

**Universidade Estadual Paulista - UNESP/ARARAQUARA**

**Instituto de Química**

**Luiz Diego Marestoni**

**“Simulação computacional e síntese de polímero molecularmente  
impresso para extração em fase sólida (MISPE) de Ciprofloxacina em  
urina”**

**Araraquara, 2014**

Luiz Diego Marestoni

**“Simulação computacional e síntese de polímero molecularmente impresso para extração em fase sólida (MISPE) de Ciprofloxacina em urina”**

Tese de Doutorado  
Instituto de Química UNESP/ARARAQUARA

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Del Pilar Taboada  
Sotomayor - IQ/CAR

**Co-orientador:**

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

Araraquara  
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

M325s Marestoni, Luiz Diego  
Simulação computacional e síntese de polímero  
molecularmente impresso para extração em fase sólida  
(MISPE) de Ciprofloxacina em urina /  
Luiz Diego Marestoni – Araraquara : [s.n], 2014  
167 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor  
Coorientador: César Ricardo Teixeira Tarley

1. Química analítica. 2. Polímeros. 3. Biomimetismo.  
4. Moléculas - Modelo. 5. Ciprofloxacina. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara  
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

LUIZ DIEGO MARESTONI

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, no âmbito do Programa DINTER – CAPES com o Instituto Federal do Mato Grosso, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 30 de junho de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Orientadora)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



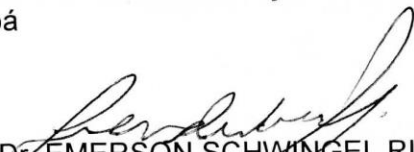
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELISETE APARECIDA BATISTA  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. GUSTAVO TROIANO FELICIANO  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. WANDER MIGUEL DE BARROS  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso / IFMT / Cuiabá



Prof. Dr. EMERSON SCHWINGEL RIBEIRO  
Instituto de Química / UFRJ / Rio de Janeiro

*Dedico este trabalho a meu Deus por me oportunizar saúde, compreensão, paz, tempo, família, pessoas para sua realização.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço a minha esposa, Joslaine Fabiany Baldo Marestoni, por ter me incentivado, pelos momentos de carinho, pelas discussões que descansavam minha mente das discussões científicas, por ter cuidado de nossa casa e de nossos filhos nestes anos.

Agradeço a meus filhos, Murilo e Enzo, pelos momentos de descanso mental e cansaço físico que por vezes necessário para que minha mente aguentasse as jornadas de trabalho que me propus. Agradeço pelos incontáveis choros de saudade nos momentos em que viajei para Araraquara a fim de realizar os trabalhos, pois estes me motivaram a trabalhar cada vez mais e melhor para que pudesse ser realizado a tempo e contento.

Agradeço a meus pais, Gilberto e Josefina e minha irmã, Thayse, por desde os primórdios de minha existência terem cuidado de mim e me incentivado, por terem financiado meus estudos quando necessário e por tantas vezes cansarem suas mentes e corpos ajudando a cuidar de meus filhos e esposa, que também me proporcionou descanso mental.

Agradeço a meus sogros, Carlos e Hilda, pela ajuda em cuidar de meus filhos e esposa, que também me proporcionou descanso mental.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor por ter acreditado que este trabalho daria certo, mesmo no momento em que outras pessoas desistiram de acreditar devido aos entraves impostos por meus encargos em outra instituição, por disponibilizar e acreditar em minha responsabilidade na utilização dos laboratórios mesmo nos finais de semana e feriados, pela amizade e palavras de incentivo, necessárias e fundamentais, muito obrigado professora!

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley, pela ajuda e pela indicação da orientação no IQ/UNESP, que sem esta o trabalho não teria sido realizado.

Agradeço ao Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano pelas aulas particulares de dinâmica molecular, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelas palavras de amizade e pelo incentivo.

Agradeço o Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista e ao por me disponibilizar a estrutura física e pessoal.

Agradeço ao Instituto Federal do Paraná e seus professores pela compreensão e pela dispensa parcial das atividades para realização do doutorado.

Agradeço ao Instituto Federal do Mato Grosso por oportunizar o início do doutorado e aos professores, pela amizade.

Agradeço aos colegas do Instituto de Química da UNESP/Ar pelos momentos de descontração, pela ajuda na realização de experimentos e pelos cafés de todas as manhãs e tardes. Agradeço aos colegas do IFPR/TB e IFMT/BV pelo incentivo e compreensão nos momentos em que não pude contribuir de maneira satisfatória.

# CURRICULUM VITAE

Luiz Diego Marestoni

## 1. Formação acadêmica/titulação

### 1.1. Graduação

#### 1.1.1. Licenciatura em Física

Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil.  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni.  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
Início: Fevereiro de 2001; Término: Dezembro de 2004; Local: Londrina – PR.

### 1.2. Pós Graduação

#### 1.2.1. Mestrado em Física Nuclear Aplicada

Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil.  
Título: *Estudo da Redistribuição Superficial de Solo em Áreas Cultivadas e Não Cultivadas Utilizando o Fallout do Be-7*  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni.  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
Início: Fevereiro de 2005; Término: Fevereiro de 2007; Local: Londrina – PR.

#### 1.2.2. Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.  
Título: *“Simulação computacional e síntese de polímero molecularmente impresso para extração em fase sólida (MISPE) de Ciprofloxacina em urina”*  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor.  
Co-orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.  
Início: Agosto de 2010; Término Junho de 2014; Local: Araraquara – SP.

## 2. Atuação profissional

### 2.1. Universidade Estadual de Londrina - UEL

Função: Serviço técnico especializado  
Carga horária: 40  
Início: Março de 2007; Término: Julho 2007; Local: Londrina – PR.

### 2.2. Faculdades do Centro do Paraná - UCP/ASSESPI

Função: Professor  
Carga horária: 20  
Início: Agosto de 2007; Término: Dezembro de 2007; Local: Pitanga – PR.

### 2.3. Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Função: Professor

Carga horária: 40

Início: Agosto de 2007; Término: Janeiro de 2008; Local: Guarapuava – PR.

### 2.4. Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT

Função: Professor

Carga horária: 40 (DE)

Início: Fevereiro de 2008; Término: Outubro de 2011; Local: Cuiabá – MT.

### 2.5. Instituto Federal do Paraná – IFPR

Função: Professor

Carga horária: 40 (DE)

Início: Novembro de 2011; Atual, Local: Telêmaco Borba – PR.

## 3. Produção Científica

### 3.1. Artigos publicados durante o doutorado

3.1.1. MARESTONI, L.D.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; SEGATELLI, M.G.; SARTORI, L.R.; TARLEY, C.R.T. Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova (Impresso)**, v.36, p.1194 – 1207, 2013.

3.1.2. MARESTONI, L.D.; APPOLONI, C.R.; EICHLT, J.R. Nível mínimo de discriminação de componente para caracterização de misturas bifásicas (petróleo/água salgada ou gás) usando transmissão de raios-x ou gama. **Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas (Impresso)**, v.32, p.191 – 198, 2011.

3.1.3. WONG, A.; MARESTONI, L.D.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Monitoring of Diclofenac with Biomimetic Sensor in Batch and FIA Systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Disponível *online* em <http://www.jbcs.sbq.org.br/imagebank/pdf/130501AR.pdf>

### 3.2. Artigos aceitos para publicação

3.2.1. MARESTONI, L.D.; WONG, A.; FELICIANO, G.T.; MARCHI, M.R.R.; TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Semi-empirical quantum simulation for pre-polymerization rational design of ciprofloxacin imprinted polymer. **Analytical Methods**, 2014.

3.2.2. TORO, M.J.U.; MARESTONI, L.D.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. A new biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymers for highly sensitive and selective determination of herbicide hexazinone. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, 2014.

### **3.3. Participação em eventos técnico-científicos durante o doutorado**

- 3.3.1. MARESTONI, L.D.; OKUBO, T.H.; PUPIN, R.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Preparação de microesferas molecularmente impressas para o reconhecimento seletivo de Tetraciclina In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA. Belo Horizonte Outubro 2013.
- 3.3.2. MARESTONI, L.D.; TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Semi-empirical quantum simulations of molecularly imprinted polymer for ciprofloxacin and its use in chromatographic experiments In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA. Belo Horizonte Outubro 2013.
- 3.3.3. TORO, M. J. U.; WONG, A.; MARESTONI, L.D.; SOTOMAYOR, M.D.P.T. Síntese de Polímero de Impressão Molecular para a Triazina Hexazinona por técnica de polimerização em bulk In: 17o Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte., 2013.

### **4. Orientações de Iniciação Científica.**

- 4.1. TATIANA HARUMI OKUBO. Bolsista FAPESP (2013/18614-5). Co-orientador desde 01 de novembro de 2013.
- 4.2. BIANCA MORTARI. Bolsista PIBIC/CNPq. Co-orientador desde 01 de outubro de 2013.

### **5. Prêmios resultantes de Atividade Científica.**

- 5.1. Artigo capa da revista Química Nova (Impresso), v.36, 2013.

## Um dia

ISABEL DE CASTRO

*Um dia, Sócrates deliberou sair de si mesmo, apresentando alguns aspectos da verdade, e imortalizou-se.*

*Um dia, Colombo resolveu empreender a viagem ao Mundo Novo e desvelou o caminho para a América.*

*A gloriosa missão de Jesus começou para os homens no dia da Manjedoura. O ministério dos Apóstolos foi definitivamente homologado pelos Poderes Divinos no dia de Pentecostes.*

*Tudo no Universo começa um dia.*

*O bem e o mal, a felicidade e o infortúnio, a alegria e a dor, invocadas por nossa alma, guardam o exato momento de início.*

*Quando plantamos, sabemos que a produção surgirá certo dia. Se encetarmos uma jornada, não ignoramos que, em certo momento, ela terminará.*

*Um dia criamos, um dia recolheremos.*

*Não olvides, porém, que a semente não germinará sem cuidado, em tua quinta.*

*Se deres teu dia a erva ingrata, ela se alastrará, sufocando-te o horto amigo. Se abandonares teus minutos aos vermes daninhos, multiplicar-se-ão eles, indefinidamente, impedindo a colheita.*

*Ocupa-te com o dia, de olhos voltados para a eternidade.*

*Das resoluções de uma hora podem sobrevir acontecimentos para mil anos.*

*Tudo depende de tua atitude na intimidade do tempo.*

*O amanhã será o que hoje projetamos.*

*Alcançarás o que procuras.*

*Serás o que desejas.*

*Acorða para a realidade do momento e amontoa bênçãos pelos serviços que prestastes e pelo conhecimento que difundistes em tuas horas.*

*O Tempo é o rio da vida cujas águas nos devolvem o que lhe atiramos.*

*Enquanto dispões das horas de trabalho, dedica-te às boas obras.*

*Se acreditas no bem e a e atendes, cedo atingirás a messe da felicidade perfeita; mas se agora mofas do dia, entre a indiferença e o sarcasmo, guarda a certeza de que, a seu turno, o dia rirá de ti.*

***“É preferível um inimigo a menos que um amigo a mais”***

***“Tudo isso devo a todos, tudo a Deus devem todos”***

## RESUMO

**Título:** “Simulação computacional e síntese de polímero molecularmente impresso para extração em fase sólida (MISPE) de Ciprofloxacina em urina”

**Autor:** Luiz Diego Marestoni

**Orientadora:** Maria del Pilar Taboada Sotomayor

**Co-orientador:** César Ricardo Teixeira Tarley

**Palavras-chave:** Polímeros com impressão molecular, extração em fase sólida, biomimético e Ciprofloxacina.

O aumento mundial na utilização de fármacos é preocupante pelos impactos ambientais causados e principalmente pela possibilidade de mutação genica das bactérias. A preocupação com a Ciprofloxacina se deve a sua aplicação, sendo utilizado somente em casos mais graves, assim se uma bactéria desenvolve a resistência a este fármaco, provavelmente também conseguirá desenvolver resistência aos demais. No entanto, desenvolver métodos analíticos para determinação do fármaco em níveis de traço é difícil, seja pela sensibilidade baixa de algumas técnicas, seja pela presença de interferentes que não são possíveis de serem separados pelas técnicas tradicionais e que interferem no resultado de técnicas mais sensíveis. Desta maneira, o desenvolvimento de fases extratoras seletivas a um determinado fármaco apresenta interesse econômico e social. Os polímeros moleculares impressos apresentam uma ótima alternativa de solução para este problema. No entanto, são muitas as variáveis para seu desenvolvimento, dentre elas a escolha do melhor monômero para o complexo de pré-polimerização é de importância fundamental para a formação da nanocavidade seletiva. Desta maneira, neste trabalho foi desenvolvido a aplicação da simulação computacional quântica semi-empírica para o entendimento da interação da Ciprofloxacina - monômero. Foi simulada a interação com uma lista de 20 monômeros mais utilizados na literatura. As simulações foram realizadas utilizando-se os *softwares* HyperChem® 8.0.5 para modelagem molecular, pacote de *softwares* OpenEye® para verificações e otimização e MMH com MOPAC 2009 para realização dos cálculos quânticos de energia de aproximação para prever teoricamente o melhor monômero para sintetizar o polímero proposto. O MIP foi sintetizado em *bulk* utilizando-se acetonitrila como solvente, Ciprofloxacina como molécula molde, EDMA como agente reticulante, AIBN como iniciador radicalar e, dentre os 20 monômeros utilizados nas simulações, três foram testados para comprovar os resultados teóricos. A extração das moléculas de Ciprofloxacina foi realizada em sistema Soxhlet com solução de etanol e ácido acético na proporção de 9:1 (v/v). O polímero resultante foi macerado e tamisado. Foram realizadas as análises de religação por isothermas e testes de seletividade. Os resultados das isothermas comprovaram que as simulações computacionais foram úteis, os resultados da seletividade evidenciaram a existência de nanocavidades e que elas são até 10 vezes mais seletivas à Ciprofloxacina em relação aos interferentes. O MIP mais indicado foi utilizado em amostras de urina humana e os resultados foram comparados com a coluna comercial de fase reversa C18. Os resultados mostraram que o MIP pré-concentrou a amostra mais de cinco vezes e conseguiu limpar os interferentes, além de conseguir uma recuperação em média de 102%, enquanto que a coluna C18 apresentou uma recuperação de aproximadamente 160%, pois resultou na concentração de todos os componentes da amostra que eram apolares.

## ABSTRACT

**Title:** "Computer simulation and synthesis of molecularly imprinted polymer for solid phase extraction (MISPE) Ciprofloxacin in urine"

**Author:** Luiz Diego Marestoni

**Advisor:** Maria del Pilar Taboada Sotomayor

**Co-advisor:** César Ricardo Teixeira Tarley

**Keywords:** Molecular Imprinting Polymers, Solid Phase Extraction, Biomimetic and Ciprofloxacin.

The worldwide increase in the drug's use is worrisome and causes environmental impacts mainly by the possibility of bacteria's gene mutation. The concern with Ciprofloxacin should your application, being used only in severe cases. If bacteria develop resistance to this drug, can probably also develop resistance to other. However, developing analytical methods for drug determination in trace levels is difficult, by the low sensitivity or by the interfering molecules that are not possible to be separated by traditional techniques and which interfere in the more sensitive techniques results. Thus, the development of selective extracting phases to a particular drug has economic and social interests. Molecular Imprinted Polymers show a great alternative to this problem's solution. However, their development has many variables. The best choice for the monomer complex pre - polymerization is crucial for the formation of selective nanocavity. Thus, in this work we apply the semi-empirical quantum computer simulation to understand the interaction of Ciprofloxacin - monomer. We simulated the interaction with a list of 20 monomers more used in the literature. The simulations were performed using the HyperChem® 8.0.5 software for molecular modeling, OPENEYE® software package for verification and optimization and MMH with MOPAC 2009 to achieve the quantum energy calculation approach to theoretically predict the best monomer for synthesizing polymer proposed. The MIP was synthesized in bulk using acetonitrile as a solvent, Ciprofloxacin as template molecule, EDMA as cross linker, AIBN as radical initiator and the three monomers that were tested in the simulation to check it. The extraction of ciprofloxacin was performed in a Soxhlet system with a solution of ethanol and acetic acid 9:1 (v / v). The resulting polymer was homogenized and sieved. Rebinding analyzes were performed by isotherms and selectivity tests. The results of isotherms showed that the computer simulations were useful and the selectivity results showed the existence of nanocavity up to 10 times more selective with respect to the interfering. The most appropriate MIP was used in human urine samples and the results were compared with a commercial C18 reverse phase column. The results showed that MIP pre-concentrated the sample more to five times, cut out the interfering and achieve an average recovery of 102% while C18 showed a recovery of nearly 160% because it resulted in a concentration of all nonpolar components of the sample.

## INDICE

LISTA DE FIGURAS .....	XVI
LISTA DE TABELAS .....	XX
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	XXI
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO .....	22
1.1. FLUOROQUINOLONAS .....	29
1.1.1. Ciprofloxacina .....	31
1.2. POLÍMEROS SINTÉTICOS COM IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP) .....	41
1.2.1. Aspectos Históricos .....	41
1.2.2. Estratégias e procedimentos de impressão molecular .....	44
1.2.3. Emprego do MIP em técnicas de extração em fase sólida (MISPE) .....	56
1.2.4. O emprego do MIP para determinação de Fluoroquinolonas .....	61
1.3. SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS EM IMPRESSÃO MOLECULAR .....	66
CAPÍTULO II. OBJETIVOS .....	70
2.1. GERAL .....	71
2.2. ESPECÍFICOS .....	71
CAPÍTULO III. METODOLOGIA E PARTE EXPERIMENTAL .....	73
3.1. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL .....	74
3.2. REAGENTES UTILIZADOS E SOLUÇÕES .....	79
3.3. EQUIPAMENTOS .....	79
3.3.1. Síntese dos MIPs/NIPs .....	79
3.3.2. Espectrofotômetro UV-VIS .....	80
3.3.3. Medidas cromatográficas .....	80
3.3.5. Medidas de microscopia eletrônica de varredura .....	83
3.3.6. Medidas termogravimétricas .....	83
3.4. SÍNTESE DOS POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS .....	84

3.5.	ANÁLISES DE RELIGAÇÃO .....	86
3.5.1.	Procedimentos de otimização da interação MIP – analito .....	88
3.5.2.	Modelos matemáticos de ajustes dos dados .....	92
3.5.3.	Teste de seletividade .....	100
3.6.	APLICAÇÃO EM AMOSTRA DE URINA HUMANA .....	102
3.6.1.	Limpeza .....	102
3.6.2.	Pré-concentração .....	104
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>		<b>105</b>
4.1.	SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS .....	106
4.2.	LIMPEZA DAS AMOSTRAS .....	112
4.3.	OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ESTUDOS DE RELIGAÇÃO .....	114
4.3.1.	Otimização do solvente de religação .....	114
4.3.2.	Otimização do pH na solução de religação .....	117
4.3.3.	Cinética da Adsorção .....	119
4.3.4.	Curva de ruptura .....	120
4.4.	ESTUDOS DE RELIGAÇÃO .....	123
4.5.	AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE .....	130
4.6.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA .....	133
4.6.1.	Análises Térmicas .....	133
4.6.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	136
4.6.3.	Adsorção de Nitrogênio .....	138
4.7.	APLICAÇÃO EM AMOSTRA DE URINA HUMANA .....	141
4.7.1.	Desempenho analítico (pré-concentração) .....	141
4.7.2.	Limpeza e recuperação .....	147
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSÕES .....</b>		<b>153</b>
<b>CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS .....</b>		<b>156</b>
<b>CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>		<b>165</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da a) Ciprofloxacina, b) Cloranfenicol, c) Amoxicilina, d) Tetraciclina, e) Ácido Nalidixico, f) Norfloxacina e g) Ácido Úrico.....	32
Figura 2. Possíveis rotas dos fármacos quando descartados no meio ambiente (Bila e Dezotti, 2003).....	36
Figura 3. Evolução da publicação anual de trabalhos utilizando o conceito de “Molecularly Imprinted Polymer” (Scifinder, 2014). Observação: 2014 foi feito o levantamento até 26 de abril de 2014. ....	43
Figura 4. Representação esquemática do processo de impressão molecular. ....	45
Figura 5. Estruturas moleculares dos agentes de reticulação mais utilizados para síntese de MIPs. (a) etileno glicol dimetacrilato (EDMA); (b) N,N'-metileno-bis-acrilamina; (c) N,O-bisacrilóila-L-fenilalaninol; (d) N,N'-fenilendiacrilamida e (e) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM).(f) tetrametileno dimetacrilato (TDMA); (g) pdivinilbenzeno (DVB); (h) 1,3 diisopropenil benzeno (DIP);(i) 2,6 bisacriloilamidopiridina; (j) 1,4 diacrilol; (k) anidroeritrotol dimetacrilato; (l) isopropilenebis (i,4-fenileno) dimetacrilato. ....	50
Figura 6. Estruturas moleculares dos principais solventes porogênicos utilizados para síntese do MIP (a) Metanol; (b) Etanol; (c) Isopropanol; (d) Acetonitrila; (e) Tolueno; (f) Clorofórmio; (g) Tetrahidrofurano; (h) Acetona; (g) Octanol; (j) Diclorometano.....	52
Figura. 7. Estrutura química dos principais iniciadores radiculares utilizados para síntese dos MIPs: (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-bisdimetilvaléronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzila; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).....	53
Figura 8. Esquema de polimerização em <i>bulk</i> .....	55
Figura 9. Esquema de funcionamento da extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE).....	57
Figura 10. Preparação do polímero molecularmente impresso MIP-CIP-EDMA (adaptada de (Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011)). ....	86
Figura 11. Esquema de otimização do melhor solvente, pH e cinética de reação ....	89
Figura 12. Esquema representativo da curva de ruptura. ....	90
Figura 13. Esquema de empacotamento do MIP em MISPE.....	103

---

Figura 14. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Ciprofloxacina.....	107
Figura 15. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Ácido Nalidixico. ....	108
Figura 17. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Ácido Úrico. ....	109
Figura 18. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Amoxicilina. ....	109
Figura 19. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Cloranfenicol. ....	110
Figura 20. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Tetraciclina Hidroclorada. ...	110
Figura 21. Lavagem do MIP para extração da Ciprofloxacina e criação da nanocavidade seletiva.....	113
Figura 22. Percentual de água no solvente para religação de Ciprofloxacina pelo MIP-AA (o percentual restante corresponde a Acetonitrila). ....	115
Figura 23. Percentual de água no solvente para religação de Ciprofloxacina pelo MIP-ACL (o percentual restante corresponde a Acetonitrila). ....	115
Figura 24. Percentual de água no solvente para religação de Ciprofloxacina pelo MIP-1VN (o percentual restante corresponde a Acetonitrila). ....	116
Figura 25. Influencia do pH na extração de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero AA. ....	117
Figura 26. Influencia do pH na extração de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero ACL. ....	118
Figura 27. Influencia do pH na extração de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero 1VN. ....	118
Figura 28. Cinética de adsorção da Ciprofloxacina pelo monômero ACL. ....	120
Figura 29. Curva de ruptura em relação ao volume da solução de Ciprofloxacina na coluna de MIP-ACL variando o fluxo de 0,5 a 2 mL min <sup>-1</sup> . ....	121
Figura 30. Curva de ruptura em relação ao tempo de análise para a coluna de MIP sintetizado com o monômero ACL variando o fluxo de 0,5 a 2 mL min <sup>-1</sup> . ....	121
Figura 31. Linearização da curva de ruptura da figura 29 para obtenção dos parâmetros de adsorção. ....	122

---

Figura 32. Ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIP utilizando o monômero AA empregando sete modelos de isothermas. ....	125
Figura 33. Ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIP utilizando o monômero ACL empregando sete modelos de isothermas. ....	125
Figura 34. Ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIP utilizando o monômero 1VN empregando sete modelos de isothermas. ....	126
Figura 35. Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial para o MIP sintetizado com o monômero AA. ....	134
Figura 36. Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial para o MIP sintetizado com o monômero ACL. ....	134
Figura 37. Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial para o MIP sintetizado com o monômero 1VN. ....	135
Figura 38. Microscopia Eletrônica de Varredura (equipamento FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) para o MIP sintetizado com o monômero AA e explicação sobre a porosidade resultante dos MIPs proposta por (Spivak, 2005). ....	136
Figura 39. Microscopia Eletrônica de Varredura (equipamento FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) para o MIP sintetizado com o monômero ACL. ....	137
Figura 40. Microscopia Eletrônica de Varredura (equipamento MEV; Topcon, modelo SM300) para o MIP sintetizado com o monômero 1VN. ....	137
Figura 41. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 5 mg L <sup>-1</sup> . ....	142
Figura 42. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 10 mg L <sup>-1</sup> . ....	142
Figura 43. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 15 mg L <sup>-1</sup> . ....	143
Figura 44. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 20 mg L <sup>-1</sup> . ....	143
Figura 45. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 25 mg L <sup>-1</sup> . ....	144
Figura 46. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 30 mg L <sup>-1</sup> . ....	144
Figura 47. Curva analítica das amostras antes e após a MISPE (monômero AA). ....	145

---

Figura 48. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	147
Figura 49. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	148
Figura 50. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	148
Figura 51. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	149
Figura 52. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	149
Figura 53. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	150

