.; GAU, D. W. Climacteric symptoms in healthy middle-aged women. **British Journal of Clinical Practice**, v. 48 p. 240-242, 1994.

KOMESAROFF, P. A.; BLACK, C. V.; CABLE V.; SUDHIR K. Effects of wild yam extract on menopausal symptoms, lipids and sex hormones in healthy menopausal women. **Climateric**, v. 4, n. 2, p. 144-150, 2001.

KOMIYAMA, M.; TAKEUSHI, T.; MUKAWA, T.; ASANUMA, H. Fundamentals of molecular imprinting. In: _____. **Molecular imprinting: from fundamentals to applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. Chap. 2, p. 9 - 19.

KUKUSAMUDE, C.; BURAKHAM, R.; CHAILAPAKUL, O.; SRIJARANAI, S. High performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of penicillin residues in beef and milk using ion-paired extraction and binary water-acetonitrile mixture. **Talanta**, v. 92, p. 38-44, 2012.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 1985.

LU, F.; LI, H.; SUN, M.; FAN, L.; QIU, H.; LI, X.; LUO, C. Flow injection chemiluminescence sensor base on core-shell magnetic molecularly imprinted nanoparticles for determination of sulfadiazine. **Analytica Chimica Acta**, v. 718, p. 84-91, 2012.

MAHONYA, J. O.; NOLANA, K.; SMYTHA, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers - potential and challenges in analytical chemistry. **Analytical Chimica Acta**, v. 534, p. 31-39, 2005.

MARESTONI, L. D.; WONG, A.; FELICIANO, G. T.; MARCHI, M. R. R.; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Semi-empirical quantum chemistry method for pre-polymerization rational design of ciprofloxacin imprinted polymer and adsorption studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 109-118, 2016.

MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 169-181, 2013.

MASQUEË, N.; MARCEË, R. M.; BORRULL, F. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. **Trends Analytical Chemistry**, v. 20, p. 477-486, 2001.

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

MENDEZ, A. S. L.; DECONTO, L.; GARCIA, C. V. UV derivative spectrophotometric method for determination of estradiol valerate in tablets. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 981-983, 2010.

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

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Espectroscopia no infravermelho. In:_____. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. Cap.2, p.15-99.

POMA, A.; TURNER, A. P. F.; PILETSKY, S. A. Advances in the manufacture of MIP nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 629-637, 2010.

PORPINO, K. K. P.; BARRETO, M. da C. S.; CAMBUIM, K. B. Fe (II) adsorption on *ucides cordatus* crab shells. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 928-932, 2011.

PUPIN, R. R.; MONTEIRO, G. C.; FOGUEL, M. V.; BOLZANI, V. S.; PIVIDORI, M. I.; SOTOMAYOR, M. P. D. T. Molecularly Imprinted Polymers (MIP): from the bulk synthesis to hybrid material to classic and new applications. In: QUINN, T. (Ed.). **Molecularly Imprinted Polymers (MIP): challenges, uses and prospects**. New York: Nova Publishers, [2017]. Chap. 2, p. 43-118.

RAMIMOGHADAM, D.; BAGHERI, S.; HAMID, S. B. A. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 368, p. 207-229, 2014.

RASHAD, M. M.; EI-SAYED, H. M.; RASLY, M.; NASR, M. I. Induction heating studies of magnetite nanospheres synthesized at room temperature for magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, p. 4019-4023, 2012.

REYES-GALLARDO, E. M.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Polymer nanoparticles composites in bioanalytical sample preparation. **Bioanalysis**, v. 7, n. 14, p. 1723-1730, 2015.

REYNOLDS, J. E. F. (Ed.). **Martindale: the extra pharmacopoeia**. 29th ed. London: The Pharmaceutical Press, 1989.

RODELLA, C. B. **Preparação e caracterização de catalisadores de V_2O_5 suportados por TiO_2** . 2001. 134 f. (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

SAINI, S.; FRANKEL, R. B.; STARK, D. D.; FERRUCCI JÚNIOR, J. T. Magnetism: a primer and review. **American Journal of Roentgenology**, v. 150, n. 4, p. 735-743, 1988.

SHAHAR, T.; TAL, N.; MANDLER, D. Molecularly imprinted polymer particles: formation, characterization and application. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 495, p. 11-19, 2016.

SODIPO, B. K.; AZIZ, A. A. Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 416, p. 275-291, 2016.

SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Molecularly imprinted polymers for controlling drug release. Part 1: synthesis and characterization. **Química Nova**, v. 32, p. 1609-1619, 2009.

SPRITZER, P. M.; REIS, F. M. Reposição hormonal no climatério: princípios terapêuticos embasados em evidências. **Reprodução Climatério**, v. 13, n.1, p. 32-41, 1998.

SUBRAHMANYAM, S.; GUERREIRO, A.; POMA, A.; MOCZKO, E.; PILETSKA, E.; PILETSKY, S. Optimization of experimental conditions for synthesis of high affinity MIP nanoparticles. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 100-105, 2013.

SUEDEE, R. The use of molecularly imprinted polymers for dermal drug delivery. **Pharmaceutica Analytica Acta**, 2013. doi:10.4172/2153-2435.1000264.

- TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.
- TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; SERNA, C. J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290/291, p. 28-34, 2005
- TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, p. 808-818, 2001.
- TOGASHI, T.; UMETSU, M.; NAKA, T.; OHARA, S.; HATAKEYAMA, Y.; ADSCHIRI, T. One-pot hydrothermal synthesis of an assembly of magnetite nanoneedles on a scaffold of cyclicdiphenylalanine nanorods. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 3991-3999, 2011.
- UZURIAGA-SÁNCHEZ, R. J. **Nanopartículas magnéticas modificadas com polímeros molecularmente impressos (mips) para a determinação de biotina em leite**. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- UZURIAGA- SÁNCHEZ, R. J. U.; KHAN, S.; WONG, A.; PICASSO, G.; PIVIDORI, M. I.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. **Food Chemistry**, v. 190, p. 460-467, 2016.
- WACKERLIG, J.; SCHIRHAGL, R. Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: **A Review. Analytical Chemistry**. 2015, acs.analchem.5b03804.
- YAN, M.; RAMSTRÖM, O. **Molecularly imprinted materials: science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2005.
- ZHU, Y.; KEKALO, K.; NDONG, C.; HUANG, Y.-Y.; SHUBITIDZE, F.; GRISWOLD, K. E.; BAKER, I.; ZHANG, J. X. J. Magnetic-nanoparticle-based immunoassays-on-chip: materials synthesis, surface functionalization, and cancer cell screening. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 22, p. 3953-3972, 2016.