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração máxima de Ciprofloxacina no sangue (Dailymed, 2010)....	33
Tabela 2. Guia de dosagem para adultos (Dailymed, 2010).....	34
Tabela 3. Monômeros para síntese de MIPs orgânicos não covalentes. ....	47
Tabela 4. Parâmetros do modelo de Thomas para Ciprofloxacina em diferentes fluxos usando análise de regressão linear (massa de MIP de 35 mg e concentração da solução de 100 mg L <sup>-1</sup> ).....	123
Tabela 5. Resultados dos parâmetros dos ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIPs empregando as isotermas de Langmuir (L), Freundlich (FR), Langmuir-Freundlich (LF), Redlich-Peterson (RP), Tóth (TO), Dubinin-Radushkevich(DR) e Temkim (TK). ....	127
Tabela 6. Resultados computacionais e experimentais do presente trabalho e comparação com resultados publicados na literatura. Os monômeros (MN) que não estão apresentados não foram relatados para síntese de polímeros para Ciprofloxacina na literatura.....	129
Tabela 7. Parâmetros relacionados ao efeito de impressão do MIP sintetizado com o monômero AA para a Ciprofloxacina (CIP) em relação as moléculas: Amoxicilina (AMX), Ácido Nalidixico (NAL), Cloranfenicol (CLR), Norfloxacina (NOR), Tetraciclina Hidroclorada (TCL) e Ácido Úrico (URC). ....	131
Tabela 8. Porosimetria dos polímeros impresso e não impressos (temperatura de secagem 80 0C).....	139
Tabela 9. Características de desempenho do experimento de pré-concentração (MISPE – Monômero AA).....	146
Tabela 10. Recuperação da Ciprofloxacina (CIP) com coluna MISPE-AA para amostras de urina humana.....	151
Tabela 11. Recuperação da Ciprofloxacina (CIP) com coluna C18 para amostras de urina humana. ....	152

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- °C: graus Celsius
- μ: micro ( $10^{-6}$ , prefixo)
- 1VN: 1-vinilimidazol
- Å: Angstrom
- AA: Ácido Acrílico
- ACL: Acrilamida
- ACN: Acetonitrila
- AIBN: 2,2'-azobisisobutironitrila
- AMBER: *Assisted Model Building with Energy Refinement*
- AMX: Amoxicilina
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- c: centi ( $10^{-2}$ , prefixo)
- C: Concentração de equilíbrio na solução
- $C_0$ : Concentração Inicial da solução
- CIP: Ciprofloxacina
- CLR: Cloranfenicol
- CPU: Unidade Central de Processamento (do inglês *Central Processing Unit*)
- DFT: Teoria de densidade funcional (do inglês: *Density Functional Theory*)
- DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)
- DR: Isoterma de Dubinin-Radushkevich
- DTA: Análise térmica diferencial (do inglês: *Differential Thermal Analysis*)
- E: energia livre de Gibbs
- EDMA: Etileno Glicol Dimetacrilato
- ESI: Ionização por electrospray (do inglês: *Electrospray ionization*)
- ETE: Estação de tratamento de esgoto
- eV: elétron-Volt
- F: Isoterma de Freundlich
- G: giga ( $10^9$ , prefixo)
- g: grama
- h: hora
- HF: Hartree-Fock
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

- 
- Hz:** Hertz (frequência)
- I:** fator de impressão
- IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
- IUPAC:** União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- J:** Joule
- K:** kelvin (temperatura)
- K:** parâmetro de afinidade
- k:** quilo ( $10^3$ , prefixo)
- K<sub>p</sub>:** coeficiente de partição da molécula no polímero
- L:** Isoterma de Langmuir
- L:** litro
- LC:** Cromatografia líquida (do inglês: Liquid Chromatography)
- LD:** Limite de Detecção
- LD<sub>50</sub>:** Dose Letal Mediana (do inglês *Lethal Dose*)
- LF:** Isoterma de Langmuir-Freundlich
- LQ:** Limite de Quantificação
- M:** carga máxima
- m:** massa
- m:** metro (unidade de medida)
- m:** mili ( $10^{-3}$ , prefixo)
- M1-20:** Siglas utilizadas para designar os monômeros estudados
- min:** minuto
- MIP:** Polímero Sintético com Impressão Molecular (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*)
- MISPE:** Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (do inglês *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*)
- MMH:** *Multiple Minima Hypersurfaces*
- MOPAC:** *Molecular Orbital PACkage*
- MS:** Espectrometria de massas (do inglês: mass spectrometry)
- NAL:** Ácido Nalidixico
- NIP:** Polímero não Impresso (do inglês *Nom-Imprinted Polymers*)
- NOR:** Norfloxacin
- Pa:** Pascal
- pH:** Potencial Hidrogeniônico
- R<sup>2</sup>:** coeficiente de regressão
-

- 
- RNA:** Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)
- RP:** Isoterma de Redlich-Peterson
- rpm:** rotações por minuto
- S:** seletividade
- SPE:** Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid-Phase Extraction*)
- SPME:** Microextração em Fase Sólida (do inglês: *Solid Phase Microextraction*)
- T:** Isoterma de Tóth
- t:** tempo
- TCL:** Tetraciclina Hidroclorada
- TG:** Termogravimetria
- TK:** Isoterma de Temkim
- URC:** Ácido Úrico
- UV:** Radiação Ultravioleta;
- v/v:** Relação volume-volume
- V:** Volt
- VIS:** Radiação no comprimento de onda visível.
- W:** watt (potência)
- $\beta$ :** heterogeneidade da superfície de adsorção
- $\delta$ :** desvio médio dos dados
- n:** nano ( $10^{-9}$ , prefixo)
- $\lambda$ :** comprimento de onda
- $\sigma$ :** fator de separação
- $\Phi$ :** fluxo

CAPÍTULO I

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Os fármacos são imprescindíveis para a melhoria da qualidade de vida da população. Desde crianças e principalmente no término da vida, os seres humanos são submetidos ao tratamento com fármacos. Visando uma maior qualidade de vida, as pessoas têm se utilizado cada vez mais desses compostos. Graças ao uso dos fármacos, muitas doenças crônicas são mantidas sob controle, prevenindo seu agravamento. Além de corrigir e resgatar o estado de saúde, os fármacos podem prolongar a vida com certa qualidade em casos de doenças terminais ou ainda preveni-las, salvaguardando a saúde. Em qualquer uma destas circunstâncias os fármacos são responsáveis pela melhoria de nossa qualidade de vida, contribuindo também, diretamente, para o contínuo aumento da esperança de vida da humanidade (Barreiro, 2001).

Outra aplicação que responde pela utilização dos fármacos é a indústria veterinária que é responsável pela manutenção da saúde de rebanhos ao redor do mundo todo. Neste caso, a utilização visa principalmente garantia da produtividade dos animais, bem como a sanidade, qualidade e abundância dos alimentos por eles produzidos. Além disso, a indústria farmacêutica encarrega-se de fornecer produtos que tratem da saúde e bem-estar dos animais domésticos. Neste cenário o Brasil possui um posicionamento consideravelmente expressivo como exportador de carne bovina para diversos países e, em virtude disso, têm-se os animais ruminantes como os mais relevantes no que diz respeito à venda de fármacos veterinários no país, seguidos pelas aves e suínos.

Atento a esta necessidade, a indústria e comércio de produtos farmacêuticos vem crescendo anualmente. A última pesquisa anual de comércio realizada pelo IBGE (INSTITUO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011) mostrou

que os lucros do mercado farmacêutico estiveram sempre acima da média nacional. Enquanto o comércio em geral registrou produtividade média de R\$ 80.929,00<sup>1</sup>, 10 pessoas ocupadas por empresa, salário médio mensal de 3,0 salários mínimos e taxa de margem de comercialização de 24,0%; o comércio de produtos farmacêuticos registrou produtividade média de R\$ 133.424,00, 16 pessoas ocupadas por empresa, salário médio mensal de 4,3 salários mínimos e a taxa de margem de comercialização 59,7%, maior entre os tipos de comércio pesquisados. Tais informações só comprovam a que a utilização dos fármacos é cada vez mais crescente.

Levando em consideração estas análises, vemos que a utilização de fármacos é atualmente imprescindível. No entanto, após a administração, uma parte significativa dos fármacos é excretada por humanos no esgoto doméstico e pelos animais, na maioria dos casos, diretamente no leito de rios e no solo. Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas quando passam pelas estações de tratamento de esgoto (ETEs) (Ternes, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Ternes *et al.*, 1999). Tais estudos demonstram que muitos fármacos residuais resistem a vários processos de tratamento convencional da água.

Assim, o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente gera cada vez mais interesse sócio ambiental, devido a muitas serem encontradas frequentemente em efluentes de ETEs, rios e águas subterrâneas, em concentrações na faixa que varia entre  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Stumpf *et al.*, 1999). Isto ocorre devido à própria característica dos fármacos, que são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas para servir a um

---

<sup>1</sup> Valores correntes calculados pela divisão do valor adicionado pelo total de pessoal ocupado nas empresas.

propósito terapêutico. Segundo (Mulroy, 2001), entre 50 a 90% de uma dosagem dos fármacos são excretados inalterados e se tornam persistentes no meio ambiente. O uso desenfreado de antimicrobianos acarreta problemas ambientais, tais como, a contaminação dos recursos hídricos e a resistência que alguns microrganismos desenvolvem a esses fármacos, como bactérias que podem fazer mudanças no seu material genético (Bila e Dezotti, 2003). Assim, uma bactéria presente em um rio que contenha traços de antimicrobianos pode adquirir resistência a essas substâncias e com sua proliferação pode acarretar uma pandemia.

A resistência bacteriana tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetiva nos últimos anos (Bower e Daeschel, 1999). Algumas vezes, parte da emergência de resistência está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes. Pacientes infectados por bactérias resistentes necessitam de maior tempo de hospitalização, apresentam risco aumentado de mortalidade e utilizam antimicrobianos mais potentes, que normalmente são mais caros e/ou mais tóxicos (Gales *et al.*, 1997).

Dentre os fármacos residuais, alguns grupos merecem atenção especial, tais como os antimicrobianos, devido ao potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente e pelo uso intensivo em grandes quantidades, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária para o crescimento do gado, de peixes, de aves e suínos (Loke *et al.*, 2000; Rabolle e Spliid, 2000; Ingerslev *et al.*, 2001).

A presença desses fármacos residuais na água pode causar efeitos adversos na saúde, seja humana ou de outros organismos presentes nas águas,

como os peixes. Os efeitos causados no sistema reprodutivo de organismos aquáticos são demonstrados por KANG (Kang *et al.*, 2002), que examinou o efeito do estrogênio natural 17- $\beta$ -estradiol no sistema reprodutor dos peixes. SUMPTER (Sumpter, 1998) descreve a feminilização de peixes machos expostos a estrogênios lançados em oito diferentes rios do Reino Unido através dos efluentes de ETE.

Assim, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção de fármacos em diferentes matrizes é de grande interesse. Atualmente, a determinação destes compostos é efetuada normalmente por meio de técnicas espectrofotométricas, eletroquímicas e, na maioria dos casos, cromatográficas (incluindo as modalidades de cromatografia líquida de alta eficiência e gasosa) (Santos, 2009).

Na maioria das técnicas, são necessárias etapas de preparo da amostra visando uma análise posterior, que normalmente contempla etapas de extração e/ou pré-concentração, de maneira a eliminar os interferentes (limpeza das amostras), ou pré-concentração, de maneira a aumentar o limite de quantificação. No entanto, devido à complexidade de algumas matrizes e aos baixos níveis dos constituintes de interesse, em alguns casos, o preparo da amostra pode não eliminar a presença das espécies interferentes, sendo impeditivo para algumas técnicas. Situações desta natureza são notadas quando se pretende analisar amostras cujos constituintes de interesse possuem estruturas moleculares muito similares. Em casos mais particulares, como por exemplo, na separação de enantiômeros, mesmo que a etapa de preparo da amostra propicie a eliminação dos interferentes, uma separação convencional por HPLC utilizando fase estacionária em fase reversa (sílica modificada com octadecil, C18) não possui resolução para distinguir os enantiômeros (Davankov, Kurganov e Bochkov, 1983).

Desta maneira, o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande relevância em diferentes áreas do conhecimento, contemplando, por exemplo, os setores alimentício, biotecnológico, ambiental e farmacêutico. Neste ponto, as ciências analíticas desempenham um papel fundamental no tocante ao estabelecimento de protocolos analíticos compreendendo desde preparo da amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse. Estas considerações mostram que o emprego de materiais seletivos, tanto na etapa de preparo de amostra quanto na de separação, é relevante, principalmente em matrizes complexas e quando as espécies de interesse estão presentes em baixas concentrações (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a).

Atualmente, de maneira a tentar solucionar estes problemas, a biomimetização de interações bioquímicas tem se desenvolvido cada vez mais e representa um dos maiores desafios em várias áreas da ciência. A partir deste ponto de vista, polímeros sintéticos com impressão molecular, mais conhecidos como MIP (*"Molecularly Imprinted Polymers"*) têm atraído considerável atenção na última década, pois aparecem como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de sistemas com reconhecimento biomimético semelhante aos sistemas específicos enzima-substrato e/ou antígeno-anticorpo (Verli e Barreiro, 2005).

As vantagens dos MIPs já otimizados em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) incluem: fácil preparo, baixo custo; possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço e resistência a ambientes adversos nos quais biomoléculas naturais não resistiriam, como na presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão. Ainda, os MIP podem ser armazenados a seco em temperatura ambiente

por longos períodos de tempo, sem perda do desempenho inicial (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005b).

Contudo, o desenvolvimento da síntese e aplicação dos MIPs são procedimentos demorados e com custos elevados, visto demandar uma série de análises, que utilizam volumes consideráveis de solventes para preparo das soluções e das amostras padrão, que tem preço elevado devido à sua pureza. Além do impacto ambiental causado, pois tais amostras descartadas terão de ser devidamente tratadas antes do descarte.

Para contornar esta situação, a simulação computacional surge como uma ferramenta complementar para o entendimento das interações moleculares predominantes nos MIPs, principalmente quando se trata da pré-seleção dos monômeros funcionais adequados e solventes porogênicos em impressão molecular (Meier *et al.*, 2012; O'mahony *et al.*, 2013). Recentemente pesquisas de aplicação computacional em impressão molecular têm aumentado continuamente e tem resultado em simulações de sistemas completos de pré-polimerização com detalhes moleculares incluindo concentrações reais, desta maneira demonstrando o potencial da modelagem molecular para o planejamento racional dos MIPs.

Com base nas informações, no presente trabalho de Tese foi realizada a melhoria dos parâmetros de síntese de um MIP utilizando-se de simulações computacionais de maneira a confirmar que o estudo sistemático do complexo de pré-polimerização da impressão molecular é um dos principais fatores da síntese. O MIP foi aperfeiçoado utilizando-se como molécula molde o antimicrobiano Ciprofloxacina. A simulação computacional foi realizada utilizando-se da mecânica quântica com parâmetros empíricos, de forma a minimizar ao máximo o custo computacional. Com os resultados da simulação, foi realizada a síntese de três MIPs

distintos, somente quanto aos monômeros, de maneira a comprovar os dados obtidos na simulação. O melhor MIP foi utilizado para aplicação com amostras de urina humana enriquecida com Ciprofloxacina. Tal trabalho trata sem dúvida de uma contribuição significativa para a química analítica, principalmente devido o fato de existir, na literatura, uma escassez de dados sobre o desenvolvimento por simulação semi-empírica do complexo de pré-polimerização de MIPs.

### **1.1. FLUOROQUINOLONAS**

A resistência bacteriana tem motivado a busca por fármacos cada vez mais potentes. No final dos anos 80, as fluoroquinolonas (4-quinolona-3-carboxilatos) tornaram-se uma excelente opção para o tratamento de infecções causadas por bactérias aeróbias gram-negativas, pois, além de potentes, esses fármacos permitiam a continuação do tratamento por via oral (Gales *et al.*, 1997).

Estes esforços resultaram na descoberta de uma série de fluoroquinolonas com características notáveis tanto em relação a sua amplitude quanto a intensidade de suas atividades contra bacilos gram-negativos e cocos *in vitro* e para a capacidade de controlar infecções sistêmicas induzidas experimentalmente com bactérias selecionadas. Outro fator importante é que estes fármacos permitiram administração por via oral e em doses bem toleradas. O efeito principal do Ácido Nalidixico, e provavelmente de todas as fluoroquinolonas, é o bloqueio da enzima bacteriana DNA-girase, que é essencial para manter a torção super-helicoidal no DNA e que tem um papel vital no metabolismo e na reprodução bacteriana, matando os germes causadores da doença (Wolfson e Hooper, 1985).

Esta enzima apresenta uma série de atividades, dentre elas, torna a molécula de DNA do microrganismo compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa

enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias. A resistência ocorre, principalmente, por alteração na enzima DNA-girase, que passa a não sofrer ação do antimicrobiano. Pode ocorrer por mutação cromossômica nos genes que são responsáveis pelas enzimas alvo (DNA-girase e topoisomerase IV) ou por alteração da permeabilidade ao fármaco pela membrana celular bacteriana (porinas), sendo possível a existência de um mecanismo que aumente a retirada do fármaco do interior da célula (bomba de efluxo). As fluoroquinolonas são bem absorvidas pelo trato gastrointestinal superior. A biodisponibilidade é superior a 50% e o pico sérico é atingido em 1 a 3 horas após a administração. Os alimentos não reduzem substancialmente a absorção, mas retardam o pico da concentração sérica. As concentrações na próstata, fezes, bile, pulmão, neutrófilos e macrófagos excedem as concentrações séricas, já as concentrações na saliva, ossos, e líquido cérebro espinhal são menores que as plasmáticas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2006).

As quinolonas mais novas como a levofloxacina atingem altas concentrações séricas, com concentração máxima de 4 mg L<sup>-1</sup> após administração de 500 mg por via oral. Possui meia-vida de 7 a 8 horas, podendo ser administrada tanto por via endovenosa, como oral, uma única vez ao dia. A eliminação é predominantemente renal, aproximadamente 80 a 90%. As principais indicações clínicas das quinolonas são para o trato gênito-urinário, gastrointestinal, respiratório, osteomielites, partes moles e ação contra microbactéria (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2006).

Os produtos comerciais mais representativos desta classe de fármacos incluem os princípios ativos: Ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, acrosoxacina, perfloxacina, cinoxacina, ácido nalidíxico e besifloxacino.

### 1.1.1. Ciprofloxacina

A Ciprofloxacina, nome químico 1-ciclopropil-6-fluor-4-oxi-7-piperazin-1-ilquinilona-3-ácido carboxílico, fórmula molecular  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ , é um antimicrobiano já existente no mercado há muitos anos. Pode ser adquirido sob a forma genérica ou pelos similares, incluindo: Bactoflox®, Ciflox®, Cinoxiflox®, Cipro®, Ciprobiot®, Ciprocina®, Ciproxil®, Cirok®, Cypro®, Procin®, Proflox®, Quinoflox®. A Ciprofloxacina é habitualmente comercializada em comprimidos de 250 mg, 500 mg, 750 mg ou 1000 mg. Sua estrutura molecular e dos principais interferentes que podem estar presentes e interferir em amostras complexas são apresentadas na Figura 1.

Do grupo químico das quinolonas, classificado como antimicrobiano, a Ciprofloxacina é indicada para tratamento do trato respiratório, do ouvido médio, dos seios paranasais (sinusite), dos olhos; dos rins e/ou do trato urinário, dos órgãos reprodutores, inclusive inflamação dos ovários e das tubas uterinas, gonorreia e infecções da próstata, da cavidade abdominal, da pele e de tecidos moles, para infecção generalizada (septicemia), infecções ou risco de infecção (profilaxia), descontaminação intestinal seletiva em pacientes em tratamento com imunossuppressores, e em crianças e adolescentes é indicado para tratamento de infecção aguda na fibrose cística. Indicado ainda para terapia imediata e para

tratamento de antraz após inalação de bacilos (*Bacillus anthracis*) (Cloridrato de Ciprofloxacino, 2013).

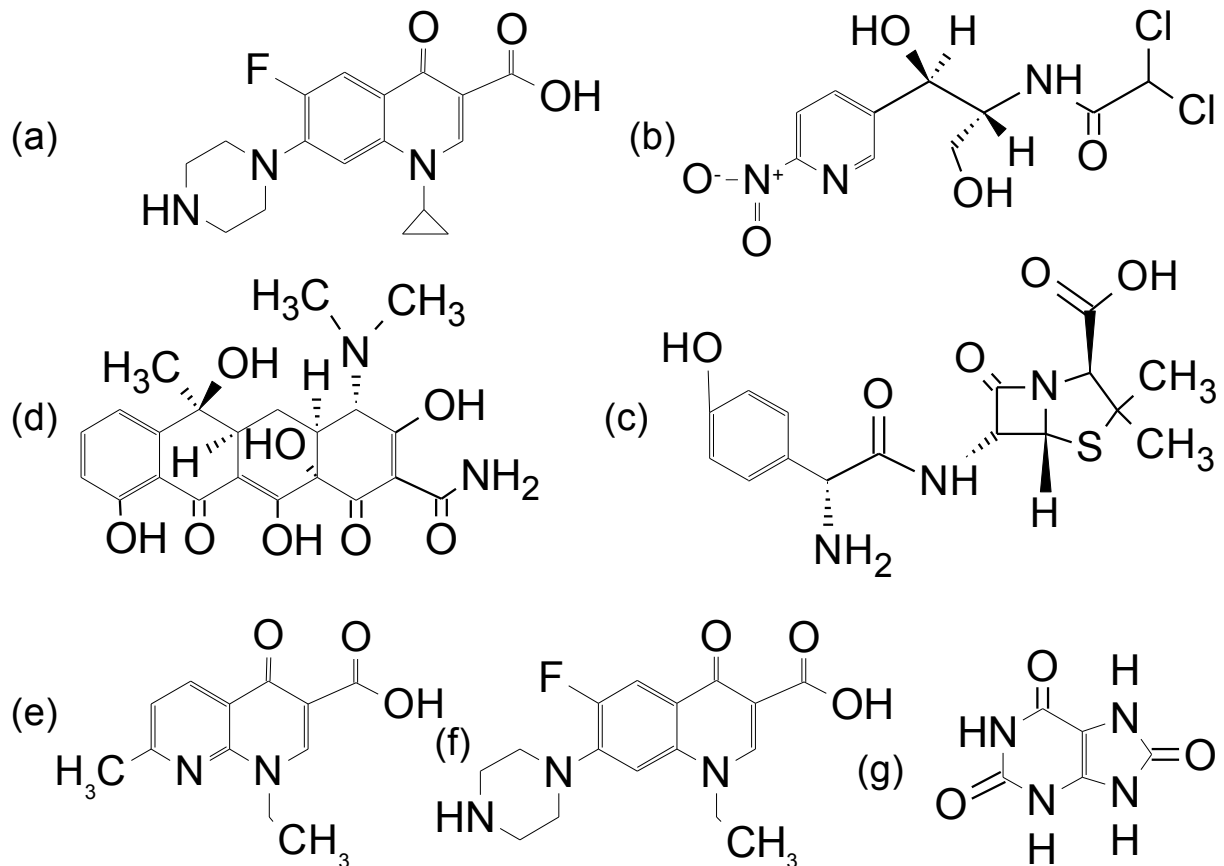


Figura 1. Estrutura química da a) Ciprofloxacina, b) Cloranfenicol, c) Amoxicilina, d) Tetraciclina, e) Ácido Nalidixico, f) Norfloxacin e g) Ácido Úrico.

A Ciprofloxacina tem se mostrado ativa para a maioria das espécies dos seguintes microrganismos: *Enterococcus faecalis*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus saprophyticus*; *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus pyogenes*; *Campylobacter jejuni*; *Proteus mirabilis*; *Citrobacter diversus*; *Proteus vulgaris*; *Citrobacter freundii*; *Providencia rettgeri*; *Enterobacter cloacae*; *Providencia stuartii*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Haemophilus influenzae*; *Salmonella typhi*; *Haemophilus parainfluenzae*;

*Serratia marcescens*; *Klebsiella pneumoniae*; *Shigella boydii*; *Moraxella catarrhalis*; *Shigella dysenteriae*; *Morganella morganii*; *Shigella flexneri*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Shigella sonnei* (Dailymed, 2010).

Devido a sua toxicidade, com largo histórico de efeitos adversos debilitantes, é apropriado somente quando antimicrobianos melhores tolerados tiverem sido ineficientes para curar a infecção. A concentração máxima de Ciprofloxacina no soro sanguíneo é mostrada na Tabela 1 para as doses de 250 mg até 1000 mg.

Tabela 1. Concentração máxima de Ciprofloxacina no sangue (Dailymed, 2010).

Dose (mg)	Concentração Máxima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
250	1,2
500	2,4
750	4,3
1000	5,4

Em alguns tecidos pode existir um excesso de concentração, particularmente em tecidos genitais, incluindo a próstata. Em sua forma ativa, a Ciprofloxacina está presente na saliva, secreções nasais e brônquicas, mucosas dos seios, fluido da vesícula cutânea, linfa, líquido peritoneal, bile e secreções da próstata. Aproximadamente 40 a 50% da dose administrada oralmente é excretada na urina como fármaco inalterado. Após uma dose oral de 250 mg, a concentração na urina usualmente é maior que  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante as primeiras duas horas e aproximadamente  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  entre 8 e 12 horas depois da dosagem. A excreção total é virtualmente completada depois de 24 horas (Dailymed, 2010). Na Tabela 2 está apresentada a dose que deve ser prescrita para alguns tipos de infecção em que se utiliza o fármaco.

Tabela 2. Guia de dosagem para adultos (Dailymed, 2010).

<b>Infecção</b>	<b>Dose</b>	<b>Frequência</b>	<b>Duração</b>
Trato urinário	500 mg	12 h	7 a 14 Dias
Prostatite bacteriana crônica	500 mg	12 h	28 Dias
Do trato respiratório inferior	750 mg	12 h	7 a 14 dias
Sinusite Aguda	500 mg	12 h	10 dias
Pele e estrutura da pele	750 mg	12 h	7 a 14 Dias
Óssea e articulações	750 mg	12 h	4 a 6 semanas
Intra-Abdominal	500 mg	12 h	7 a 14 Dias
Diarreia infecciosa	500 mg	12 h	5 a 7 Dias
Febre Tifóide	500 mg	12 h	10 Dias
Infecção uretral e do colo do útero	250 mg	Dose única	Dose única
Inalação de Antrax (pós exposição)	500 mg	12 h	60 Dias

Desta maneira, levando-se em consideração que a dose é elevada e grande quantidade dela é excretada diretamente pela urina, o trabalho de desenvolvimento de um material que permita a identificação em amostras de urina é de grande relevância, pois permite estudar a excreção por pacientes que estejam em tratamento com a Ciprofloxacina com melhor sensibilidade e Limite de Detecção.

#### **1.1.1.1. Impactos Ambientais**

Como citado anteriormente, quando um fármaco é utilizado em tratamento clínico, devido a sua baixa biodegradação e/ou atenuação natural, ele é comumente

descartado juntamente com a urina. Estes fármacos deveriam seguir primeiramente as ETEs. Encontrar fármacos nestas estações é esperável, porém é preocupante.

No entanto, sabe-se que boa quantidade do esgoto no Brasil é descartada diretamente nos lagos e rios, o que agrava ainda mais o cenário ambiental do país. Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008 realizada pelo IBGE, ( INSTITUO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008) apenas 55 % dos municípios brasileiros têm o serviço de coleta de esgoto e mais alarmante, apenas 28% têm serviço de tratamento de esgoto. Considerando que a pesquisa levou em consideração que os municípios em que pelo menos um bairro (ou apenas parte dele) é suficiente para dizer que o município tem tratamento de esgoto, o cenário brasileiro se revela alarmante. Desta maneira, a maioria dos fármacos residuais em urina no Brasil é despejada diretamente nos leitos de rios.

A ocorrência de fármacos residuais no esgoto doméstico e águas naturais é um importante tópico de interesse internacional, e atualmente são considerados “Contaminantes Emergentes”. Estudos demonstram que esses fármacos e seus metabólitos estão presentes em ambientes aquáticos em várias partes do mundo. Kolpin e colaboradores (Kolpin *et al.*, 2002) detectaram antimicrobianos, como tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clorotetraciclina), sulfonamidas (sulfadimetoxina, sulfametazina, e sulfametoxazol), macrolídeos (roxitromicina, claritromicina), fluoroquinolonas (Ciprofloxacina, norfloxacina), lincomicina, trimetoprim e tilosina, em amostras de águas superficiais nos Estados Unidos.

Quando um fármaco é despejado no meio ambiente, há três destinos possíveis para ele (Bila e Dezotti, 2003):

1. Pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico;

2. Pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como às penicilinas;
3. Pode ser persistente como o clofibrato, que é um antilipêmico.

No entanto, ainda hoje pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no meio ambiente. A Figura 2 apresenta um esquema que sugere possíveis caminhos para os fármacos quando descartados no meio ambiente.

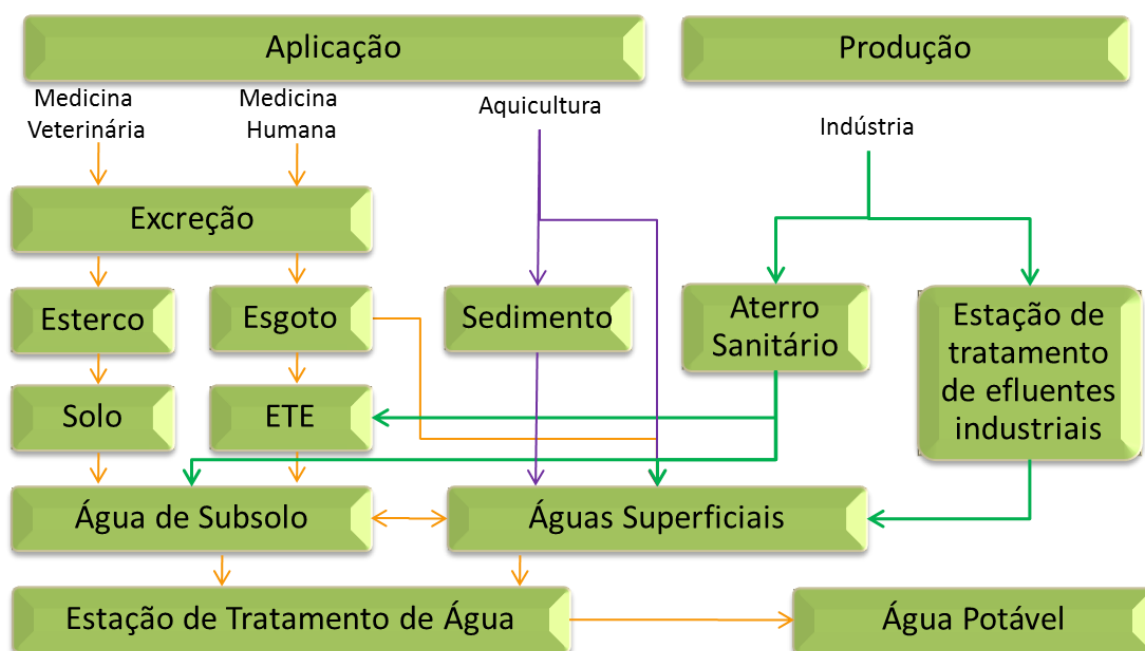


Figura 2. Possíveis rotas dos fármacos quando descartados no meio ambiente (Bila e Dezotti, 2003).

Desta maneira, para proteger a saúde da população a água potável passa por processos de tratamento. Estes processos devem ser tão eficientes quanto o necessário para eliminar/separar os componentes orgânicos indesejáveis, os micro-organismos e os compostos antropogênicos da água que é distribuída para a população.

No entanto, o que se observa atualmente é que o principal propósito do tratamento de água é a remoção dos compostos orgânicos, turbidez e os micro-organismos da água, em detrimento a atenção aos compostos antropogênicos.

Técnicas, tais como a coagulação e filtração, são eficientes para remoção dos compostos orgânicos e da turbidez, mas tem se mostrado ineficientes para a eliminação de compostos farmacêuticos (Gibs *et al.*, 2007). Assim, os fármacos, além de causar os possíveis danos já citados, também podem agir diretamente na população, o que pode causar problemas à sua saúde, de maneira adversa ao seu propósito.

No trabalho de Vieno e colaboradores (Vieno *et al.*, 2007) foi apresentado um estudo sobre novas técnicas para separação e/ou eliminação de 13 fármacos que se mostraram mais efetivas, tais como absorção por carvão ativado ou granular, oxidação por ozônio e separação por membranas. O estudo mostrou que na maioria dos casos, após a utilização das novas técnicas, a maioria dos fármacos foram eliminados e apresentaram concentrações menores que o limite de quantificação (LQ), entretanto, dos fármacos estudados, a Ciprofloxacina não apresentou redução na concentração e foi detectada no final do tratamento com praticamente a mesma concentração.

Como não se conhece adequadamente os efeitos causados pela exposição crônica de baixas concentrações de compostos farmacêuticos por longos períodos de tempo a separação destes compostos é de grande relevância.

#### **1.1.1.2. Métodos utilizados para determinação de Ciprofloxacina**

Atualmente existem diversos métodos reportados na literatura que podem ser aplicados para análise da Ciprofloxacina.

A espectrofotometria visível e ultravioleta (UV-Vis) é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. Os compostos orgânicos que possuem dupla ligação absorvem fortemente a radiação no comprimento de onda do ultravioleta remoto, como no caso da Ciprofloxacina.

No trabalho de Fratini (Fratini e Schapoval, 1996) pode-se observar a aplicação da técnica para a quantificação de Ciprofloxacina. No trabalho foi utilizado 1% de nitrato de ferro (III) e 1% de ácido nítrico para formação de um complexo com a Ciprofloxacina, o que resultou em uma solução amarela alaranjada com um máximo de absorção de 435 nm e estável por 60 min. No entanto, a técnica é ineficiente para amostras complexas. A faixa de absorção dos compostos interferentes são amplas, o que resulta em picos largos que se sobrepõem ao pico da Ciprofloxacina, o que prejudica a recuperação analítica do método.

Outra técnica possível é a eletroforese capilar que se baseia na relação carga/massa. Tal técnica tem sido utilizada tanto para determinação em amostras sólidas quanto fluidos biológicos. Michalska e colaboradores (Michalska, Pajchel e Tyski, 2004) compararam os resultados de linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão com os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados se mostraram promissores, apesar de relativamente menos eficientes que os de cromatografia.

A cromatografia eletrocínética capilar também é uma técnica promissora. Tal técnica envolve a combinação da eletroforese e a interação do analito com aditivos (por exemplo, surfactantes), que forma uma fase dispersa que se move com velocidades distintas. Chen e colaboradores (Chen *et al.*, 2012) utilizaram a técnica para separação de fluoroquinolonas. No entanto, nestas aplicações as condições de melhoria dos resultados dependem de grande investimento e tempo. As condições aperfeiçoadas no caso de Chen resultaram em um cromatograma com 15 min de medida.

A cromatografia em camada delgada é uma das técnicas mais utilizadas para separação e identificação de fármacos. É realizada sobre uma placa de vidro,

plástico ou folha de alumínio, revestida com uma fina camada de material adsorvente, geralmente sílica-gel, óxido de alumínio ou celulose. Apresenta a vantagem de utilizar pouco solvente e amostra. Existe grande quantidade de fases estacionárias e solventes disponíveis comercialmente para esta técnica. Nyamweru e colaboradores (Nyamweru *et al.*, 2013) utilizaram a técnica para determinação de Ciprofloxacina utilizando acetona-água-amônia (30:3:5, v/v) como fase móvel. O problema da técnica é a difícil reprodutibilidade, pois é muito difícil a confecção de duas placas idênticas, com a mesma quantidade de amostra, além da dificuldade de determinação exata do fator de retenção.

A extração em sistemas de duas fases aquosas apresenta potencial tecnológico para separação e enriquecimento de fármacos. A técnica consiste na separação da molécula-molde e impurezas baseada em suas diferentes solubilidades nas fases líquidas. No trabalho de Chen e colaboradores (Chen *et al.*, 2014) a técnica foi utilizada para separação e enriquecimento de Ciprofloxacina. O principal problema da técnica consiste em ser destrutiva, com resultados que dependem de grandes investimentos e a poluição do meio ambiente, visto a grande quantidade de solventes utilizados na técnica.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) é a técnica mais frequentemente utilizadas para a determinação de fluoroquinolonas. A HPLC é o método oficial de identificação e doseamento segundo a farmacopeia brasileira (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002). Segundo a farmacopeia, na cromatografia deve-se utilizar um cromatógrafo provido de detector ultravioleta ajustado a 278 nm, coluna de 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a octadecilsilano (C18, 3 µm a 10 µm de diâmetro de partícula), mantida a 30 °C e

com fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup> de ácido fosfórico 0,025 mol L<sup>-1</sup> com pH previamente ajustado com trietilamina para 3,0 (±0,1) e acetonitrila (87:13, v/v) como fase móvel.

A HPLC é uma técnica amplamente empregada para a determinação de Ciprofloxacina tanto em fluidos biológicos, produtos comestíveis de origem animal, alimentação e formulações farmacêuticas (Kamberi *et al.*, 1998; Liang, Kays e Sowinski, 2002; Zotou e Miltiadou, 2002; Kassab *et al.*, 2005; Vybiralova *et al.*, 2005; Uslu *et al.*, 2008). No entanto, na maioria dos casos são reportadas dificuldades para escolha da fase móvel e principalmente para preparação das amostras.

Assim, métodos analíticos que possibilitem a realização de análises com maior versatilidade, baixo custo e simplicidade são sempre desejáveis. Atualmente os principais materiais utilizados para a determinação desses compostos são as colunas C18 que, no entanto, são úteis para qualquer composto orgânico apolar; ou a utilização de enzimas em sensores, que são frágeis e caras.

Uma metodologia analítica alternativa para detecção de Ciprofloxacina é baseada na impressão molecular de polímeros. A alta estabilidade e seletividade destes materiais surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de dispositivos biomiméticos. Desta forma, as vantagens oferecidas pelos polímeros com impressão molecular ficam bastante claras. São diversas as técnicas de produção e validação destes polímeros, e a seguir são apresentadas algumas das estratégias que têm sido empregadas.

## 1.2. POLÍMEROS SINTÉTICOS COM IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP)

### 1.2.1. Aspectos Históricos

O reconhecimento molecular é um requisito fundamental dos sistemas vivos e é o princípio de defesa de nosso organismo contra corpos estranhos, o que nos garantiu a sobrevivência ao longo dos tempos. Assim, não é surpreendente que os cientistas tenham investido grandes somas de tempo e esforço na tentativa de mimetizar funções biológicas responsáveis pela seletividade inerente às interações enzima-substrato, antígeno-anticorpo e fármaco-receptor.

Na história do desenvolvimento da mimetização, três momentos são sublinhados para o aperfeiçoamento da técnica:

1. A primeira teoria sobre as enzimas de Berzelius em 1835 (Sellergren, 2000);
2. A teoria dos receptores de Ehrlich (Limbird, 2004);
3. A teoria de formação dos anticorpos de Pauling em 1940 (Pauling, 1940).

Pauling foi um dos primeiros a afirmar que o antígeno se porta como uma molécula molde e os anticorpos eram modelados ao redor dessa molécula, gerando configurações complementares altamente seletivas (Pauling, 1940).

Contemporaneamente, a invenção da impressão molecular é dada a Polyakov (Polyakov, 1931) que preparou uma sílica pela acidificação de soluções de silicato de sódio, que após a secagem do polímero da sílica gelatinosa, proporcionou uma matriz rígida. Neste trabalho é reportado o efeito da presença de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (carbonato de amônio) como iniciador, que quando posto em um béquer no

dessecador contendo um aditivo, a quantidade de adsorção de diferentes aditivos se mostrou dependente da estrutura do aditivo presente no processo de secagem. Neste caso, Polyakov concluiu que a diferença na taxa e extensão da polimerização da sílica foi devido à utilização de um acidificante fraco, que resultou em uma seletividade aos aditivos utilizados durante a síntese (tolueno, benzeno ou xileno).

A partir de então o interesse pela técnica é acentuado. O ano de 1972 é marcado com o início das técnicas de impressão molecular como a conhecemos atualmente, quando os laboratórios de Wulff (Wulff e Sarhan, 1972) e Klotz (Takagish.T e Klotz, 1972) publicaram independentemente a preparação de polímeros orgânicos com ligantes seletivos predeterminados. Nestes trabalhos moléculas moldes, ou derivados delas, foram adicionadas durante a polimerização e puderam ser reconhecidas posteriormente pelos polímeros molecularmente impressos (MIPs).

No entanto, estes trabalhos envolviam ligações covalentes e a retirada das moléculas para a produção das nanocavidades seletivas apresentava um custo elevado. Arshady e colaboradores (Arshady e Mosbach, 1981) foram os pioneiros a publicar um artigo sobre um MIP em que a molécula molde interagia com o polímero por meio de ligações não covalentes. Outro desenvolvimento relevante para as aplicações atuais foi realizado por Whitcombe e colaboradores (Whitcombe *et al.*, 1995) que sintetizaram um MIP onde molécula molde e o monômero funcional interagem por ligações covalentes no momento da síntese e, por ligações não covalentes no momento do reconhecimento.

Apesar disso, o interesse pela técnica de impressão molecular é recente e se acentua principalmente durante 1997 com aproximadamente 80 artigos originais que foram publicados e chamaram a atenção da comunidade científica e comercial.

Na Figura 3 é apresentada a quantidade de artigos publicados ao longo das últimas décadas.

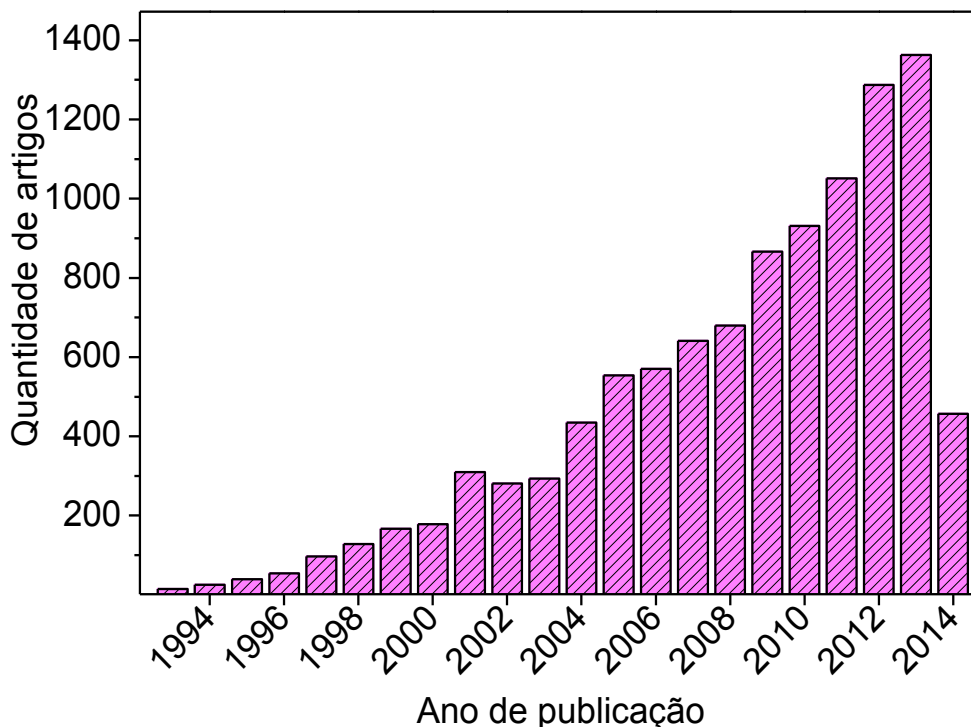


Figura 3. Evolução da publicação anual de trabalhos utilizando o conceito de “Molecularly Imprinted Polymer”<sup>2</sup>.

Em um trabalho realizado por Piletsky e colaboradores (Piletsky, Alcock e Turner, 2001) foi reportado que existiam em 2001, 18 grupos de pesquisas concentrados na Europa, 15 nos Estados Unidos e Canadá e 26 no continente Asiático. O crescimento destes grupos para o período foi igual ao número de trabalhos publicados, o que mostra que o interesse pela área é generalizado. Neste mesmo trabalho, é interessante apontar que as ciências na área de separação contemplam 36% das aplicações dos MIP, 34% correspondem à ciência de materiais, 19% é atribuído ao desenvolvimento de sensores, 6% concentra os trabalhos na área de catálise e 5% ao uso dos MIP com funções especiais, em

<sup>2</sup> Busca realizada no dia 26 de abril de 2014 utilizando o buscador SciFinder.

especial como materiais para liberação controlada de fármacos, ou seja, as técnicas de separação se mostram como uma área em pleno desenvolvimento e interesse mundial.

### 1.2.2. Estratégias e procedimentos de impressão molecular

Em linhas gerais, os MIP são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa (*template*), de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor deste ou de uma molécula com estrutura análoga. Atualmente, a polimerização por radicais livres (ou crescimento em cadeia) constitui o método de síntese mais importante para a conversão de monômeros em polímeros, sendo largamente explorada na produção industrial de diversos plásticos importantes, isto ocorre pelo fato de muitos monômeros com grupos vinil estarem comercialmente disponíveis a baixo custo (Sousa e Barbosa, 2009).

Após a polimerização, a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (nanocavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito de interesse. Com esta estratégia, o resultado é uma “memória” molecular no polímero, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo do analito (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a). A Figura 4 mostra um esquema genérico da preparação de um MIP.

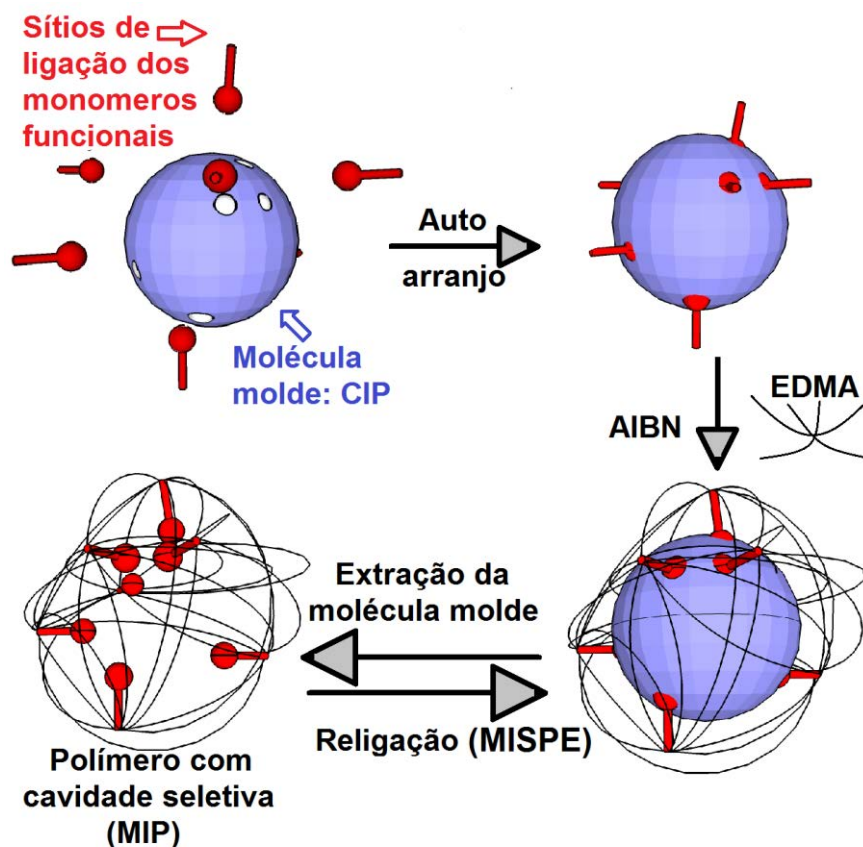


Figura 4. Representação esquemática do processo de impressão molecular.

Todas as etapas de síntese têm sua importância, suas escolhas definem as características desejadas e devem ser planejadas detalhadamente. Várias pesquisas foram e têm sido desenvolvidas para o entendimento das bases físicas do reconhecimento molecular, isto é, o porquê de duas moléculas interagirem ou não. Um dos tratamentos termodinâmicos mais elucidativos da formação dos MIPs foi proposto por Williams (Williams *et al.*, 1991) e pode ser utilizado para o entendimento tanto dos eventos que dão origem para o efeito de impressão, durante a síntese de MIP, quanto para os eventos de reconhecimento, conforme equação (1).

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{t+r} + \Delta G_r + \Delta G_h + \Delta G_{vib} + \sum \Delta G_p + \Delta G_{conf} + \Delta G_{vdW} \quad (\text{equação 1})$$

onde as variações na energia livre de Gibbs são:  $\Delta G_{bind}$ , formação do complexo;  $\Delta G_{t+r}$ , translacional e rotacional;  $\Delta G_r$ , restrição de rotores para complexação,  $\Delta G_h$ ,

interações hidrofóbicas,  $\Delta G_{vib}$ , modos de vibração residuais suaves;  $\sum \Delta G_p$ , a soma das contribuições dos grupos polares que estão interagindo;  $\Delta G_{conf}$ , mudanças conformacionais; e  $\Delta G_{vdW}$ , interações de van der Waals desfavoráveis.

A primeira etapa a se estudar para produção de um MIP é a molécula molde. É nela que os grupos funcionais dos monômeros deverão se ligar primeiramente, de maneira a formar a organização espacial da cavidade seletiva. Algumas moléculas, devido a vários fatores, não são favoráveis para realização de impressão molecular por radicais livres, pois não são quimicamente inertes ou não são susceptíveis a participar em reações radicalares. Em outros casos, tais moléculas não são estáveis a temperaturas superiores a 60 °C ou à radiação UV. Nestes casos a molécula molde deve ser primeiramente modificada de maneira a suprir as demandas da síntese.

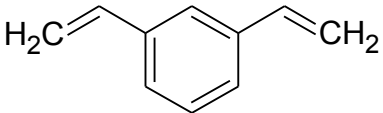
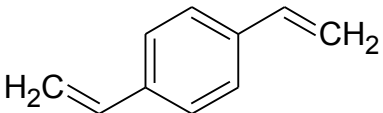
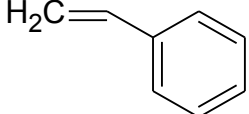
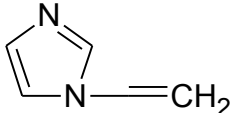
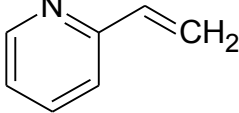
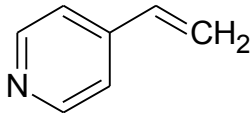
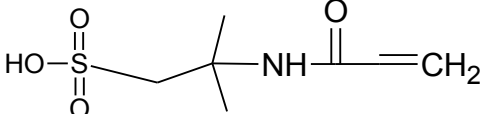
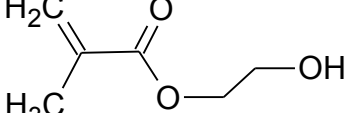
Após a definição da molécula a ser estudada (molde), a próxima etapa consiste na seleção do monômero que apresente uma melhor afinidade com ela. Um dos fatores que indicam a melhor interação é o estudo da formação do pré-complexo (pré-polimerização, molde mais monômero) que apresente a maior variação na energia livre de formação do complexo, conforme equação 1.

Durante as sínteses, o que se percebe é que normalmente se utiliza uma razão molar de monômeros funcionais em relação à molécula-molde superior a um, chegando a até oito vezes em alguns casos, de modo a favorecer a associação entre as moléculas. Na maioria dos casos emprega-se um monômero doador de próton (caráter ácido), quando a molécula molde é aceptora de próton (caráter básico), ou vice-versa. O ácido metacrílico e a 4-vinilpiridina são os monômeros mais reportados para a síntese de MIP na literatura para moléculas básicas e ácidas, respectivamente (Figueiredo, Dias e Arruda, 2008). Conforme citado por Tarley e

colaboradores (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a), na literatura pode-se encontrar em torno de 20 monômeros mais frequentemente utilizados na síntese de novos MIPs. Na Tabela 3 é apresentada a estrutura química, nome e siglas utilizadas para estes monômeros.

Tabela 3. Monômeros para síntese de MIPs orgânicos não covalentes.

Sigla	Monômero	Função	Estrutura Química
M1	<i>N,N</i> -metileno bis-acrilamida	neutro	
M2	Ácido imidazol-4-acrílico	ácido	
M3	Etil éster de ácido imidazol-4-acrílico	ácido	
M4	Ácido acrílico	ácido	
M5	Acrilamida	neutro	
M6	Acroleína	neutro	
M7	Alilamina	base	
M8	Acrilonitrila	neutro	
M9	Etilenoglicol dimetacrilato	neutro	
M10	(2-Aminoetil)-metacrilamida	base	
M11	Ácido metileno succínico	ácido	
M12	Ácido metacrílico	ácido	

M13	1,3-divinilbenzeno	neutro	
M14	1,4-divinilbenzeno	neutro	
M15	Estireno	neutro	
M16	1-vinilimidazol	base	
M17	2-vinilpiridina	base	
M18	4-vinilpiridina	base	
M19	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico	ácido	
M20	2-hidroxi-etil metacrilato	neutro	

Quando são usados dois ou mais monômeros funcionais em simultâneo, torna-se importante levar em consideração as razões molares entre eles, de maneira que promovam a sua reatividade e de modo a assegurar a ocorrência de copolimerização. Tem-se que levar em consideração que a complexação de uma molécula-molde por um monômero funcional pode influenciar sua reatividade, isto devido a perturbações eletrônicas e/ou estéricas do monômero (Sousa e Barbosa, 2009) e assim, ser um fator impeditivo para a formação do MIP.

O próximo passo é a escolha de um agente de reticulação adequado e a sua razão molar em relação à molécula molde. A escolha e razão adequadas são

fundamentais para o desenvolvimento de um polímero nem rígido e nem flexível além do necessário. O agente de reticulação usado na obtenção de um MIP desempenha três funções principais (Sousa e Barbosa, 2009):

1. Controle da morfologia da matriz polimérica (polímero do tipo gel, polímero mesoporoso, macroporoso ou pó microgel);
2. Estabilização dos locais de ligação com capacidade de reconhecimento molecular;
3. Estabilização mecânica da matriz polimérica.

Um polímero impresso adequadamente deve apresentar um elevado grau de reticulação, de maneira que o polímero resultante seja poroso e que estes poros permaneçam até sua utilização, inclusive por diversos ciclos, ou seja, que resulte em polímeros com estabilidade mecânica alta.

O emprego adequado de reagentes que promovam ligações cruzadas no polímero devem conferir a ele, além da estabilidade do complexo “analito-monômero” e, conseqüentemente, a rigidez da nanocavidade formada, a seletividade destes polímeros. O etilenoglicol dimetacrilato (EDMA) tem sido o agente reticulante mais utilizado nas publicações atuais, pois promove a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis, e com rápida transferência de massa. O EDMA combina um éster metacrilato reativo com um espaçador curto, permitindo um número elevado de conformações.

Outros reagentes de ligação cruzada têm sido investigados, conforme estrutura química apresentada na Figura 5, mas apenas o trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) tem apresentado resultados similares ou melhores que o EDMA (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a).

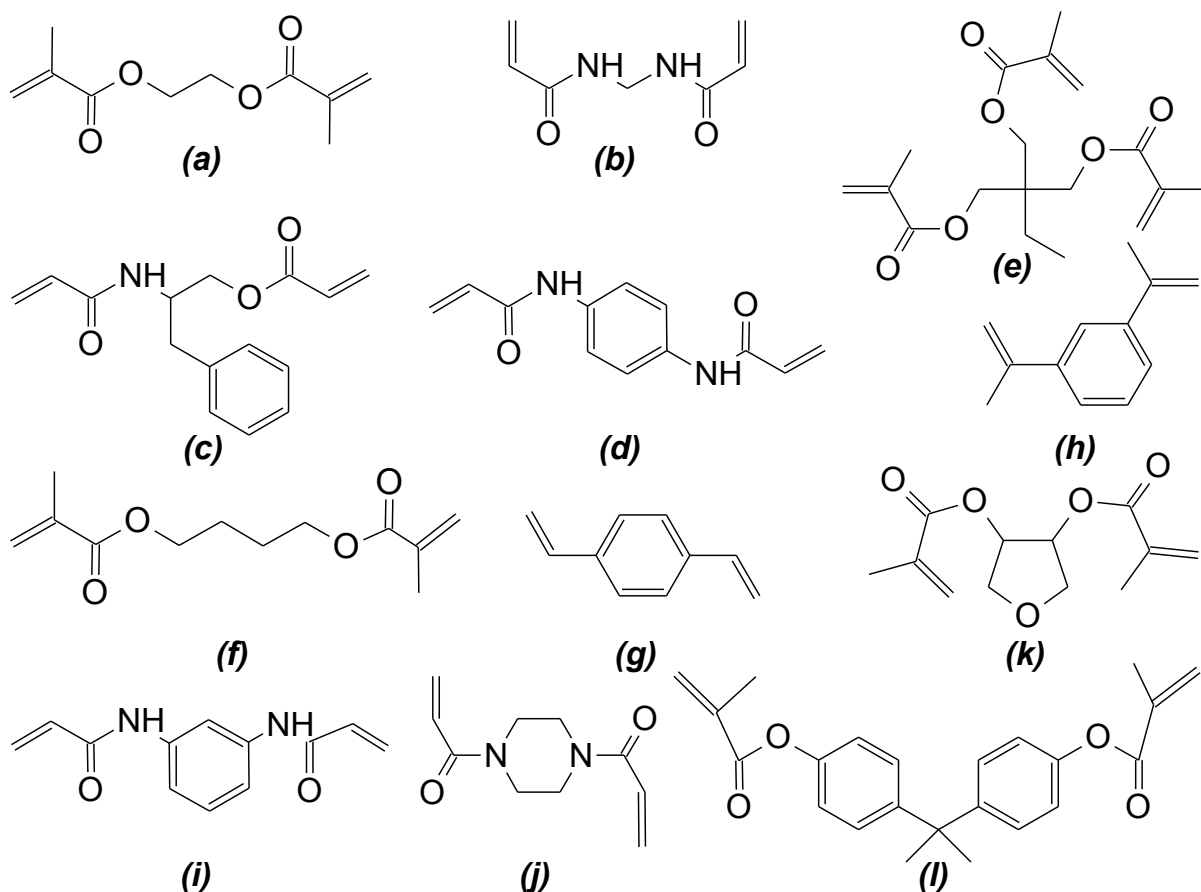


Figura 5. Estruturas moleculares dos agentes de reticulação mais utilizados para síntese de MIPs. (a) etileno glicol dimetacrilato (EDMA); (b) N,N'-metileno-*bis*-acrilamina; (c) N,O-*bis*acrilóila-L-fenilalaninol; (d) N,N'-fenilendiacrilamida e (e) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM). (f) tetrametileno dimetacrilato (TDMA); (g) *p*-divinilbenzeno (DVB); (h) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP); (i) 2,6-*bis*acrilóilamidopiridina; (j) 1,4-diacrilol; (k) anidroeritrotol dimetacrilato; (l) isopropilene*bis*(*i*,4-fenileno) dimetacrilato.

Outra escolha importante na síntese do MIP que influencia suas características morfológicas é o solvente escolhido, denominado solvente porogênico. O solvente porogênico constitui o meio onde estão presentes todos os componentes da polimerização (molécula-molde, monômeros funcionais, agente reticulante e iniciador). Sua escolha, juntamente com as moléculas da síntese, determinará a porosidade dos polímeros. Como se deseja polímeros porosos, a escolha adequada do solvente é crucial para o desempenho do MIP. Baixas porosidades e, portanto, pequenas áreas superficiais representam normalmente

polímeros com baixa capacidade de reconhecimento molecular, basicamente devido à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos.

Em situações de síntese, a seleção do solvente porogênico ideal, que não interfira na interação analito-monômero-reticulante e que garanta uma morfologia adequada, é uma tarefa árdua que demanda grande quantidade de tempo e investimento.

Estudos apontam que solventes porogênicos com características apolares e com baixa constante dielétrica são os mais indicados para síntese devido à sua capacidade para estabilizar pontes de hidrogênio, entretanto, demonstram também que o melhor meio para o posterior reconhecimento da molécula molde é o mesmo meio em que foi feita a síntese (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a). Isto representa um entrave, principalmente para os fármacos e alguns pesticidas, visto que estes normalmente não são solúveis em meios apolares e, conseqüentemente, estes MIPs terão de ser polimerizados em meios polares, como o Metanol ou Água e desta maneira, a extração e/ou pré-concentração direta destas amostras por estes MIPs deverá exibir teoricamente seletividade menos pronunciada pela espécie de interesse.

Para contornar esta situação, pode-se realizar uma extração prévia líquido-líquido da molécula molde, ou realizar a polimerização em meio polar, principalmente em água/metanol, a fim de suprir as mesmas condições na etapa de extração em meio aquoso. Para estes MIPs, o reconhecimento molecular durante a síntese é resultado de uma combinação de interações hidrofóbicas e iônicas do analito com os grupos químicos do monômero (Caro *et al.*, 2006a). Ainda, de maneira a minimizar a influencia das moléculas de água durante a síntese, espera-

se que sejam escolhidos analitos que apresentem principalmente interações hidrofóbicas, caso contrário, as moléculas de água do meio podem impedir, por meio de um efeito competitivo, a retenção dos analitos na cavidade do MIP (Baggiani *et al.*, 2001). Na Figura 6 são apresentadas as estruturas moleculares dos solventes mais utilizados como porogênicos.

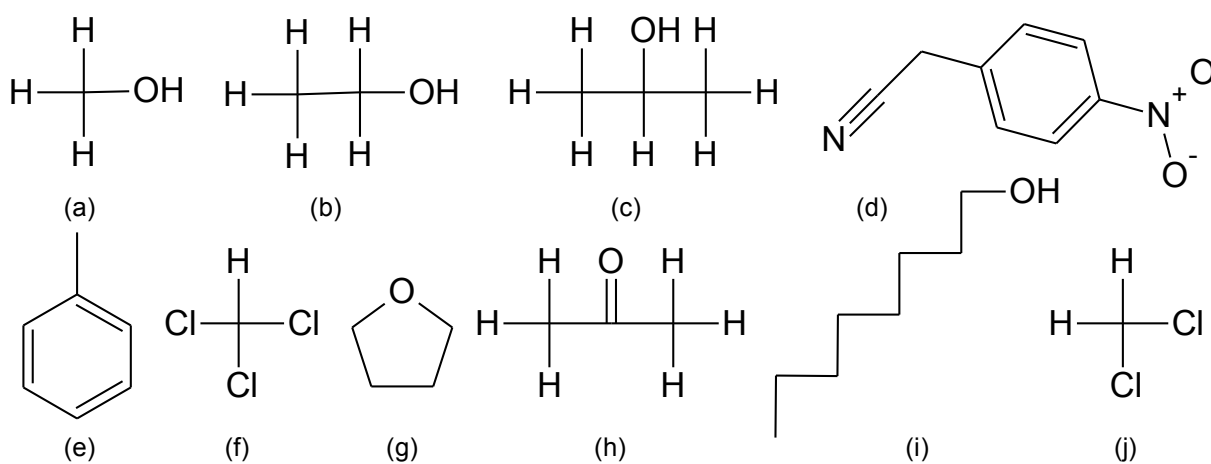


Figura 6. Estruturas moleculares dos principais solventes porogênicos utilizados para síntese do MIP (a) Metanol; (b) Etanol; (c) Isopropanol; (d) Acetonitrila; (e) Tolueno; (f) Clorofórmio; (g) Tetrahidrofurano; (h) Acetona; (g) Octanol; (j) Diclorometano.

Na polimerização, após adição do reagente de reticulação, deve ser acrescentado um iniciador radicalar ao meio reacional. Esse, por sua vez sofre quebra em sua estrutura, ou por radiação UV ou aquecimento, gerando radicais responsáveis pelo início da reação de polimerização (Cormack e Elorza, 2004).

A Figura 7 apresenta alguns exemplos de iniciadores típicos empregados com essa finalidade. Em relação à sua escolha, depende do método selecionado para a síntese. Nos casos em que a molécula-molde é fotoquímica ou termicamente instável os iniciadores que são ativados por estes não são adequados. Isto ocorre, por exemplo, nos casos em que a reação de complexação é conduzida por ligações

de hidrogênio, onde são preferíveis temperaturas de polimerização inferiores, e nessas circunstâncias, os iniciadores ativados por radiação UV são os mais adequados por serem eficientes a baixas temperaturas. Na Figura 7 estão apresentadas as estruturas químicas de alguns agentes iniciadores de polimerização mais utilizados na literatura.

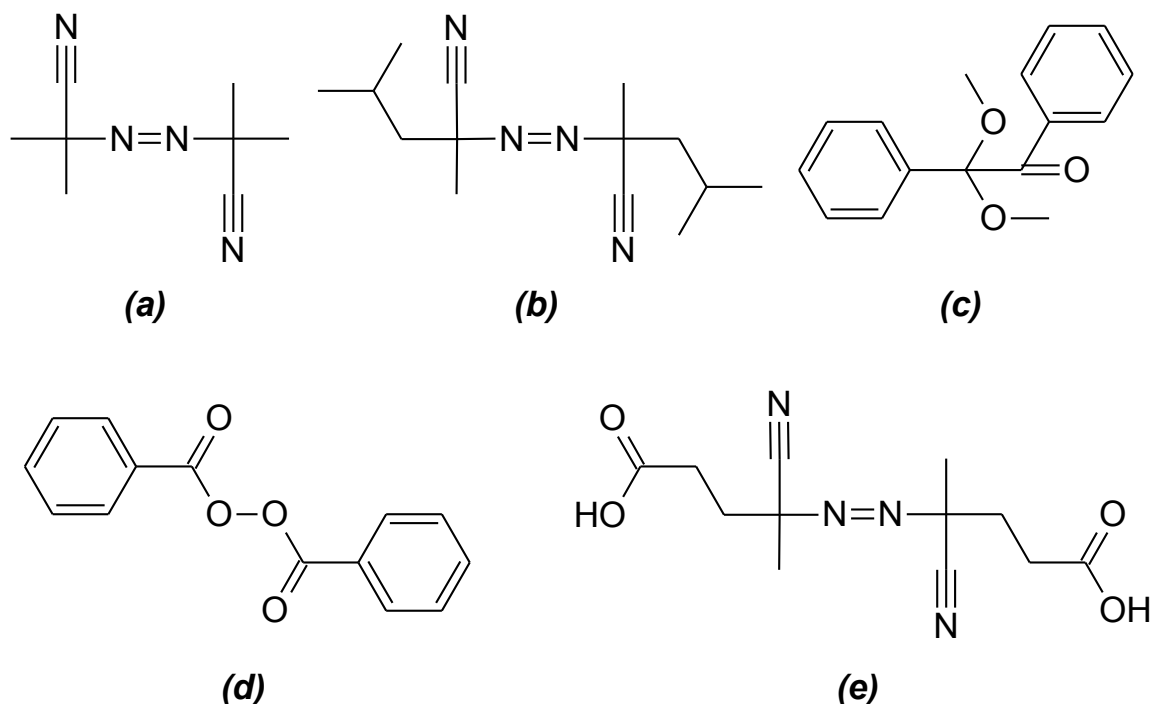


Figura. 7. Estrutura química dos principais iniciadores radiculares utilizados para síntese dos MIPs: (a) 2,2'-azo-*bis*-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-*bis*-dimetilvaleronitrila; (c) dimetilacetal de benzoíla; (d) peróxido de benzoíla e (e) ácido 4,4'-azo-*bis*-(4-ciano pentaenóico).

Deve-se também levar consideração na síntese a presença de oxigênio ao meio reacional. O gás oxigênio retarda (diminui a velocidade) a polimerização por radicais livres, assim, de maneira a maximizar a taxa de propagação dos monômeros e para assegurar a boa reprodutibilidade das polimerizações, é desejável a remoção total do oxigênio dissolvido da solução de monômeros imediatamente antes da polimerização. Esta remoção pode ser conseguida simplesmente ultrassonicando a solução ou borbulhando um gás inerte

(normalmente nitrogênio ou argônio) nela. Para casos de necessidade de degaseificação mais rigorosa o método de congelar e descongelar utilizando bomba de vácuo pode ser necessário (Cormack e Elorza, 2004).

Como citado anteriormente, no processo de impressão molecular a molécula molde é de importância central, é nela que existirá a organização dos monômeros que garantirão a seletividade do polímero. Desta maneira, para realizar o teste de desempenho de um MIP se produz também um polímero de controle (NIP, *Non Imprinted Polymer*). Para síntese do NIP todos os protocolos do MIP devem ser seguidos de maneira idêntica, exceto pela adição da molécula molde ao meio reacional, o que não confere a este polímero a formação da cavidade seletiva. No entanto, o NIP também possui sítios de ligação aleatoriamente distribuídos disponíveis, de maneira que ele também apresenta uma adsorção da molécula molde, podendo ser tão ou mais adsorvente que o MIP em alguns casos.

O que justifica a síntese do MIP é a comparação com outros polímeros, principalmente o NIP, quanto à preferência na adsorção da molécula molde em relação a outras presentes na amostra. Neste caso, o MIP deverá adsorver muito mais a molécula molde em relação ao interferente que o NIP, que deverá adsorver uma quantidade aproximadamente igual das duas, analito e interferente, pela não especificidade da distribuição das ligações.

O método mais utilizado para preparo dos MIPs é o método conhecido por polimerização em “*bulk*”. Neste método a reação é realizada em um sistema homogêneo em um frasco selado contendo o(s) monômero(s), a molécula molde, solvente porogênico, agente reticulante e o iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigênio borbulhando-se N<sub>2</sub> ou Ar e induzida com aquecimento e/ou radiação UV. Por fim, o sólido polimérico resultante é moído, homogeneizado com

uma peneira, e então, é finalmente submetido a uma lavagem com solvente apropriado para extração do analito, visando seu uso posterior, conforme representado na Figura 8. Este método é conhecido como método universal de polimerização, por ser o mais aplicado.

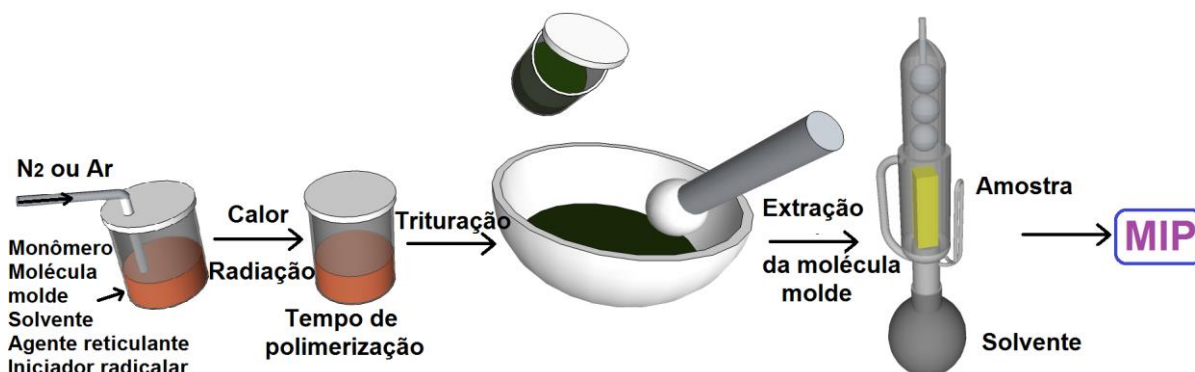


Figura 8. Esquema de polimerização em *bulk*.

Contudo, devido ao processo de trituração, impreterivelmente os polímeros resultantes da polimerização em *bulk* resultam em partículas com formatos irregulares e tamanhos variando em aproximadamente 150%. Outro ponto desvantajoso é o tempo reacional, para que a síntese se complete são necessários aproximadamente 20 h, sendo que normalmente se utiliza 24 horas, de maneira a garantir que o processo seja completado. Além do mais, alguns sítios seletivos formados são destruídos durante a trituração, o que prejudica a capacidade seletiva do polímero. Aproximadamente apenas 50% ou menos do polímero sintetizado possui características para propostas analíticas, após a trituração.

Os MIPs obtidos pelo método de polimerização em “*bulk*” são mais indicados para técnicas de extração como a SPE, ao passo que seu uso como fase

estacionária em HPLC é pouco indicado, devido à heterogeneidade das partículas (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a).

Desta maneira, novas técnicas de preparo têm sido relatadas na literatura com intuito de produzir materiais que permitam diversas aplicações analíticas. Tais técnicas contemplam principalmente reações em sistemas heterogêneos, a fim de permitir o controle do tamanho das partículas, incluindo a polimerização por suspensão (Matsui *et al.*, 1997), por precipitação, (Ye e Mosbach, 2001) e por expansão em multi-etapas (Hosoya *et al.*, 1994). Outros métodos de preparo dos MIPs contemplam reações de polimerização dentro de poros de sólidos de sílicas e resinas (Yilmaz *et al.*, 2002) e reações de polimerização sobre superfície modificada de suporte sólido (Quaglia *et al.*, 2001).

Assim sendo, a escolha da técnica a ser utilizada é de importância fundamental. No presente trabalho visou-se a aplicação em MISPE, desta forma, a polimerização em *bulk* é vantajosa e apresenta bons resultados.

### **1.2.3. Emprego do MIP em técnicas de extração em fase sólida (MISPE)**

O uso de MIPs como materiais seletivos para extração em fase sólida se denomina MISPE (MISPE, sigla em inglês para *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*). A aplicação destes polímeros sintéticos como adsorventes possibilita a pré-concentração e limpeza das amostras, conforme representado na Figura 9, que é importante, particularmente quando a amostra é bastante complexa, com impurezas que possuam características semelhantes à molécula de interesse de maneira que possam interferir na determinação e ou quantificação.

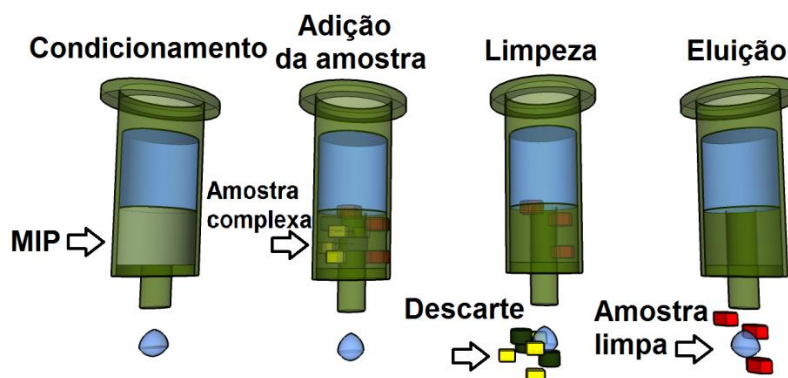


Figura 9. Esquema de funcionamento da extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE).

Um procedimento de MISPE consiste na percolação da amostra no material adsorvente (MIP) disposto em cartuchos. Em seguida, ao se empregar amostras complexas, faz-se necessário efetuar uma etapa de limpeza com um solvente adequado no intuito de extrair as espécies interferentes ligadas ao polímero por interações não específicas. Nesta etapa, a espécie de interesse não deve ser co-eluída. As interações não específicas formadas durante a síntese são as responsáveis pela retenção das espécies interferentes no MIP e são originadas provavelmente devido ao excesso de monômeros no meio reacional.

Sendo assim, na extração em fase sólida, normalmente é realizada uma etapa de limpeza também conhecida como etapa de lavagem a fim de extrair os interferentes retidos nos sítios não específicos. Durante a limpeza a amostra é percolada através do MIP com um solvente de baixa polaridade que não possui a capacidade de interagir fortemente com a Ciprofloxacina, mas que consegue eluir os interferentes da matriz complexa, menos a Ciprofloxacina, que então é retida seletivamente no MIP e se obtém uma etapa de limpeza completa.

Contudo, o grande desafio reside quando o analito de interesse está em amostras aquosas. Neste caso, a molécula e os interferentes seriam retidos não seletivamente no polímero. Desta maneira, para conseguir uma extração seletiva, uma limpeza com solvente orgânico é necessário antes do passo de eluição, de maneira a eliminar as moléculas de água presentes na coluna.

A etapa de limpeza tem que ser otimizada em termos do pH, da natureza da amostra e do volume de solvente utilizado para a limpeza, de maneira a ajustar a capacidade do MIP de ser seletivo para o reconhecimento da molécula de interesse. Desta maneira, o solvente escolhido deve realizar interações não específicas sem quebrar as interações seletivas entre o polímero e a molécula de interesse. Solventes orgânicos de baixa polaridade, tais como diclorometano, tolueno ou clorofórmio são amplamente empregados. Contudo, bons resultados têm sido obtidos com o uso de solventes polares, tais como acetonitrila e metanol. Além do mais, tem-se que levar em consideração o fato de ser desejável que se utilize o mesmo solvente da síntese nesta etapa, o que confere ao polímero o efeito memória (Caro *et al.*, 2006b).

Quando amostras de água são percoladas pelo MIP, a limpeza da coluna pode ser problemática, devido ao fato de o solvente de lavagem ser não polar, o que pode gerar problemas de miscibilidade. Para evitar este inconveniente, o MIP deve ser secado, passando-se ar ou outro gás inerte pelo polímero. Se pequenas quantidades de água permanecer no cartucho após aplicar a amostra, a capacidade de retenção do MIP poderá influenciar no próximo passo de eluição, e ocorrerá um decréscimo na capacidade de retenção e seletividade.

No entanto, apesar do passo de limpeza ser essencial e realizado na maioria dos trabalhos, se o passo de eluição for seletivo o suficiente, ele pode ser evitado.

Neste caso, embora o analito e os interferentes da matriz (por interações não seletivas) sejam retidos no MIP, durante a etapa de eluição os interferentes deverão sair em tempos diferentes da molécula de interesse, desde que se utilize um solvente apropriado. A eluição do analito na ausência dos interferentes é a etapa final da MISPE (Martin-Esteban, 2001).

Durante a eluição, para se conseguir fatores de pré-concentração elevados, deve-se usar pequenas quantidades de solventes, no entanto, as interações entre o MIP e a molécula de interesse são fortes, o que acarretaria na utilização de volumes elevados. Para evitar este problema, tem-se utilizado misturas de solventes orgânicos ou inorgânicos com água ou outro modificador, tais como ácido acético. A água quebra as interações específicas não covalentes e os modificadores tendem a interagir com as moléculas de interesse, competindo com os locais de ligação do polímero. Desta maneira, ambos representam um caminho efetivo e rápido para eluir o analito, inclusive com a possibilidade de a MISPE ser acoplada diretamente em um sistema de detecção on line (MISPE). Nestes procedimentos, etapas de “clean up” e de pré-concentração são, quando possível, executadas simultaneamente, o que confere também aos MIP características de materiais pré-concentradores (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005a).

Na última década, uma das aplicações que se mostraram mais promissoras para o uso do MIP tem sido o uso da MISPE. Muitos dos estudos desenvolvidos têm focado na extração de amostras biológicas, tais como fluidos e tecidos (Caro *et al.*, 2006a; c). Recentemente, a MISPE tem sido aplicada para extração de componentes de outras matrizes, tais como amostras ambientais, como água e solo (Turiel, Martin-Esteban e Tadeo, 2007); alimentos (Cacho *et al.*, 2003) e plantas

(Tamayo, Casillas e Martin-Esteban, 2003), embora alguns estudos apresentem limitações de seletividade ou religação debilitadas.

O uso da MISPE é vantajoso, principalmente quando uma extração seletiva deve ser realizada e os adsorventes comercialmente disponíveis não têm seletividade suficiente. Nestes casos, a MISPE permite não somente a pré-concentração do analito, mas também a remoção dos outros componentes da matriz. O emprego da MISPE vem adquirindo destaque, pois oferece alto grau de seletividade quando comparado com outros adsorventes, como a sílica modificada (C18) e resinas de troca iônica e, ao mesmo tempo, por serem mais estáveis que os imunossorventes (Haupt e Mosbach, 2000).

Outra possibilidade que surgiu em 1990 foi a micro-extração em Fase Sólida (SPME), proposta por Arthur e Pawliszyn (Arthur e Pawliszyn, 1990). O dispositivo de extração consiste basicamente de uma fibra óptica de sílica fundida recoberta por um material polimérico, acondicionada dentro de uma agulha de aço inoxidável. O procedimento de extração é realizado pela inserção da fibra no “headspace” ou diretamente na amostra. Após um determinado tempo de extração dos constituintes de interesse, a fibra é recolhida e levada a um injetor de um cromatógrafo. Atualmente, a SPME é uma técnica bastante difundida para extração de vários constituintes de amostras ambientais, biológicas, alimentícias, entre outras. Entretanto, face ao limitado número de fases poliméricas comerciais, para determinadas amostras a SPME apresenta reduzida seletividade. Neste sentido, o emprego dos MIP em SPME surge como uma opção viável para promover uma extração mais seletiva e, conseqüentemente, melhorar a etapa de separação cromatográfica. No entanto, aplicações neste sentido ainda têm sido estudadas e melhorias ainda tem que ser realizadas. Desta forma, a utilização do MIP como

material biomimético contribui com as técnicas já existentes na química analítica e seu entendimento e desenvolvimento traz inúmeras possibilidades, principalmente na análise de traços em amostras complexas.

#### **1.2.4. O emprego do MIP para determinação de Fluoroquinolonas**

Como visto anteriormente, o número de trabalhos publicados utilizando MISPE é crescente. Os trabalhos com fluoroquinolonas seguem a mesma tendência. No entanto, trabalhos referentes a estudos específicos de alguma delas ainda são escassos, como o caso da Ciprofloxacina, e na maioria dos casos são reportados MISPE seletivos para certa classe de fluoroquinolonas. A seguir será discutido resumidamente o estado da arte do estudo de MISPE para fluoroquinolonas em geral, e os casos de estudo específico para a Ciprofloxacina.

Uma série de trabalhos tem sido publicada atualmente para determinação de fluoroquinolonas pelo grupo de Wang e colaboradores. No trabalho mais recente (Wang, Wang e Han, 2014) os autores descrevem a aplicação da MISPE utilizando um MIP sintetizado com dois monômeros funcionais, um orgânico (ácido metacrílico) e um inorgânico (viniltriétoxisilano). A polimerização ocorreu por suspensão aquosa utilizando-se o surfactante PVP o que resultou na formação de MIPs na forma de microesferas. No trabalho a molécula molde escolhida foi a pazufloxacina, o que resultou em um reconhecimento seletivo a três fluoroquinolonas: Ofloxacina; lomefloxacina e ciprofloxacina, além da própria molécula molde em amostras de leite. O sistema foi acoplado com um cromatógrafo UV-VIS e se obteve faixas de linearidade de 0,2 a 20,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , recuperação de 87,2 a 106,1 %, e desvio padrão

relativo menor a 5,4 %. Os resultados foram satisfatórios, entretanto não foi possível realizar a diferenciação entre as fluoroquinolonas.

Em outro trabalho do mesmo grupo (Yang *et al.*, 2014) um polímero sintetizado de maneira semelhante foi aplicado para determinação das mesmas fluoroquinolonas em amostras de peixe.

Ainda no mesmo grupo de pesquisa foi desenvolvido um MISPE seletivo para fluoroquinolonas em amostras de ovo (Liu *et al.*, 2013). O MIP neste caso teve que ser desenvolvido para ser compatível com extração em água. A síntese não contemplou a utilização de monômeros inorgânicos. Os resultados apresentados neste trabalho foram tão bons quanto dos discutidos anteriormente, com faixa de linearidade de 25 a 2500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , limite de detecção de 0,53 a 1,07  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , recuperação de 89,1 a 102,5% com desvio padrão relativo de 2,6 a 4,8%, respectivamente.

No trabalho de Szultka e colaboradores (Szultka *et al.*, 2013) a MISPE foi aplicada para a determinação de dez tipos de substâncias quimioterapêuticas: amoxicilina, cefatoxime, ciprofloxacina, daptomicina, fluconazol, gentamicina, clindamicina, linezolida, metronidazol, moxifloxacina. Depois de realizado a MISPE as amostras foram analisadas usando uma separação gradiente em coluna C18 de um LC-ESI-MS/MS. Os resultados apresentados no trabalho foram satisfatórios com reprodutibilidade inter e intra-dia com desvio menor que 7,3%, com precisão de  $\pm 8,4\%$  e recuperação de 65 a 83%. A MISPE foi aplicada em amostras de sangue de pacientes internados em um hospital diagnosticados com infecção bacteriana.

No trabalho realizado por Luaces e colaboradores (Luaces *et al.*, 2013) a MISPE foi combinada com um sistema de detecção quimioluminescente em um sistema de injeção em fluxo para determinação de Enrofloxacin em amostras de

água. As amostras foram pré-concentradas e limpas após passarem em um cartucho empacotado com MIP e a seguir foram injetadas no sistema em fluxo. Depois de ajustadas as condições ótimas da MISPE os resultados apresentados se mostraram satisfatórios. No entanto, os resultados para outras fluoroquinolonas, tais como Ciprofloxacina, Norfloxacin, Sarafloxaina, Lomefloxacina e Danofloxacin também se mostraram bons e no final o MIP se tornou seletivo às Fluoroquinolonas. Neste trabalho o limite de detecção foi de  $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$  quando 10 mL de amostras de água foram pré-concentradas, a recuperação foi de 84 a 119% com desvio padrão relativo de 2,1 a 9,3%. As medidas foram validadas utilizando-se um HPLC com detector de fluorescência.

Também com o objetivo de análise de amostras de água Tan e colaboradores (Tan *et al.*, 2013) produziram um MIP com potencial para ser aplicado em MISPE. Neste caso os autores descrevem a funcionalização de grupos vinila na superfície de nanopartículas de carbono mesoporosas. Com a superfície funcionalizada foi possível sintetizar a formação da cavidade seletiva nos poros. Neste caso, a vantagem proposta pelo trabalho está na formação prévia da porosidade do material, no entanto, o trabalho é muito maior e os resultados se mostraram tão eficientes quanto em outras aplicações. Neste trabalho o polímero foi sintetizado com a molécula de Ofloxacin como molde e as moléculas testadas foram Gatifloxacin, Balofloxacin, Enrofloxacin, Norfloxacin e Sarafloxacin. O MIP foi testado por cinco vezes e mostrou eficiência de 90%, menos para a molécula de Norfloxacin.

No trabalho de Kamel e colaboradores (Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011) o MIP para Ciprofloxacina foi produzido por polimerização em *bulk*. Neste trabalho o polímero foi utilizado como modificador para um sensor potenciométrico. Os autores

produziram e caracterizaram três polímeros distintos, variando somente o monômero: ácido metacrílico, acrilonitrila e 2-vinilpiridina. No trabalho os autores concluem que a acrilonitrila foi o monômero mais adequado para a o polímero quando utilizado para sensores em fluidos biológicos, e que o polímero apresentou aplicabilidade comercial. O material sintetizado no trabalho apresentou potencial para aplicação em MISPE.

Para análise de amostras de Ciprofloxacina em urina o trabalho de Caro e colaboradores (Caro *et al.*, 2006a) apresenta uma aplicação de MISPE inovadora. Os autores realizaram a extração em duas etapas combinadas em série, primeiramente com um cartucho Oasis HLB comercial e depois com um cartucho contendo o MIP. Foram injetadas em um espectrômetro de massas amostras após a MISPE e sem o procedimento de extração. Pode-se verificar no artigo que as amostras que não passaram pela MISPE apresentaram picos sobrepostos e que em muitos casos dificultou a discriminação e quantificação dos componentes. Já as que passaram foram limpas, o que possibilitou a discriminação perfeita da Ciprofloxacina. Desta maneira, a MISPE apresenta os resultados esperados para sua utilização. Outro trabalho dos mesmos autores (Caro *et al.* 2006c) descrevem a aplicação do polímero para, além das amostras de urina, aplicações para determinação de Ciprofloxacina em amostras de fígado de porco. O MIP foi sintetizado utilizando-se a Enrofloxacin como molécula molde. Depois da realização da MISPE as amostras foram analisadas utilizando um cromatógrafo com detector UV-Vis a níveis abaixo do limite de resíduo máximo permitido pela União Europeia. No trabalho determinaram-se os limites de quantificação e detecção de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

Em relação às Quinolonas no solo Turiel e colaboradores (Turiel, Martin-Esteban e Tadeo, 2007) sintetizaram um MIP por precipitação para aplicação em MISPE. No trabalho foram testados dois monômeros, o ácido metacrílico e a 4-vinilpiridina e quatro solventes porogênicos: diclorometano, metanol, acetonitrila e tolueno para melhor síntese, o que resultou na síntese de dezesseis polímeros, visto a necessidade de síntese do polímero de controle não impresso (NIP, sigla em inglês para *Non Imprinted Polymer*). Foram testadas as fluoroquinolonas Enoxacina, Norfloxacin, Danofloxacin e Enrofloxacin e as Quinolonas Cinoxacin, Flumequina, Ácido Nalidixico e Ácido Oxolínico. O polímero que apresentou melhores resultados foi o sintetizado com ácido metacrílico e metanol, que foi empacotado em uma coluna cromatográfica e testado *on line*. Os resultados de seletividade foram satisfatórios para as fluoroquinolonas, entretanto o resultado de carga máxima do polímero ainda poderia ser melhorado.

O trabalho de Yan e colaboradores (Yan, Qiao e Row, 2007) é um dos mais citados para uso de MISPE de fluoroquinolonas. O trabalho mostra a análise em amostras de ovos de galinha e tecidos de porcos. No trabalho o polímero foi sintetizado pelo método de *bulk* utilizando-se a Ofloxacin como molécula molde. O resultado foi um polímero seletivo para fluoroquinolonas. Para caracterização do polímero e análise dos resultados os autores utilizaram um HPLC com detector de fluorescência. O trabalho mostra como uma matriz complexa pode ser limpa com eficiência utilizando-se somente de uma etapa de MISPE, o que confere economia e redução de impacto ambiental ao método. Blasco e Picó (Blasco e Pico, 2012) também analisaram a aplicabilidade da MISPE para análise de doze fluoroquinolonas em amostras de ovo. Em seu trabalho os autores utilizam um MIP

comercial e obtiveram resultados satisfatórios de limpeza das amostras, como esperado para a utilização dos MIPs.

O que se pode concluir da leitura destes trabalhos é que, além da imensa possibilidade de aplicação da MISPE para fluoroquinolonas, há também consideráveis possibilidades de métodos síntese, de tipos de monômeros, de agentes reticulantes e estequiometrias.

Realizar um estudo para melhoria destes polímeros é necessária. No entanto, a realização de todos estes testes experimentalmente se torna praticamente impossível devido à quantidade de recursos financeiros e tempo. Desta maneira, as simulações computacionais surgem atualmente como ferramentas de entendimento e melhoria de parâmetros na síntese dos MIPs mais rápidas e baratas.

### **1.3. SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS EM IMPRESSÃO MOLECULAR**

Devido às diversas variáveis existentes na preparação de novos MIPs, em especial a escolha do monômero funcional, por muitas vezes há um excessivo gasto de tempo e reagentes, não chegando ainda a resultados melhorados ao máximo, além de acarretar o aumento do custo de pesquisa e descarte de reagentes contaminantes. É neste momento que o uso de ferramentas computacionais pode auxiliar na escolha dos materiais mais adequados para sua síntese e, desta forma, evitar gastos desnecessários, obtendo MIPs mais seletivos e com melhor desempenho na extração e pré-concentração do analito alvo, pois as simulações químicas computacionais podem mostrar quais monômeros terão melhor afinidade com a molécula de interesse, resultando em polímeros mais eficientes, além de eliminar o fator “tentativa e erro”, muito comum na síntese de novos MIPs.

As simulações computacionais são uma ferramenta para, além de evitar uma abordagem estritamente experimental para melhoria de parâmetros da síntese e religação no polímero, que é frequentemente tediosa e consome um tempo elevado, fornecer uma ferramenta suplementar para compreender as interações moleculares predominantes e uma ferramenta poderosa de pré-seleção para identificar monômeros funcionais e solventes porogênicos adequados em impressão molecular (Meier *et al.*, 2012).

A maior dificuldade ao se trabalhar com química computacional é conseguir fazer as simulações se aproximarem o máximo possível da realidade, tanto no sentido estrutural como energético, o que nem sempre é uma tarefa simples, pois ainda hoje são poucos os termos químicos que podem ser calculados exatamente (Young, 2001). Portanto pode-se resumir o trabalho computacional em conseguir melhorar e aproximar os parâmetros o suficiente para que possam ser considerados quantitativos e indicativos, mas não perfeitos. Um dos modos mais simples de se encontrar a estrutura tridimensional de uma molécula é utilizando-se de métodos de mecânica molecular, evitando a mecânica quântica. Isso é feito construindo uma expressão de campo de força molecular, ou seja, a energia potencial em função de todas as posições atômicas, utilizando destas para estudar propriedades moleculares, sem a necessidade de calcular uma função de onda ou a densidade total de elétrons. A expressão de energia consiste em simples equações clássicas, como a expressão do oscilador harmônico, a fim de descrever a energia associada com o alongamento, curvatura, rotação e forças intermoleculares, como as interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio.

Há diversos métodos de mecânica molecular conhecidos, dentre as quais se podem destacar o MM+ e o AMBER (*Assisted Model Building with Energy*

*Refinement*). Esta última é mais comumente usada em cálculos envolvendo proteínas e ácidos nucleicos, em contrapartida que a primeira vem sendo utilizada em moléculas orgânicas em geral, se encaixando melhor na estrutura dos fármacos, por serem predominantemente de caráter orgânico. O maior problema é que diversas propriedades químicas ainda não podem ser definidas a partir deste método, tais como o estado eletrônico excitado. Portanto, apesar de ser um meio rápido e fácil de cálculo, não é uma boa maneira de se descrever um sistema. Por esta razão pode-se utilizar de outros processos para calcular a energia molecular, tais como os métodos *Ab initio* ou semi-empírico.

O termo *Ab initio* tem origem do latim “a partir do começo”. Esse nome é dado a cálculos unicamente derivados de princípios teóricos, sem inclusão de dados experimentais, sendo uma aproximação da mecânica quântica (Young, 2001). O tipo mais comum de cálculo *Ab initio* é chamado de cálculo Hartree-Fock (abreviado HF), em que a aproximação é chamada de Aproximação de Campo Médio, isto significa que a repulsão elétron-coulomb não é totalmente levada em consideração, mas sim seu efeito médio. Esse método geralmente resulta numa boa aproximação tanto qualitativa quanto quantitativa, porém, esses cálculos frequentemente tomam quantidades enormes de tempo, além de exigir muito da CPU, da memória e de espaço em disco do microcomputador a ser utilizado. Para ilustrar tal complexidade, pode-se dizer que a escala do método HF é  $N^4$ , onde N é o número de bases funcionais da molécula, portanto, um cálculo duas vezes maior demora 16 vezes mais tempo para ser concluído (Young, 2001).

Os cálculos semi-empíricos são feitos com a mesma base de cálculos HF, porém inserindo parâmetros experimentais a fim de minimizar o tempo de processamento, sendo muito mais rápidos que os cálculos *Ab initio*, contudo, os

resultados podem não ser tão precisos, ou mesmo erráticos, se as estruturas da molécula em questão não forem próximas às moléculas da base de dados utilizada como parâmetro do método. Apesar disso, os cálculos semi-empíricos têm sido muito bem sucedidos para moléculas orgânicas, por conterem comumente apenas alguns poucos elementos, sendo a melhor opção, portanto, para os cálculos de interesse neste trabalho.

Desta maneira, o presente trabalho se propõe a entender o comportamento da síntese do complexo de pré-polimerização de um MIP seletivo a Ciprofloxacina e a comprovação de que a técnica é suficiente para escolha do melhor monômero. Posteriormente, será realizada a comprovação experimental dos resultados e aplicação do melhor polímero produzido para MISPE de Ciprofloxacina em amostras de urina humana enriquecida.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Realizar simulações computacionais do complexo de pré-polimerização a fim de encontrar as melhores condições para a síntese de diferentes MIPs para Ciprofloxacina, os quais serão posteriormente confrontados com os resultados obtidos experimentalmente no trabalho e os publicados na literatura (para MISPE de Ciprofloxacina em amostras que tenham como base soluções aquosas).

### 2.2. ESPECÍFICOS

- i. Realizar estudos teóricos de modelagem para selecionar o monômero funcional que possibilite uma menor energia livre de Gibbs com a molécula molde, o que deve corresponder ao complexo mais estável e portanto, o MIP desejável;
- ii. Sintetizar MIPs utilizando a polimerização por *bulk*, utilizando como molde o fármaco Ciprofloxacina e monômeros funcionais indicados através dos estudos de modelagem;
- iii. Caracterizar os polímeros através de:
  - o Análises de adsorção, de maneira a verificar os resultados obtidos através dos cálculos de modelagem molecular;

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de maneira a verificar a estrutura morfológica;
  - Termogravimétrica (TG) de maneira a verificar a estabilidade térmica;
  - Adsorção de nitrogênio (BET e BJH) de maneira a verificar a área superficial e o tamanho e volume de poros.
- iv. Avaliar a seletividade do polímero impresso (MIP) frente ao polímero não impresso (NIP) em relação a análogos estruturais da Ciprofloxacina e possíveis interferentes das amostras de urina humana através de estudos de adsorção. As medidas deverão ser realizadas utilizando um sistema HPLC.
- v. Avaliar o polímero impresso como fase estacionária em cartuchos de extração em fase sólida (MISPE) através da eficiência de limpeza e pré-concentração das amostras de Ciprofloxacina em urina humana, utilizando um sistema *off line* com um HPLC.

CAPÍTULO III

METODOLOGIA  
E PARTE  
EXPERIMENTAL

### 3. METODOLOGIA E PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Nos últimos anos têm sido cada vez mais frequentes os trabalhos publicados descrevendo aplicações de simulações computacionais baseados no método quântico *ab initio* e semi-empírico para projetar MIPs. Estes métodos descrevem as propriedades dos sistemas analisados baseados em uma aproximação da distribuição eletrônica das moléculas estudadas. Numerosos métodos e conjuntos de base têm sido desenvolvidos com o objetivo de descrever um sistema com alta precisão a um custo computacional mínimo. Estes métodos, em contraste com outras abordagens teóricas, tal como a mecânica molecular, descrevem a estrutura eletrônica das moléculas envolvidas e geralmente produzem representações consideravelmente melhores das interações não covalentes presentes no sistema em estudo, comparados com os casos em que se utilizam simulações menos rigorosas.

O método *ab initio* (primeiros princípios) leva em consideração somente os cálculos quânticos, sem incluir resultados experimentais. O método se baseia na resolução da equação de Schrödinger que determina quanticamente a energia total de um sistema como a soma das energias cinética e potencial. No entanto, a resolução desta equação é bastante complicada e aproximações são necessárias para que ela possa ser aplicada para sistemas de interesse prático. A aproximação de Born-Oppenheimer separa o movimento nuclear do movimento eletrônico, visto que a massa nuclear é várias vezes maior que a massa dos elétrons. A energia obtida com esta aproximação é a energia eletrônica do sistema, calculada através

de uma série de equações, chamadas equações de Hartree-Fock. A energia eletrônica assim obtida, somada à energia de repulsão internuclear, produz a energia total. O maior problema do conjunto método *ab initio* é a impossibilidade de se expandir ou contrair os orbitais para que se ajustem ao ambiente molecular, além do alto custo computacional, visto que o número de integrais a serem resolvidas cresce aproximadamente com a quarta potência do número de funções de base, chegando a alguns milhões mesmo para moléculas pequenas.

Para resolver este problema, foi criado o método semi-empírico. Neste método parâmetros empíricos são introduzidos ou previamente calculados na resolução da equação de Schrödinger que de maneira a eliminar a necessidade de cálculo de algumas dessas integrais e conseqüentemente diminuir o custo computacional empregado.

A maioria dos trabalhos publicados têm utilizado o método semi-empírico para descrever as interações presentes na mistura pré-polimerização, em particular no entendimento da interação entre a molécula molde e os monômeros funcionais (Nicholls *et al.*, 2009).

Para a obtenção de MIPs altamente seletivos, é reconhecido que a interação entre o monômero e o *template* é um dos fatores cruciais na síntese satisfatória destes materiais, senão o mais importante. Desta forma, as simulações realizadas focaram-se na obtenção da informação que indicasse a maior afinidade entre o fármaco e os monômeros comercialmente disponíveis e que são comumente empregados na síntese de MIPs para diferentes analítos, conforme já apresentado na Tabela 3.

As simulações foram realizadas usando um computador equipado com o sistema operacional Windows XP Profissional, configurado com um processador

Intel® Pentium® E2140 Dual-Core com 1,6 GHz de frequência, capacidade de memória RAM DDR3 de 4 Gigabytes e placa mãe 8v553mz.

Antes das simulações, as estruturas dos monômeros e da Ciprofloxacina foram otimizadas utilizando campo de força Amber (mecânica molecular), com um algoritmo “Steepest Descents” convergindo a 0,1 kJ mol<sup>-1</sup> com um máximo de 720 ciclos, projetadas no modo zwitterion e salvas na extensão “.pdb”, que contém as informações sobre a composição e a posição dos átomos das moléculas.

Para realização das simulações semi-empíricas foram utilizados os seguintes programas e suas funções:

**i. HyperChem® 8.0.5**

Primeiramente foi necessário desenhar as moléculas, como parâmetro de entrada para os softwares. O programa HyperChem foi utilizado para a modelagem das moléculas estudadas, ou seja, os vinte monômeros, apresentados na Tabela 3 e a Ciprofloxacina. Com o programa as moléculas foram desenhadas manualmente, inserindo-se os átomos e suas ligações.

**ii. OpenEye®**

O OpenEye® é um pacote de programas que exercem várias funções na simulação, dentre eles o programa:

- *VIDA 3.0.0* é utilizado para visualizar as moléculas modeladas com o HyperChem e para conferir possíveis erros de ligações entre átomos.
- *Omega2* gera diversos conformeros das moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais de um conformero específico. Os conformeros resultantes da

Ciprofloxacina e dos monômeros foram salvos no formato OSS que contem informações sobre as cargas parciais de cada átomo e suas coordenadas espaciais. O programa, por padrão, gera dez conformeros de cada molécula estudada. Para as simulações foram escolhidos três conformeros ao acaso para realizar os testes simulatórios, visto que os dez apresentariam custos computacionais possivelmente desnecessários. Para o caso dos três apresentarem impedimentos, outros poderiam ser escolhidos.

- *Szybki 1.2.2* altera a conformação da molécula até que atinja seu estado de menor energia, ou seja, o estado mais estável e provável de ocorrer experimentalmente.

### iii. **Autolt 3.3.6.0**

Autolt é uma linguagem de script BASIC-like livre e projetada para automatizar a interface gráfica do Windows e scripts em geral. É um aplicativo que utiliza linhas de comandos (*scripts*) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos.

### iv. **Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com pacote MOPAC (Molecular Orbital) 2009**

É utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação individual de cada um dos monômeros, listados na Tabela 3, com a molécula de Ciprofloxacina calculando a energia liberada (E),

resultando assim a afinidade entre os mesmos, conforme a equação 2. Quanto maior o módulo da energia liberada mais exotérmica a interação e, portanto, mais fácil de ocorrer e mais estável o complexo.

$$E = E_{AB} - (E_A + E_B) \quad (\text{equação 2})$$

onde  $E_{AB}$  representa a energia total do sistema contendo uma molécula de Ciprofloxacina com a energia  $E_A$  e uma molécula do monômero com a energia  $E_B$ .

O pacote MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semi-empírica para os cálculos de aproximação. Nos experimentos foi utilizado a parametrização AM1 e os cálculos quânticos do *ab initio*. Os parâmetros escolhidos para o programa foram:

- Número de estruturas de células randômicas = 100;
- Os valores da distância máxima das energias de ligação das interações de Hidrogênio, Aromática, Eletrostática, Hidrofóbica, forças de Van der Walls e interações dipolo-dipolo = 4 Å;
- Temperatura = 298 K;
- Convergência de força = 0,001 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup>;

Após as simulações o MMH gera um arquivo de saída com os resultados em um arquivo txt com resumo da simulação. Neste arquivo foram tomados como importantes para entendimento das interações os valores da energia livre de associação ( $E$ , kJ mol<sup>-1</sup>), a energia de associação ( $E_{AB}$ , kJ mol<sup>-1</sup>), conforme explicado na equação 2 e o tempo computacional. Dos resultados da interação com os monômeros, as maiores energia de interação foram utilizadas como fator para escolha dos monômeros a serem utilizados na síntese.

### **3.2. REAGENTES UTILIZADOS E SOLUÇÕES**

Os reagentes utilizados foram de grau analítico ou HPLC. Todas as soluções que necessitaram de água foram preparadas utilizando água deionizada padrão MilliQ®.

Os reagentes, soluções e ácidos empregados:

- Ciprofloxacina (CIP), Norfloxacina (NOR), Ácido Nalidixico (NAL), Amoxicilina (AMX), Tetraciclina Hidroclorada (TCL), Cloranfenicol (CLR) e o Ácido Úrico (URC), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim - Alemanha).
- 1-vinilimidazol (1VN), Acrilamida (ACL), Ácido Acrílico (AA), Etileno glicoldimetacrilato (EDMA), 2,2'-azo-*bis*-iso-butironitrila (AIBN), foram adquiridos da Sigma (St. Louis – USA).
- Metanol e a Acetonitrila, ambos grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- O ácido acético, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil).

### **3.3. EQUIPAMENTOS**

#### **3.3.1. Síntese dos MIPs/NIPs**

Para ajudar a dissolver os componentes foi utilizado um aparelho de ultrassom=fabricado pela Unique®, modelo USC – 2500, com capacidade máxima de

5,7 L e possibilidade de aquecimento ajustável de 30 a 60°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) e temporizador digital de 0 a 60 min.

Todas as sínteses foram iniciadas por aumento da temperatura das soluções, para isso, utilizou-se um banho-Maria Luca 150/22A/E que permite aquecimento controlado de temperatura através de um termostato hidráulico da ambiente até 110 °C. Tem potência de 1800 W, o que permite controle rigoroso da temperatura, mesmo em condições adversas de temperatura.

Para limpeza das amostras foram utilizados extratores soxhlet da marca Duran® com capacidade de 125 mL e uma manta aquecedora com regulagem de temperatura analógica modelo 300 da marca Fisatom®.

### **3.3.2. Espectrofotômetro UV-VIS**

Para quantificação da limpeza dos MIPs utilizou-se o espectrofotômetro para detecção residual de Ciprofloxacina. As medidas espectrofotométricas na região do UV-vis foram realizadas em um espectrofotômetro Hewlett Packard® modelo 8453 interfaciado por um programa UV-Visible Chemstation Software Hp-854X. Utilizou-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

### **3.3.3. Medidas cromatográficas**

Durante os trabalhos foram utilizados dois cromatógrafos de marcas e tipos de detectores diferentes. O cromatógrafo Varian® com detector de fluorescência foi utilizado para os estudos de religação onde se necessitou determinar somente a Ciprofloxacina, visto esta ser uma molécula fluorescente e o equipamento ser mais sensível. Quando se necessitou determinar soluções binárias, como no caso dos

testes de seletividade, e no caso das amostras de urina humana, em que moléculas não fluorescentes estavam presentes, com o Ácido Úrico, foi necessário a utilização do cromatógrafo Shimadzu® com detector UV-Vis, que apesar de menos sensível possibilitou quantificar todas as moléculas.

### **3.3.3.1. Cromatógrafo com detector Fluorescência**

Foi utilizado um sistema cromatográfico Varian Pro Star HPLC (Varian®, USA) equipado com uma bomba ternária modelo 230, detector de fluorescência modelo 360, amostrador com um sistema de injeção automatizado modelo 400, equipado com uma coluna cromatográfica de fase reversa Luna C18 (250×4,60 mm e 5 µm de tamanho de partícula) LC da Phenomenex®.

Baseado no trabalho de Uslu e colaboradores (Uslu *et al.*, 2008), o método cromatográfico utilizado foi composto de uma eluição isocrática realizada com fase móvel H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, na concentração de 0,002 mol L<sup>-1</sup> em água (solvente A) em Acetonitrila (solvente B) na proporção de 80% do solvente A para 20% do solvente B (v/v) com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para obtenção do cromatograma foram de 280 nm e 480 nm, respectivamente.

### **3.3.3.2. Cromatógrafo com detector UV-VIS**

Para as análises de seletividade e de aplicação em amostras de urina humana foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu®, modelo HPLC-Prominence, Bomba quaternária, auto-injetor para 96 amostras, detector UV-Vis modelo SPD20A, também equipado com uma coluna cromatográfica de fase reversa Luna C18 (250×4,60 mm e 5 µm de tamanho de partícula) LC da Phenomenex®. O método

cromatográfico se manteve o mesmo que o descrito em 3.3.3.1 e o comprimento de onda de absorção da Ciprofloxacina foi de 280 nm.

#### **3.3.4. Porosimetria por adsorção de nitrogênio**

Porosimetria por adsorção de nitrogênio envolve determinada massa de polímero seco sendo exposto a um gás (geralmente nitrogênio) a uma série de pressões fixas. Através da medição da quantidade de gás adsorvido como função da pressão, uma isoterma de adsorção pode ser construída a partir da qual, utilizando o modelo BET, informações sobre a área superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ), volume de poro específico ( $\text{mL g}^{-1}$ ), diâmetro médio de poro e distribuição de tamanho de poro podem ser extraídas. O método é particularmente útil para analisar em detalhe poros de porte médio (meso-) e pequeno (micro-). (As denominações da IUPAC de tamanho de poros são: microporos  $<2 \text{ nm}$ ,  $2 \text{ nm} <$  mesoporos  $< 50 \text{ nm}$  e macroporos  $> 50 \text{ nm}$ ) (Cormack e Elorza, 2004).

Desta maneira, para obter os dados texturais dos MIPs sintetizados, foram medidas as áreas superficiais e para o entendimento das nanocavidades seletivas foram feitas medidas do volume de poros. As medidas foram realizadas no aparelho na determinação da área superficial específica e volume específico dos poros dos polímeros da Quantachrome NOVA 1200e da Universidade Federal do Rio de Janeiro, gentilmente realizadas pelo Prof. Dr. Emerson S. Ribeiro. O aparelho se encontra conectado com um micro computador, que fornece diretamente os resultados de volume médio dos poros.

### **3.3.5. Medidas de microscopia eletrônica de varredura**

Para avaliar o resultado da morfologia, e suas respectivas superfícies, os polímeros MIP e NIP foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de alta resolução. As imagens de MEV foram obtidas pela dispersão dos polímeros sobre uma fita de carbono condutora com dupla face (3M™) previamente fixada sobre um porta-amostra. Os polímeros assim fixados foram recobertos com ouro.

Os equipamentos utilizados para obtenção das imagens foram o Microscópio de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F), operando em voltagem de 300 kV, e o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV; Topcon, modelo SM300), ambos do Instituto de Química do IQ-UNESP-Araraquara.

### **3.3.6. Medidas termogravimétricas**

Análises termogravimétricas dos MIPs foram feitas para verificar as suas respectivas estabilidades térmicas, de maneira a verificar se poderiam ser realizadas as lavagens em extrator soxhlet, visto que a lavagem com metanol atinge temperaturas em torno de 80 °C, e até que condições se poderia expor o MIP. Para isso, utilizou-se o sistema de análise térmica TG-DTA da TA Instruments modelo 2960 onde, através de uma micro balança, se obteve a porcentagem de perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. A análise foi realizada em atmosfera de ar visto que o interesse estava focalizado no comportamento da amostra em situações reais; com fluxo de 100 mL min<sup>-1</sup>, com velocidade constante de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, desde a temperatura ambiente e com uma quantidade inicial de 7 mg.

### 3.4. SÍNTESE DOS POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS

Foram sintetizados três polímeros impressos e não impressos distintos, variando-se entre eles somente o monômero. Os MIPs/NIPs foram sintetizados através da técnica de polimerização em *bulk*, onde a reação é realizada em sistema homogêneo.

Em relação à razão molar, Spivak (Spivak, 2005) discute em seu trabalho de revisão uma série de aperfeiçoamentos gerais para os MIPs. Nele é mostrado que o complexo de pré-polimerização pode ser melhorado, aumentando a quantidade de monômero ou molécula molde, ou ambos. No entanto, o aumento na concentração das moléculas do complexo de pré-polimerização prejudica a religação do polímero visto que sua razão com o agente reticulante vai diminuindo. No trabalho é apresentado que os experimentos de melhoria dos MIPs publicados na literatura têm mostrado que a razão molar molécula molde : monômero limite para síntese de MIPs funcionais é 1:1 enquanto que a razão molar ótima é 1:4. Desta maneira, esta razão foi escolhida como padrão para a síntese do presente trabalho.

A síntese ocorreu dentro de um tubo de vidro de 25 mL onde foram adicionados 7 mL de ACN como solvente porogênico, 0,1 mmol de Ciprofloxacina e 0,4 mmol de monômero. A mistura foi levada sonicada na temperatura ambiente por 5 min a fim de garantir a solubilização de todos os componentes. A solução foi guardada no escuro por 2 horas em atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente. Após este tempo, foi adicionado à mistura 3,2 mmol do agente reticulante EDMA, que foi levada novamente sonicada por 5 min à temperatura ambiente e a solução foi guardada por mais 22 h, ainda em atmosfera de nitrogênio e isenta de luz. Então, 0,1 mmol do iniciador radicalar AIBN foi adicionado, mantendo-se sempre

que possível a atmosfera de nitrogênio, e a solução foi levada a um banho-Maria ajustado a 60 °C por mais 24 h para síntese termicamente ativada.

Para manter a atmosfera de nitrogênio no momento em que as soluções foram guardadas e no momento da síntese, os tubos foram selados com parafilme®. Um ponto importante é o impedimento de realização de polimerização por irradiação UV, uma vez que a Ciprofloxacina sofre degradação rápida quando exposta a ela.

Como o polímero resultante é um sólido, foi necessário realizar a moagem utilizando-se um almofariz e pistilo. Para que as partículas resultantes fossem mais homogênea possível, elas foram peneiradas com 80 mesh de malha de maneira a possibilitar o controle do tamanho das partículas. O polímero retido na peneira foi novamente moído e peneirado.

Para extrair os possíveis interferentes da síntese, o excesso de monômero e a molécula molde (de maneira a criar a nanocavidade seletiva), o polímero foi lavado usando um extrator soxhlet com metanol:ácido acético (9:1, v/v). O solvente foi substituído diariamente e analisado utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS. O MIP foi exposto à extração até quando a molécula molde não foi mais quantificada no solvente, de maneira que, no momento da adsorção de uma amostra de Ciprofloxacina não se tenha interferência de Ciprofloxacina da síntese.

Uma ilustração esquemática para o processo de impressão molecular da Ciprofloxacina utilizando os monômeros 1-Vinilimidazol (1VN), Ácido Acrílico (AA) e Acrilamida (ACL) está apresentada na Figura 10.

De maneira a verificar o efeito de impressão, foi preparado um polímero de controle com métodos de síntese e lavagem exatamente iguais, exceto pela adição da Ciprofloxacina, o que resulta em um polímero não impresso (NIP), ou seja, neste polímero não existem as nanocavidades seletivas, somente sítios ativos dos

monômeros não arranjados quimicamente para ligação preferencial com a molécula molde. Após o processo de limpeza, todos os polímeros foram secos a 70 °C e mantidos nesta condição até o uso de maneira a evitar que a umidade no local interferisse nas análises. Cabe ressaltar, que o polímero é estável nesta temperatura e entende-se que não ocorre deformação das nanocavidade seletivas ao analito.

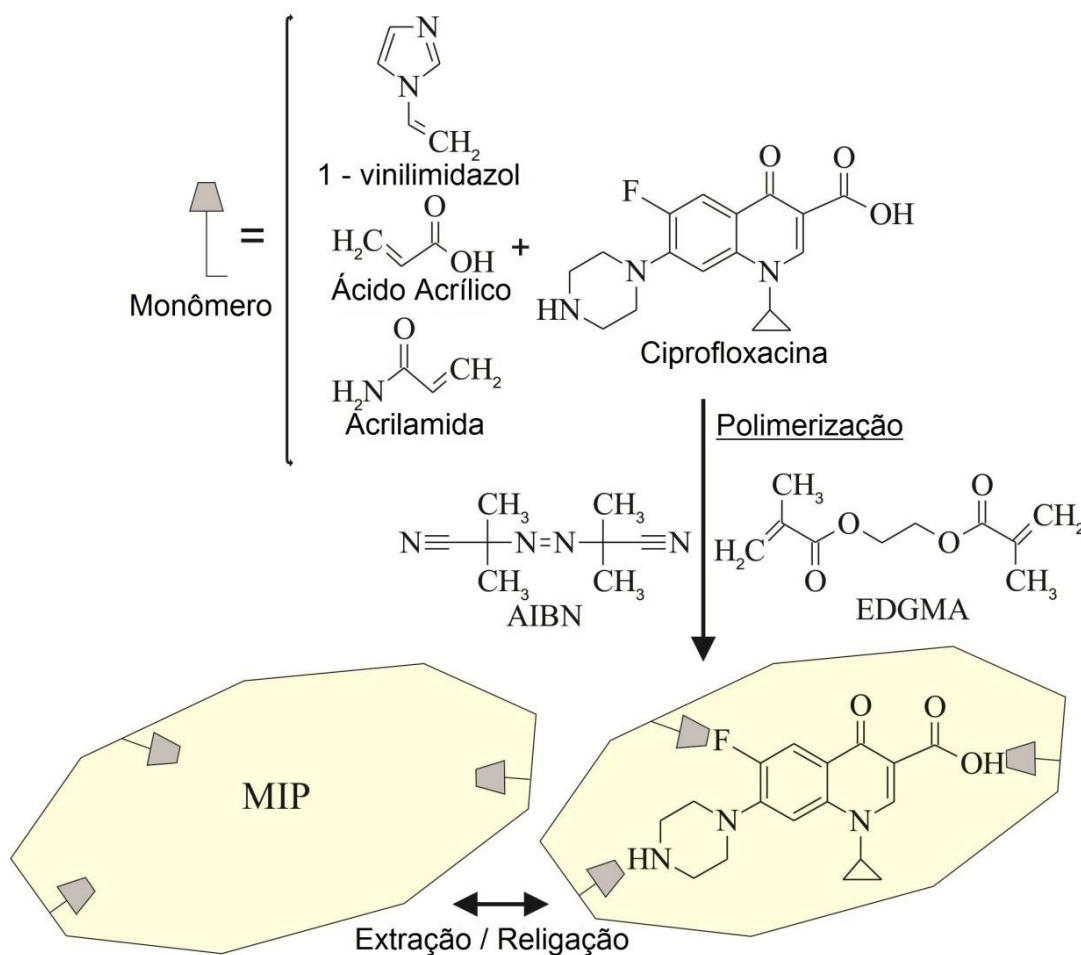


Figura 10. Preparação do polímero molecularmente impresso MIP-CIP-EDMA (adaptada de (Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011)).

### 3.5. ANÁLISES DE RELIGAÇÃO

Para avaliar a criação das nanocavidades seletivas, o método utilizado para caracterização do MIP foi o experimento de religação. Este experimento envolve a

análise de misturas heterogêneas de MIPs em uma solução do substrato (Ciprofloxacina) (Spivak, 2005).

Utilizando-se do polímero com as nanocavidades não preenchidas (lavado) diferentes concentrações ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) de Ciprofloxacina diluídas ( $C_T$ ) são expostas a certa massa de polímero ( $m_{pol}$ ) de maneira que a Ciprofloxacina deverá se ligar no polímero e irá sobrar uma concentração na solução ( $C$ , concentração livre na solução).

Para se determinar a concentração livre, o polímero deve ser separado. Isso pode ser realizado por filtração ou por centrifugação e posterior remoção cuidadosa do sobrenadante. No caso das medidas em HPLC, de maneira a proteger a coluna cromatográfica, realizou-se os dois procedimentos, ou seja, a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi filtrado em uma membrana com  $0,45 \mu\text{m}$  de tamanho de poro. A massa de Ciprofloxacina (mg) que ficou retida em cada grama de polímero ( $Q$ ), quando se utiliza um volume inicial de solução de Ciprofloxacina ( $V$ ), é deduzida facilmente e chega-se na equação 3:

$$Q = \frac{(C_T - C) \cdot V}{m_{pol}} \quad \text{(equação 3)}$$

No entanto, o que se sabe é que condições como o tipo de solvente, o pH e a cinética da reação são fatores que influenciam no resultado da religação, desta maneira estas condições foram melhoradas antes das análises de religação para entendimento das características físicas.

### 3.5.1. Procedimentos de otimização da interação MIP – analito

Primeiramente, foi escolhido o solvente de extração. Levando em consideração os apontamentos feitos na literatura (Caro *et al.*, 2006a) de que devido ao efeito memória, as melhores condições de extração se dão quando os solventes são os mesmos das condições de síntese (acetonitrila) e como a Ciprofloxacina teria que ser extraída em amostras com base aquosa (urina), o trabalho focou na variação na razão destes dois solventes.

A justificativa principal de estudo da composição de solventes é devido a alterar a solubilidade da molécula na solução, oferecendo, desta maneira, maior ou menor dificuldade de acesso às nanocavidades seletivas do polímero.

O experimento foi realizado com amostras contendo 20%, 30%, 50%, 70% e 80% (v/v) de água, sendo o percentual restante de acetonitrila, ambos realizados simultaneamente e à temperatura de 298 K. Utilizou-se para isso frascos âmbar, onde foi adicionada uma solução de 5,0 mL de Ciprofloxacina a concentração de 150,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 50 mg de MIP e os diferentes solventes, como esquema da Figura 11.

A solução foi mantida em movimento por 2 h utilizando-se um agitador magnético de maneira a evitar a formação de precipitado. Então as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi filtrado com uma membrana Milipore® 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas em um HPLC com detector de fluorescência.

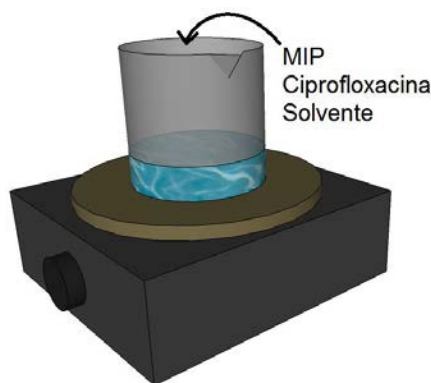


Figura 11. Esquema de otimização do melhor solvente, pH e cinética de reação.

Como a solução continha água foi necessário também encontrar o melhor pH de extração. O estudo do pH foi incluído no planejamento de otimização devido à dependência da estrutura da Ciprofloxacina com o pH do meio. A Ciprofloxacina tem dois pKa's;  $pK_{a1} = 5,94$  e  $pK_{a2} = 8,70$ ; correspondentes ao grupo carboxila (-COOH) na posição 7 e ao grupo piperazila na posição 3, respectivamente, e assim podem existir quatro formas possíveis para a molécula de Ciprofloxacina; (i) como um cátion ácido, (ii) espécie neutra não ionizada, (iii) zwitteriônica intermediária, e (iv) como um íon básico, todas estas espécies dependentes do pH. A máxima solubilidade da Ciprofloxacina é encontrada em pH de 5,02 (Lizondo *et al.*, 1997). Assim, neste trabalho somente valores de pH menores que 5,0 foram incluídos nos experimentos variando o pH das misturas de extração em 2,0; 2,5; 3,5; 4,5 e 5,0. O estudo do pH foi realizado nas mesmas condições do estudo da otimização do solvente e utilizando o seu resultado.

Com as condições otimizadas para a interação entre o MIP e analito relacionadas ao melhor solvente e pH de ligação, a seguir foi estudada, sob condições idênticas às anteriores, a influência da cinética de adsorção e dessorção na capacidade de retenção do MIP. As amostras foram expostas ao MIP pelos tempos de 5, 30, 60, 90, 120, 240 e 300 min.

Outro parâmetro importante quando se pretende usar um material adsorvente, como um MIP, em experimentos de extração em fase sólida (MISPE), está relacionado à obtenção da curva de ruptura (*breakthrough curve*) que representa a evolução da concentração da solução de Ciprofloxacina em função dos parâmetros de adsorção, como o tempo de contato (ou volume injetado), concentração da solução e temperatura. No trabalho foram mantidos constantes a temperatura (298 K) e a concentração de ciprofloxacina na solução ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e variando o fluxo da amostra pelo MIP em 0,5; 1,0 e 2,0  $\text{mL min}^{-1}$ . O experimento foi realizado empregando-se um cartucho para SPE (Analion®, 6 mL de capacidade) onde foi empacotado 35 mg de MIP. O cartucho foi acoplado em um sistema Manifold e o fluxo controlado utilizando uma bomba de vácuo. Na Figura 12 é apresentado um esquema representativo da curva de ruptura.

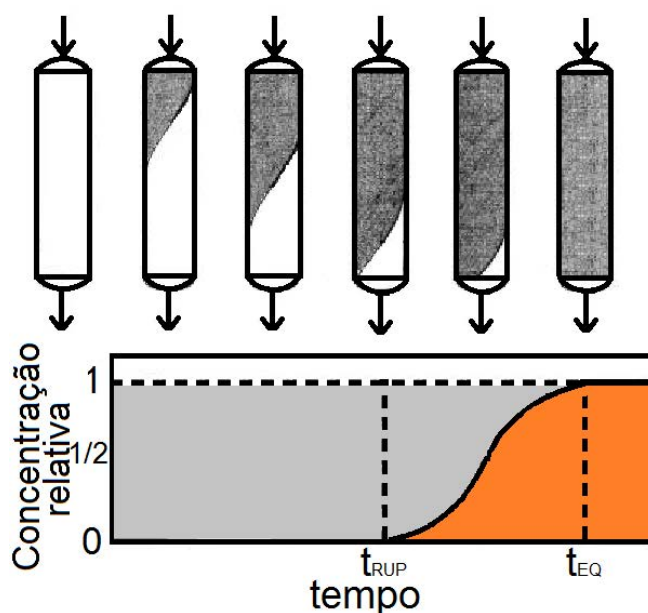


Figura 12. Esquema representativo da curva de ruptura.

Para o estudo da curva de ruptura os experimentos foram realizados em triplicata. Com seus resultados foi possível determinar o fluxo máximo a ser empregado durante a MISPE de maneira que não comprometa as análises e a carga

máxima suportada durante a extração em fase sólida. Para isso, foi utilizado o modelo de ajuste da curva proposto por Thomas (Ansari *et al.*, 2012).

Os princípios básicos assumidos por Thomas em seu modelo de adsorção são:

- i. Desconsiderar a dispersão axial e radial pela coluna;
- ii. A adsorção ser descrita por uma taxa de reação de pseudo-segunda ordem que se reduz a uma isoterma de Langmuir no equilíbrio;
- iii. A disposição das partículas na coluna ser constante, ou seja, os espaços vazios entre as partículas são constantes;
- iv. As propriedades físicas da fase sólida e da fase líquida são constantes;
- v. As condições de reação são isotérmicas e isobáricas;
- vi. A difusão intra-partícula e a resistência externa durante o processo de transferência de massa são considerados desprezíveis.

Levando estas condições em conta, Thomas propôs o modelo de adsorção apresentado na equação 4.

$$\frac{C}{C_T} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{k_{Th} \cdot M \cdot m}{\phi} - k_{Th} \cdot C_T \cdot t\right)}} \quad (\text{equação 4})$$

Onde  $k_{Th}$  ( $\text{mL min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) é a constante de Thomas,  $M$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a carga máxima suportada pelo MIP,  $C/C_T$  é a concentração relativa,  $C_T$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) é a concentração da Ciprofloxacina na solução que está sendo utilizada para análise (influyente),  $C$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) é a concentração de Ciprofloxacina na solução (efluente) no tempo  $t$  (min),  $m$  (mg) é a massa de MIP utilizada e  $\phi$  ( $\text{mL min}^{-1}$ ) é o fluxo da solução pelo MIP. Para determinação das constantes pode-se linearizar a equação, como apresentado na equação 5.

$$\ln\left(\frac{C_T}{C} - 1\right) = \frac{k_{Th} \cdot M \cdot m}{\phi} - k_{Th} \cdot C_T \cdot t \quad (\text{equação 5})$$

### 3.5.2. Modelos matemáticos de ajustes dos dados

A adsorção é um fenômeno superficial. A força motriz para a adsorção é a redução na tensão superficial ( $\sigma$ ) entre o fluido e o sólido adsorvente, resultando na adsorção do adsorbato na superfície do sólido. A tensão superficial é o resultado da variação de energia livre,  $G$ , quando a área entre duas superfícies variam, conforme apresentado na equação 6. Tal variação pode ocorrer devido a variações na temperatura ( $T$ ), pressão ( $P$ ) ou pelo número de moléculas presente na superfície. No caso dos MIPs, como o experimento é realizado a temperatura e pressão constantes, a variação é devida ao aumento da concentração da molécula molde na superfície MIP / solução, devido à afinidade do MIP pela molécula.

$$\sigma = \left(\frac{\partial G}{\partial A}\right)_{T,P,\eta_j} \quad (\text{equação 6})$$

A adsorção pode ocorrer em todos os tipos de interface, seja ela uma monocamada, multicamada ou uma superfície mista entre as duas. Os experimentos de religação são utilizados para esta finalidade, entender como se comporta a adsorção da molécula molde no polímero, além de informar a capacidade máxima de adsorção e a constante de dissociação.

Existem vários modelos matemáticos para quantificar o adsorbato presente no processo a uma dada temperatura. Estas equações são denominadas isotermas de adsorção e são curvas obtidas a partir da quantidade de soluto adsorvido em função da concentração deste soluto. Nas isotermas de adsorção é importante que as

concentrações livres e adsorvidas devam estar em equilíbrio para se entender o comportamento do material, por isso o estudo da cinética da reação é importante. Neste ponto, pode-se afirmar que Q é função de C, conforme equação 7:

$$Q = f(C) \quad \text{(equação 7)}$$

Existem vários modelos de isotermas, sendo que cada uma delas se aplica a um determinado tipo de adsorção. A seguir são descritos resumidamente alguns modelos de ajuste dos dados experimentais de adsorção que serão utilizados no trabalho, sendo eles Langmuir, Freundlich, Langmuir–Freundlich, Redlich–Peterson, Toth (Klug *et al.*, 1998), Temkin e Dubinin–Radushkevich (Foo e Hameed, 2010).

#### **3.5.2.1. Langmuir**

A isoterma de Langmuir é a mais utilizada na literatura, seja pela simplicidade matemática ou pela interpretação física dos resultados. Esta isoterma leva em consideração que adsorção ocorre somente em uma camada, ou seja, monocamada (a camada adsorvida tem a mesma espessura do adsorbato), que o número de locais para adsorção é bem definido, que todos eles são idênticos e equivalentes e que não existe interação lateral e impedimento estérico entre as moléculas adsorvidas, mesmo em locais adjacentes (Foo e Hameed, 2010).

Nesta isoterma é levado em consideração que cada molécula possui entalpia e energia de ativação constante, o que significa que todos os locais de adsorção possuem a mesma afinidade para o adsorbato e, por fim, que não existe o deslocamento horizontal do adsorbato no plano da superfície do adsorvente.

Para entender o ajuste, a partir das condições de contorno acima definidas, considere um analito (L) que irá se ligar ao polímero (P) de acordo com a reação 1 que encontra-se em equilíbrio químico.



A concentração total de L ( $C_T$ ) é a soma da concentração de L que não foi ligada (C) com a concentração ligada ao polímero ( $C_L$ ), conforme equação 8:

$$C_T = C + C_L \quad (\text{equação 8})$$

Fazendo o mesmo procedimento para P, pode-se afirmar que a concentração total de P ( $C_P$ ) é a soma da concentração livre (C') com a ligada ( $C_L$ ), conforme equação 9:

$$C_P = C' + C_L \quad (\text{equação 9})$$

Conhecendo a concentração total de polímero  $C_P$ , consegue-se definir o número médio de moléculas L ligadas às moléculas do polímero P (Q), como apresentado na equação 10:

$$Q = \frac{C_L}{C_P} \quad (\text{equação 10})$$

Da reação 1 pode-se calcular a constante de associação ou constante de Langmuir (K), como na equação 11:

$$K = \frac{C_L}{C \cdot C'} \quad (\text{equação 11})$$

Substituindo  $C_L$  da equação 11 e  $C_P$  da equação 9 na equação 10 tem-se a expressão para a massa de analito L ligado para cada unidade de massa de polímero P, conforme definido pela equação 12:

$$Q = \frac{C_L}{C_P} = \frac{K \cdot C \cdot C'}{C' + C_L} = \frac{K \cdot C \cdot C'}{C' + K \cdot C \cdot C'} = \frac{K \cdot C}{1 + K \cdot C} \quad (\text{equação 12})$$

Onde:

$$\lim_{C \rightarrow 0} Q = 0 \text{ e } \lim_{C \rightarrow \infty} Q = 1$$

Esta análise pode ser feita para dois, três, quatro ou mais locais de ligação. Neste caso somente aparecerá um fator multiplicativo na equação 11. Desta maneira, para um experimento onde não se conhece a carga máxima do polímero ( $M$ ) a equação 12 pode ser facilmente reescrita como mostrada na equação 13 (ajuste de Langmuir):

$$Q = \frac{M \cdot K \cdot C}{1 + K \cdot C} \quad (\text{equação 13})$$

Onde  $K$  é definido com parâmetro de afinidade ( $L \text{ mg}^{-1}$ ).

#### **3.5.2.1.1. Ajuste de Scatchard**

Uma variação na forma de apresentar os dados da isoterma de Langmuir é o ajuste de Scatchard, que tem sido amplamente utilizado nos trabalhos, visto permitir análises mais simples através da linearização da isoterma de Langmuir pela redistribuição dos termos da equação 13, como mostrado na equação 14:

$$\frac{C}{Q} = M \cdot K - K \cdot Q \quad (\text{equação 14})$$

É fácil notar que a equação 14 é uma função de primeira ordem, ou seja, escrita na forma  $f(x) = ax + b$ , onde  $a = -K$  e  $b = K.M$ .

### 3.5.2.2. Freundlich

Isoterma de Freundlich é a primeira relação que descreve uma adsorção não ideal e reversível, não restrita à formação de uma monocamada. Este modelo empírico pode ser aplicado para a adsorção de multicamada, com uma distribuição não uniforme de calor de adsorção e afinidades sobre a superfície heterogênea (Adamson e Gast, 1997). Nesta isoterma, a quantidade adsorvida é a soma de adsorção em todos os locais, sendo os sítios de ligação mais fortes ocupados em primeiro lugar. Neste modelo, a energia de adsorção diminui exponencialmente até a conclusão do processo de adsorção, e é amplamente aplicado em sistemas heterogêneos, especialmente para compostos orgânicos ou espécies altamente interativas como carvão ativado e filtros moleculares. A expressão matemática que define esta isoterma é dada na equação 15:

$$Q = KC^\beta \quad (\text{equação 15})$$

Onde o parâmetro  $\beta$  (inclinação da função) é a medida da intensidade de adsorção ou heterogeneidade da superfície e pode variar entre 0 e 1. Quanto mais o seu valor se aproxima de zero pode-se concluir que mais heterogênea é a superfície. Os demais parâmetros continuam com os mesmos significados físicos. No entanto, a isoterma de Freundlich é limitada quando se pensa nos fundamentos termodinâmicos.

### 3.5.2.3. Langmuir-Freundlich

É uma forma combinada das expressões de Langmuir e Freundlich deduzida para prever os sistemas de adsorção heterogêneos e contornar a limitação da concentração de adsorbato crescente associada à expressão exponencial do modelo da isoterma de Freundlich. Na equação 16 é apresentada a expressão matemática deste modelo.

$$Q = \frac{KMC^\beta}{1 + KC^\beta} \quad (\text{equação 16})$$

Pode-se verificar que, em concentrações baixas de adsorção, esta isoterma se reduz a expressão da isoterma de Freundlich; enquanto em altas concentrações, que prevê uma capacidade característica de monocamada de adsorção, da isoterma de Langmuir. Este comportamento de isoterma é também previsto pelos modelos de Sips e Koble–Corrigan.

### 3.5.2.4. Redlich–Peterson

A isoterma de Redlich-Peterson também é um modelo matemático híbrido dos modelos de Langmuir e de Freundlich. Este modelo utiliza três parâmetros em uma equação empírica, conforme apresentado na equação 17.

$$Q = \frac{KMC}{1 + KC^\beta} \quad (\text{equação 17})$$

O modelo tem uma dependência linear da concentração no numerador e uma função exponencial do denominador para representar equilíbrio de adsorção sobre uma grande escala de concentrações, o que permite ser aplicada tanto em sistemas homogêneos como heterogêneos devido à sua versatilidade. Também esta

isoterma em altas concentrações (limite) se aproxima do modelo de isoterma de Freundlich (como o  $\beta$  tende a 0) e em baixas concentrações (limite) está de acordo com o modelo de Langmuir (como os valores de  $\beta$  tende a 1).

#### 3.5.2.5. *Toth*

Também é um modelo empírico, desenvolvido para melhorar os ajustes da isoterma de Langmuir. É estritamente experimental e aplicável para descrever sistemas de adsorção heterogêneos, que satisfazem os limites de concentrações baixas e altas. A expressão matemática para o modelo de Toth é apresentado na equação 18.

$$Q = \frac{KMC}{(1 + KC^\beta)^{\beta^{-1}}} \quad (\text{equação 18})$$

#### 3.5.2.1. *Dubinin-Radushkevich*

O modelo de Dubinin-Radushkevich permite estimar a porosidade característica do adsorvente, a energia livre de adsorção e a distinção entre a adsorção física e química. Esta isoterma é mais geral que a de Langmuir, uma vez que não assume uma superfície homogênea ou um potencial de adsorção constante. O modelo matemático da isoterma é apresentado na equação 19.

$$Q = M \cdot e^{-K\varepsilon^2} \quad (\text{equação 19})$$

Onde a variável nova  $\varepsilon$  representa o potencial de adsorção de Polanyi, mostrado na equação 20, resultante da diferença entre a energia livre na fase adsorvida e na fase líquida.

$$\varepsilon = R.T.\ln\left(1 + \frac{1}{C}\right) \quad (\text{equação 20})$$

Onde R é a constante dos gases (8,314 J K<sup>-1</sup>) e T a temperatura absoluta (em Kelvin). A ideia do modelo é a descrição do processo de adsorção como um efeito de preenchimento de poros ao invés de camadas e desta maneira o sistema se ajusta melhor quando se trabalha em concentrações mais baixas (Paganini, 2007).

### 3.5.2.2. Temkin

A isoterma de Temkin é o primeiro modelo a descrever a adsorção de hidrogênio sobre eletrodos de platina no interior das soluções ácidas. O modelo ignora concentrações extremamente baixas e altas e assume que o calor de adsorção (função da temperatura) de todas as moléculas na camada deve decrescer de forma linear ao invés de logarítmica com o recobrimento. O modelo de Temkin é excelente para prever o equilíbrio de fases gasosas (quando a organização em uma estrutura empacotada com orientação idêntica não é necessária). Os sistemas de adsorção em fase líquida geralmente não são apropriados para serem representados por este modelo. Na equação 21 é apresentado o ajuste desta isoterma.

$$Q = \frac{M}{\beta}\ln(KC) \quad (\text{equação 21})$$

### 3.5.3. Teste de seletividade

Os experimentos de seletividade foram realizados de maneira a verificar a seletividade de ligação da Ciprofloxacina para o MIP e o NIP em relação a uma série de seis interferentes: Norfloxacina (NOR), Ácido Nalidixico (NAL), Amoxicilina (AMX), Tetraciclina Hidroclorada (TCL), Cloranfenicol (CLR) e o Ácido Úrico (URC).

Estes doze experimentos foram realizados nas mesmas condições experimentais e otimizadas nos experimentos de religação, ou seja, utilizando-se 50 mg de polímero em contato com 5 mL de misturas binárias de Ciprofloxacina e um interferente, ambos na concentração de 150,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , em pH 3,5, dissolvidos em uma solução água:acetoneitrila (1:1, v/v) e agitadas por 120 min.

O teste de seletividade é crucial para avaliação da funcionalidade de um MIP. É este o teste que avalia indiretamente a criação dos sítios seletivos, pois, ao expor o MIP e o NIP em contato com um analito com estrutura similar, o MIP deve se ligar preferencialmente à Ciprofloxacina enquanto que o NIP deve se ligar igualmente aos dois, visto não possuir a nanocavidade seletiva. Os parâmetros que definem a comparação entre o MIP e o NIP são discutidos a seguir.

Já foi discutido que a adsorção de uma molécula por um substrato é função da tensão superficial ( $\sigma$ ), como mostrado na equação 6. Desta maneira, a seletividade de um MIP surge da variação entre a energia livre de adsorção de um substrato comparado com outro.

A variação na energia livre de ligação de uma molécula (molde ou interferente) pelo polímero é determinada pela equação de Gibbs, definida na equação 22:

$$\Delta G = -R T \ln K_p \quad (\text{equação 22})$$

Onde  $K_P$  é o coeficiente de partição da molécula no polímero (equação 23) definido como a razão entre número médio de moléculas ligadas às moléculas do polímero e a concentração da molécula na solução.

$$K_P = \frac{Q}{C} \quad (\text{equação 23})$$

O fator de separação ( $\alpha$ ) de uma molécula versus outra é definido pela razão entre os dois coeficientes de partição para a molécula 1 ( $K_{P1}$ ) e para a molécula 2 ( $K_{P2}$ ), conforme mostrado na equação 24.

$$\alpha = \frac{K_{P1}}{K_{P2}} \quad (\text{equação 24})$$

No entanto, a característica que permite a comparação entre o MIP e o NIP é o fator de impressão. Para comparar o efeito de impressão de substratos diferentes (MIP e NIP), os coeficientes de partição encontrados para cada composto devem ser normalizados. Isto é realizado por meio do fator de impressão  $I$ , conforme definido na equação 25. O valor de  $I$  é obtido pela razão entre coeficiente de partição de uma molécula em um polímero impresso,  $K_{P \text{ MIP}}$ , e o coeficiente de partição em um polímero não impresso,  $K_{P \text{ NIP}}$ , ambos definidos pela equação 23, utilizando-se para isso a mesma molécula e nas mesmas condições de religação. Neste caso, se quanto maior for  $K_{P \text{ MIP}}$  em relação à  $K_{P \text{ NIP}}$  maior o valor de  $I$  e melhor será o desempenho seletivo do MIP.

$$I = \left( \frac{K_{P \text{ MIP}}}{K_{P \text{ NIP}}} \right) \quad (\text{equação 25})$$

O fator de impressão obtido para o analito sempre deve ser superior a 1 e, obviamente, maior que aqueles obtidos para os interferentes. É esta relação do fator de impressão da molécula molde em relação ao interferente que determina a

seletividade de um polímero, ou seja, toma-se a razão do fator de impressão para as duas diferentes substâncias,  $I_1$  para a substância 1 (por exemplo a molécula molde) e  $I_2$  para a substância 2 (por exemplo o interferente), desta maneira obtém-se o fator de seletividade (S), conforme definido pela equação 26.

$$S = \left( \frac{I_1}{I_2} \right) \quad (\text{equação 26})$$

### 3.6. APLICAÇÃO EM AMOSTRA DE URINA HUMANA

De maneira a investigar a aplicabilidade do MIP sintetizado, amostras de urina humana foram coletadas, enriquecidas com Ciprofloxacina e utilizadas para análise de MISPE. Para isso, utilizou-se um sistema Manifold, conforme apresentado na Figura 13. O experimento teve como objetivo verificar a eficiência do MIP para limpeza e pré-concentração das amostras.

#### 3.6.1. Limpeza

Amostras de urina foram diluídas com acetonitrila e água (1:5:4, v/v/v). Porções desta solução foram enriquecidas com Ciprofloxacina com concentrações de 5 até 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O pH foi corrigido para 3,5 utilizando ácido clorídrico (0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e Hidróxido de Sódio (0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e então foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . As amostras foram passadas na MISPE e injetadas diretamente no HPLC, de maneira a construir a curva analítica e determinar a recuperação da técnica.

Em todos os experimentos de MISPE o fluxo foi mantido em 1  $\text{mL min}^{-1}$  controlado por uma bomba de vácuo. Os cartuchos da MISPE foram preparados

com 35 mg de MIP e então foram afixados no Manifold e condicionados com os seguintes procedimentos:

- i. 2 mL metanol;
- ii. 3 mL de água MilliQ®;

Em seguida as amostras de urina enriquecida foram percoladas pelo MIP seguindo o seguinte protocolo:

- i. 1 mL de urina (enriquecida com Ciprofloxacina);
- ii. 3 mL de água MilliQ®;

Os MIPs foram secos percolando-se N<sub>2</sub> pelo polímero;

- iii. 1 mL de Acetonitrila

Para extração da Ciprofloxacina foram percolados 1 mL de metanol : ácido acético (9:1, v/v). A amostra extraída foi evaporada utilizando fluxo de nitrogênio e então reconstituída em 1,0 mL de metanol para ser injetada no HPLC.

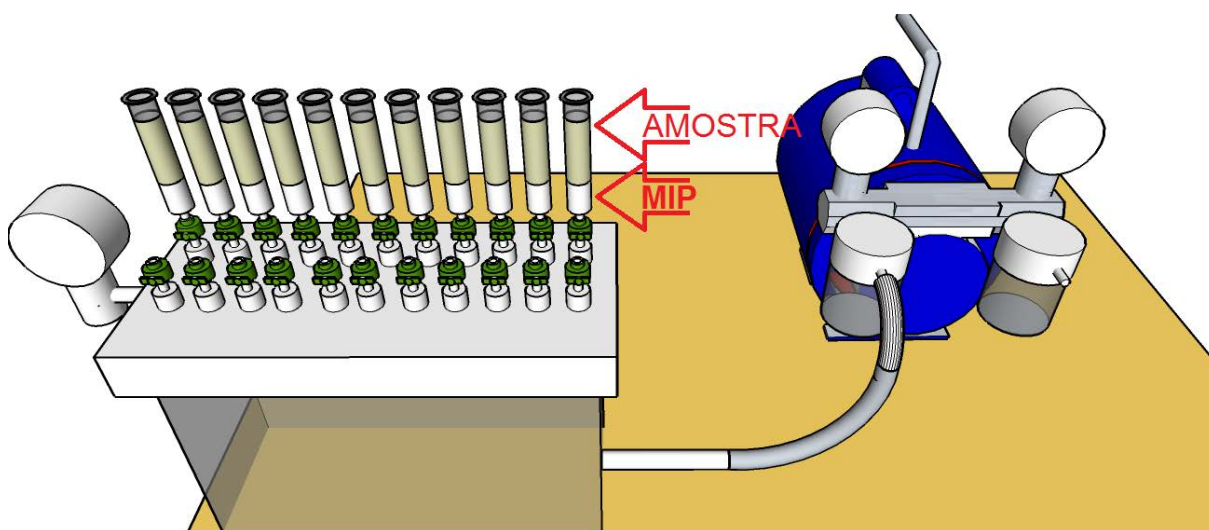


Figura 13. Esquema de empacotamento do MIP em um cartucho de SPE (MISPE) usando sistema Manifold.

### **3.6.2. Pré-concentração**

Para análise de pré-concentração, amostras de urina foram diluídas da mesma forma que na análise de limpeza. A pré-concentração foi realizada percolando-se os seguintes solventes:

- i. 2 mL de metanol
- ii. 3 mL de água MilliQ®

Em seguida as amostras de urina enriquecida foram percoladas pelo MIP seguindo o seguinte protocolo:

- iii. 10 mL da amostra de urina enriquecida
- iv. 3 mL de água MilliQ®

Os MIPs foram secos percolando-se N<sub>2</sub> pelo polímero;

- v. 1 mL de acetonitrila
- vi. 2 mL de metanol : ácido acético (9:1, v/v)

A amostra extraída foi evaporada utilizando fluxo de nitrogênio e então reconstituída em 2 mL de metanol para ser injetada no HPLC.

CAPÍTULO IV

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS**

Foram realizadas simulações para avaliar a interação da Ciprofloxacina e seis possíveis interferentes nas amostras reais de urina com os 20 monômeros propostos. As simulações foram realizadas em duplicata com a finalidade de obter resultados confiáveis e comparáveis. A energia livre de associação entre as moléculas e os monômeros foi calculada no vácuo.

Para cada monômero foram empregados três conformeros diferentes de maneira a avaliar de forma mais precisa as possibilidades de interação entre as diferentes conformações do monômero e o analito. Os resultados das médias das energias calculadas nas simulações são apresentados nas Figuras 14 a 20. Cada simulação durou em média 36 horas.

Os valores obtidos podem ser interpretados como a energia liberada na aproximação entre cada monômero e as moléculas, sendo que quanto maior a energia liberada (mais negativo o valor), maior a afinidade entre eles, ou seja, mais seletivo será o polímero resultante.

A partir dos resultados apresentados na Figura 14 pode-se verificar que o monômero M8 (Acrilonitrila) apresentou claramente a melhor energia de interação e, portanto deveria ser o escolhido para síntese.

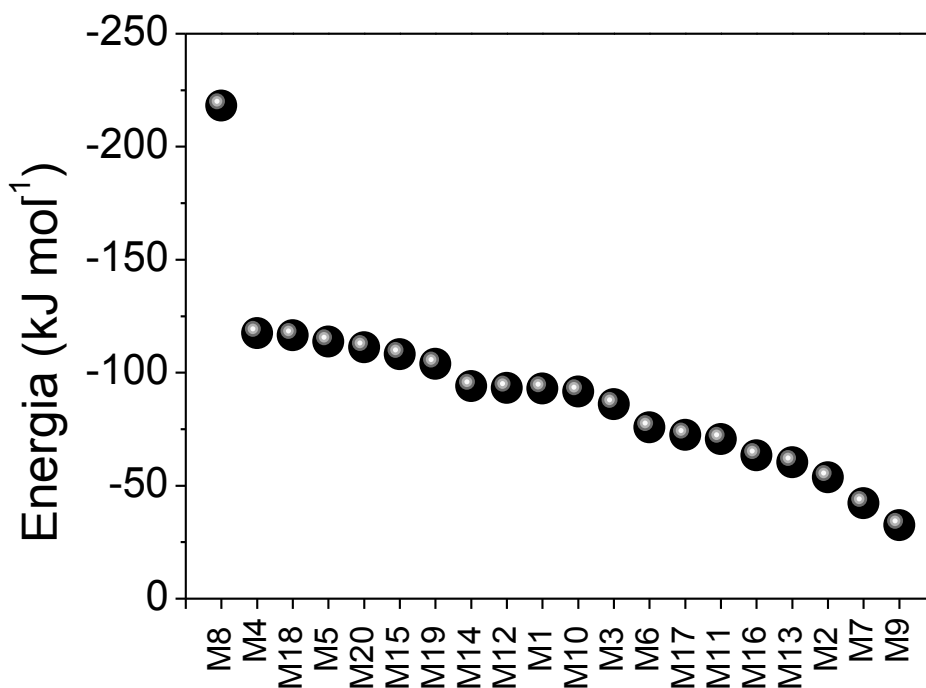


Figura 14. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Ciprofloxacina.

No entanto, de maneira a entender como os monômeros se comportariam com moléculas que poderiam estar interferindo (interferentes) durante os experimentos de aplicação em amostras reais, foram feitas as simulações de algumas das interações de outras moléculas com os monômeros, conforme apresentado nas Figuras 15 a 20. A escolha das moléculas foi feita levando-se em consideração que apresentavam princípios parecidos ou poderiam estar presentes na urina, como o caso do ácido úrico, apresentado na Figura 17.

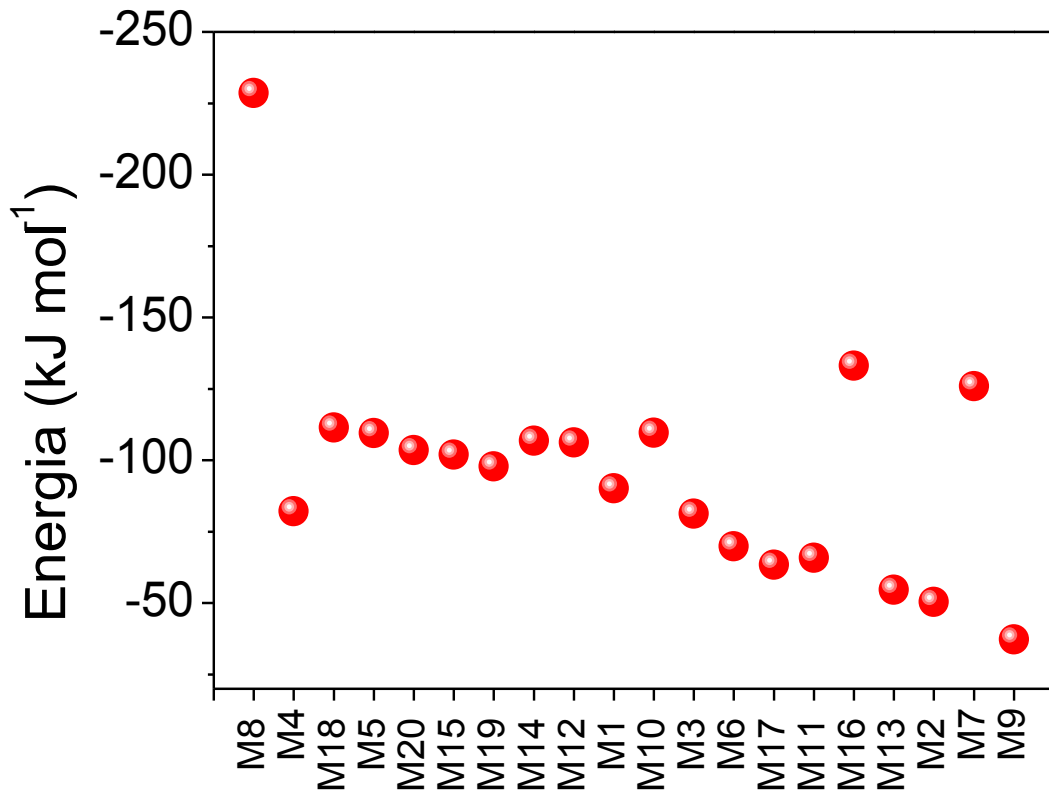


Figura 15. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com ácido nalidíxico.

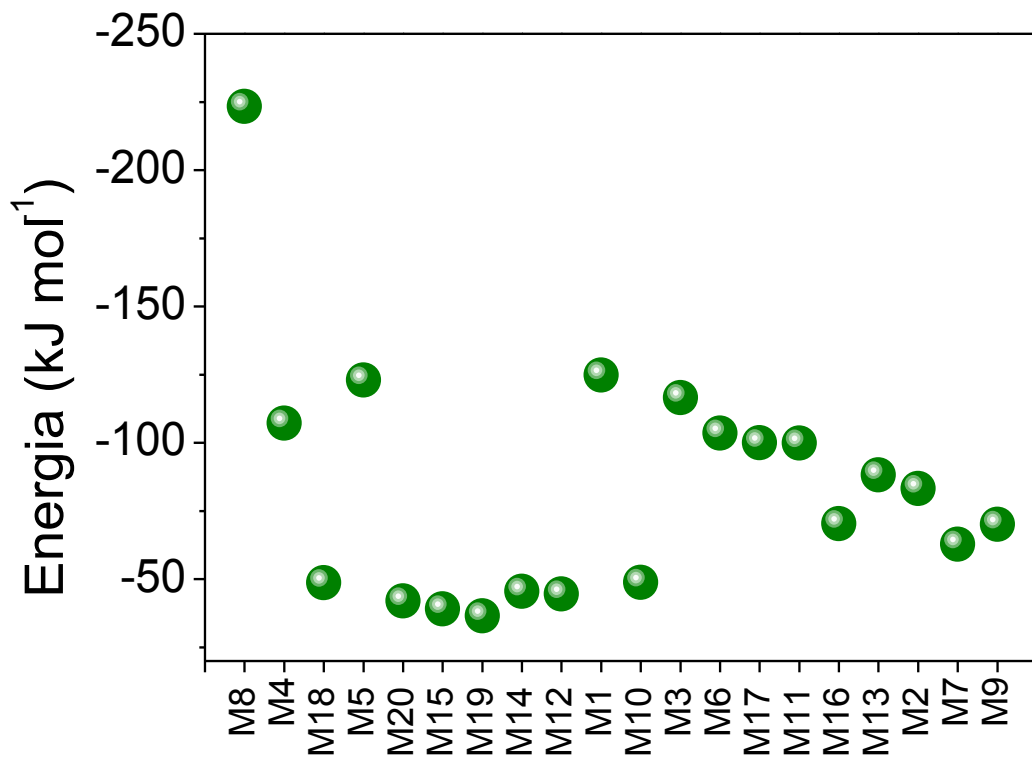


Figura 16. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Norfloxacin.

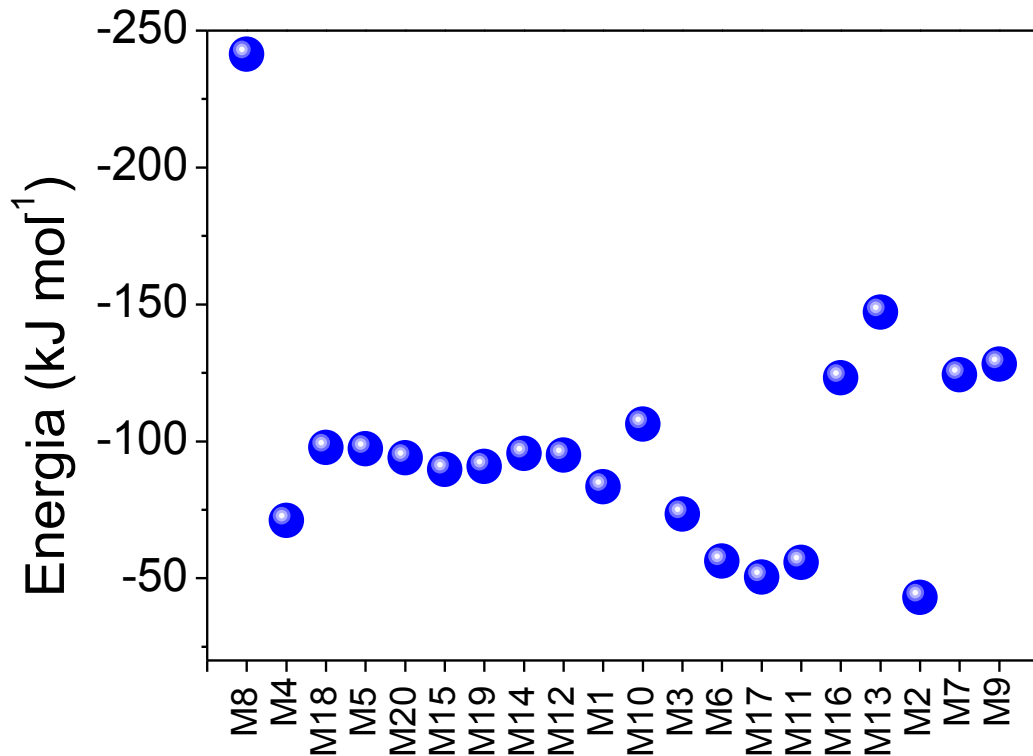


Figura 17. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com ácido úrico.

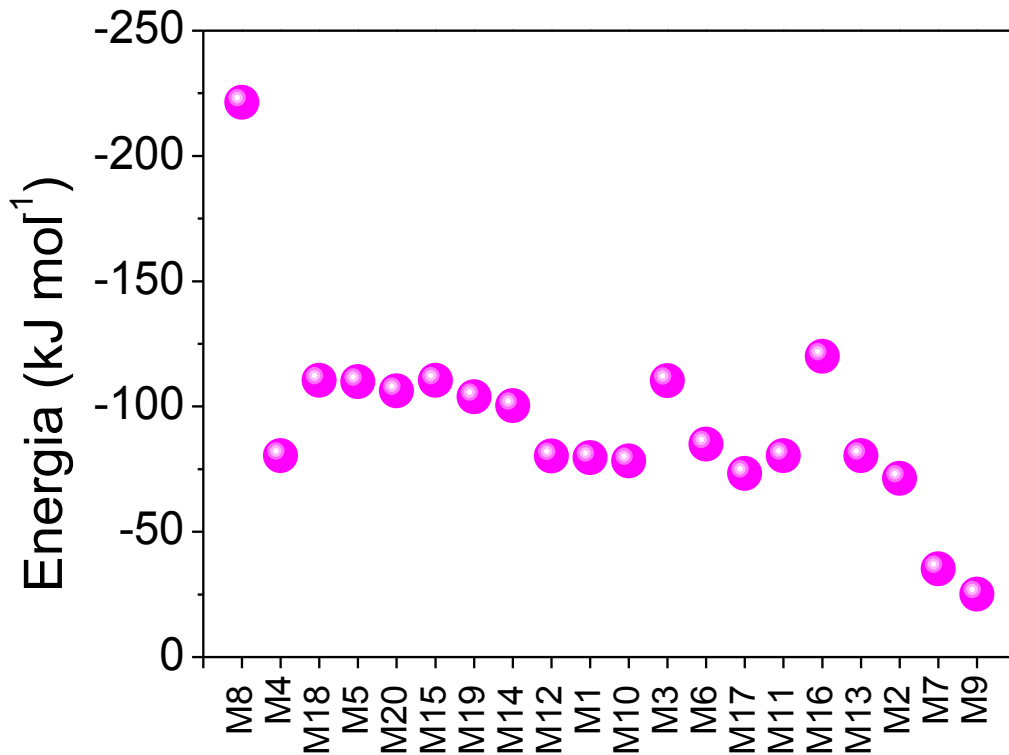


Figura 18. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Amoxicilina.

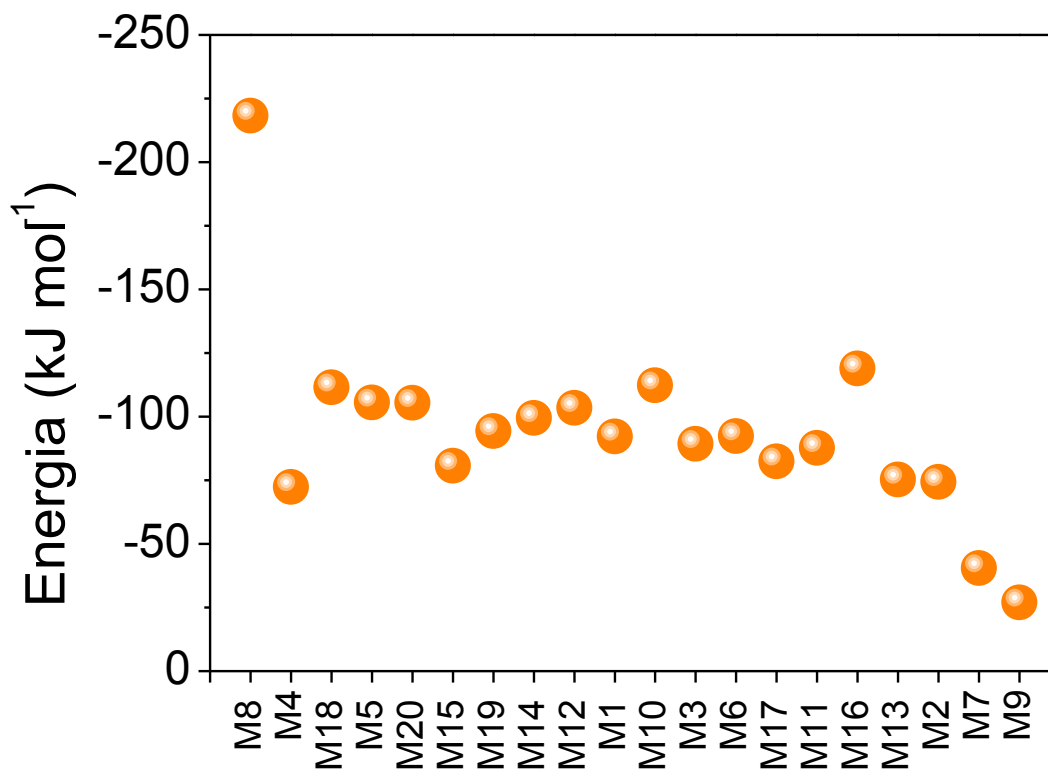


Figura 19. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Cloranfenicol.

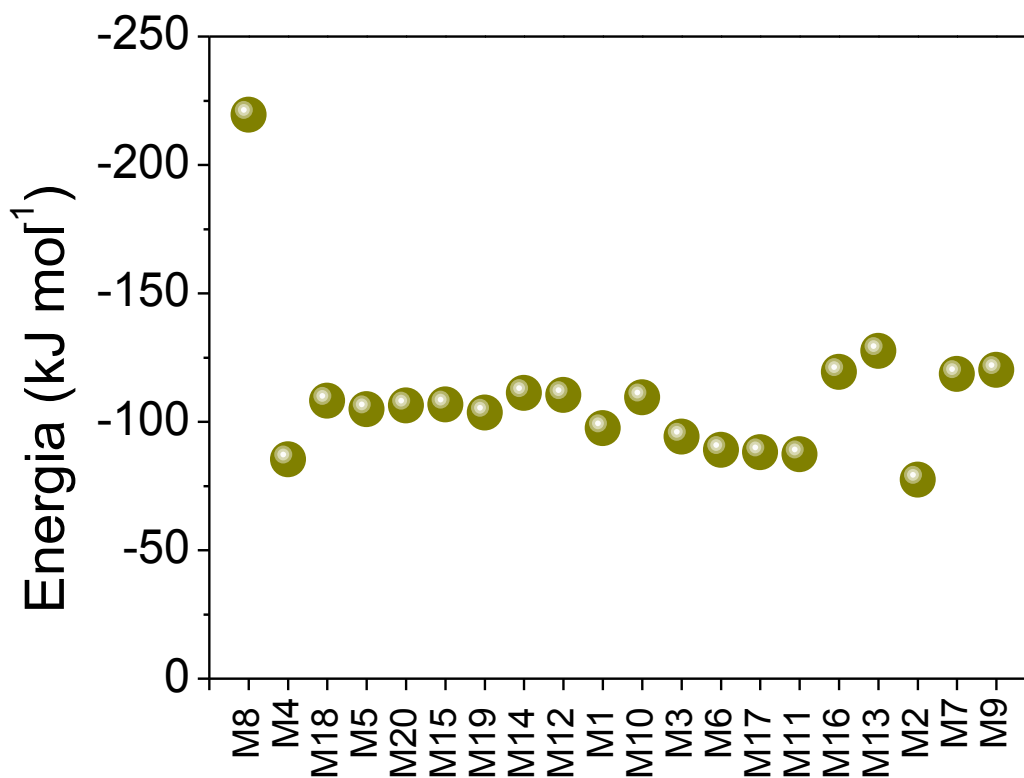


Figura 20. Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Tetraciclina Hidroclorada.

Observando os resultados destas simulações verifica-se que o monômero M8 (Acrilamida) apresentou as melhores energias de interação também para todos os interferentes, e excetuando-se o Cloranfenicol, melhores que para a Ciprofloxacina. Já o monômero AA (Ácido Acrílico), segundo melhor monômero, apresentou resultado inverso, ou seja, melhor para a Ciprofloxacina que para os interferentes. Desta maneira, o AA deve se apresentar mais seletivo que M8 e assim foi o escolhido para a síntese. Este comportamento do M8 pode ser observado no trabalho de Kamel e colaboradores (Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011), nele o MIP sintetizado com Acrilonitrila apresentou uma alta capacidade de ligação, mas uma seletividade não tão pronunciada.

De maneira a poder comprovar se o método utilizado na simulação é viável, outros dois monômeros foram escolhidos para realizar a síntese: um monômero que apresentasse pior energia de interação e um que apresentasse energia intermediária.

O monômero que apresentou a menor energia de interação foi o M9 (Etileno Glicol Dimetacrilato), contudo, pelas mesmas razões, ou seja, por não apresentar energia menor que a dos interferentes, este não foi o escolhido para a síntese. Fazendo esta análise o monômero que apresenta o menor resultado é o 1VN (1-Vinilimidazol), que foi o selecionado para a síntese. O monômero ACL (Acrilamida) também foi selecionado para síntese, visto apresentar uma energia de interação intermediária para a Ciprofloxacina e semelhante para as outras moléculas interferentes.

Tais resultados da simulação são, em sua maioria, explicáveis. Monômeros que contém átomos eletronegativos, tais como, N e O, apresentarão maiores afinidades, pois favorecem a formação do complexo de pré-polimerização monômero-molécula. Tal fato se deve provavelmente à estrutura química da Ciprofloxacina, apesar de complexa, contém regiões nitrogenadas e oxigenadas, explicando a clara afinidade por monômeros que se ligam através de ligações de hidrogênio.

#### **4.2. LIMPEZA DAS AMOSTRAS**

Para formação das nanocavidades seletivas, tão importante quanto as condições de síntese é a extração da molécula do interior do polímero sem a destruição da conformação química da nanocavidade, pois é exatamente isto que define um MIP.

Para isso, como já mencionado, os MIPs foram acondicionados em papel filtro e percolados com metanol:ácido acético (9:1, v/v) utilizando-se um extrator soxhlet. O solvente foi trocado diariamente e analisado com um espectrômetro UV-Vis, conforme apresentado na Figura 21.

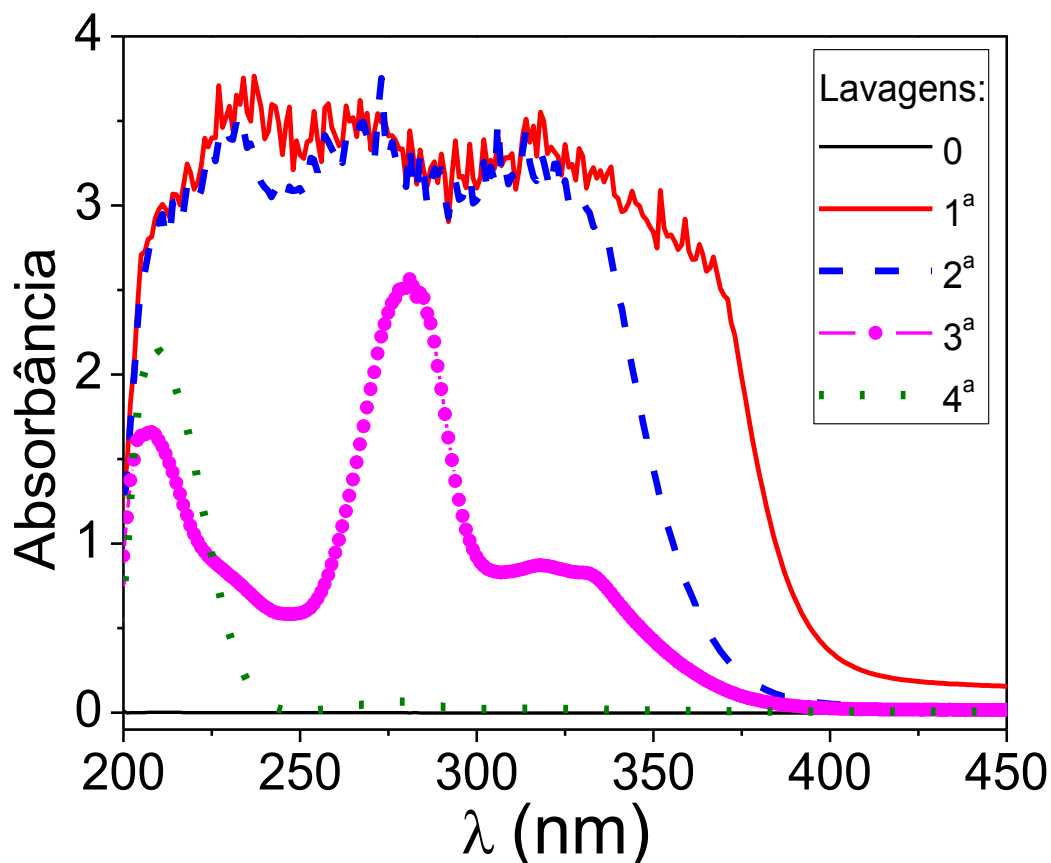


Figura 21. Lavagem do MIP para extração da Ciprofloxacina e criação da nanocavidade seletiva.

Pode-se concluir a partir da Figura 21 que durante os dois primeiros dias uma grande quantidade de Ciprofloxacina foi liberada na solução, visto que o espectro apresentou absorção maior que a máxima suportada pelo equipamento. No terceiro dia pode-se observar o pico de absorção da Ciprofloxacina ( $\lambda \approx 280$  nm), o que comprova que realmente ela estava sendo liberada na solução. O pico observado na região de 210 nm é devido ao ácido acético utilizado como solvente para extração da molécula molde. No quarto dia (4ª lavagem) percebe-se claramente que não estão mais sendo liberadas moléculas de Ciprofloxacina no solvente.

Como a Ciprofloxacina foi extraída juntamente com o solvente e não se percebe outros picos no espectro, pode-se concluir que: possivelmente as

nanocavidades seletivas foram criadas, visto que foi extraída somente a molécula molde; que as ligações foram predominantemente não covalentes visto que o ácido acético consegue retirar a molécula molde facilmente; e que este será um solvente adequado para eluição da Ciprofloxacina quando aplicarmos o polímero para MISPE.

### **4.3. OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ESTUDOS DE RELIGAÇÃO**

#### **4.3.1. Otimização do solvente de religação**

O solvente utilizado para extração da Ciprofloxacina da amostra e ligação com o MIP é de suma importância para a técnica de MISPE. Sabendo que a solução Metanol:Ácido Acético (9:1, v/v) é adequada para retirada da Ciprofloxacina do MIP, o próximo passo foi determinar o melhor solvente para religação. Nas Figuras 22 a 24 são apresentados os resultados para o melhor solvente de religação. As análises foram realizadas em triplicata para cada polímero.

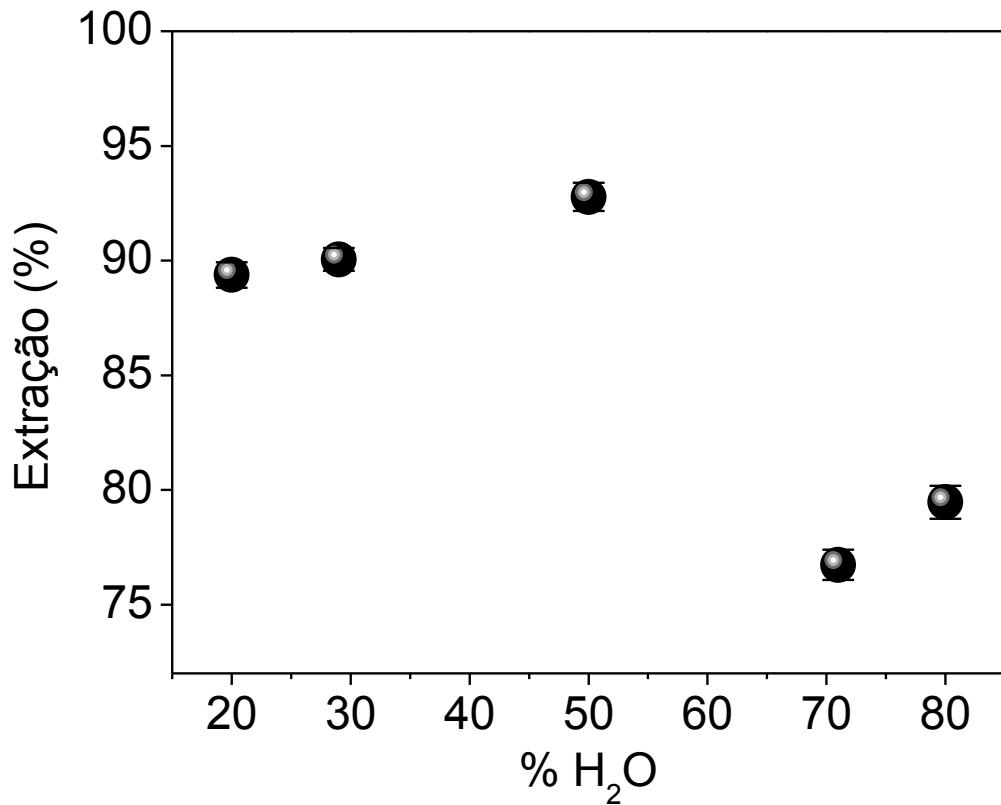


Figura 22. Percentual de água no solvente para religação de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero AA (o percentual restante corresponde a acetonitrila).

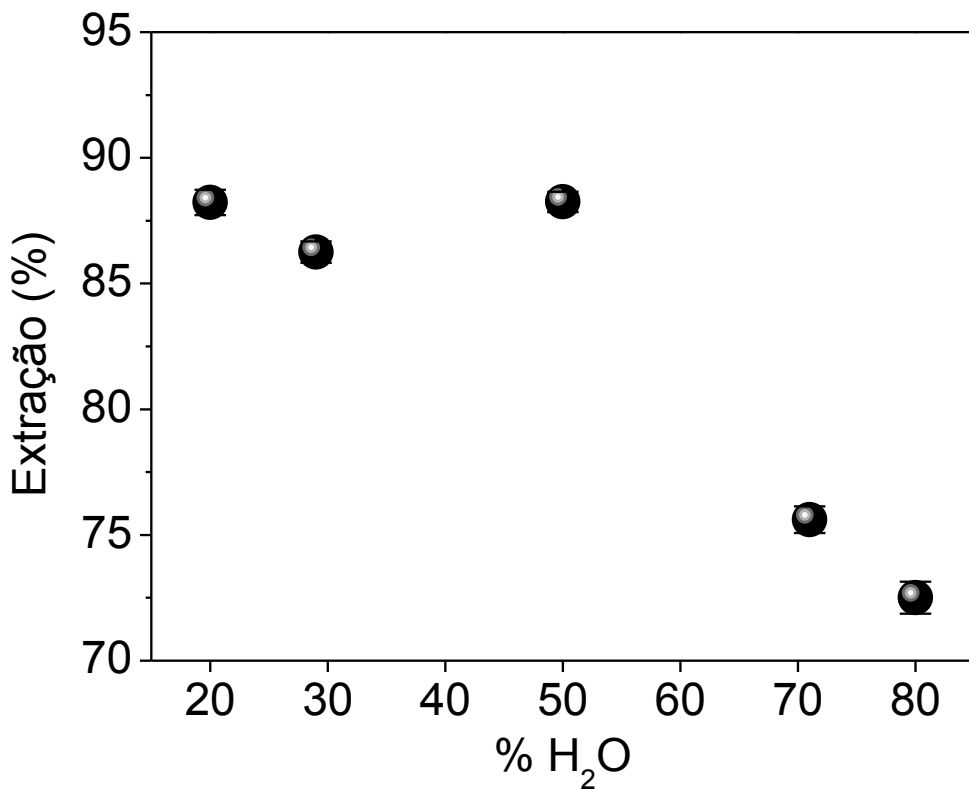


Figura 23. Percentual de água no solvente para religação de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero ACL (o percentual restante corresponde a acetonitrila).

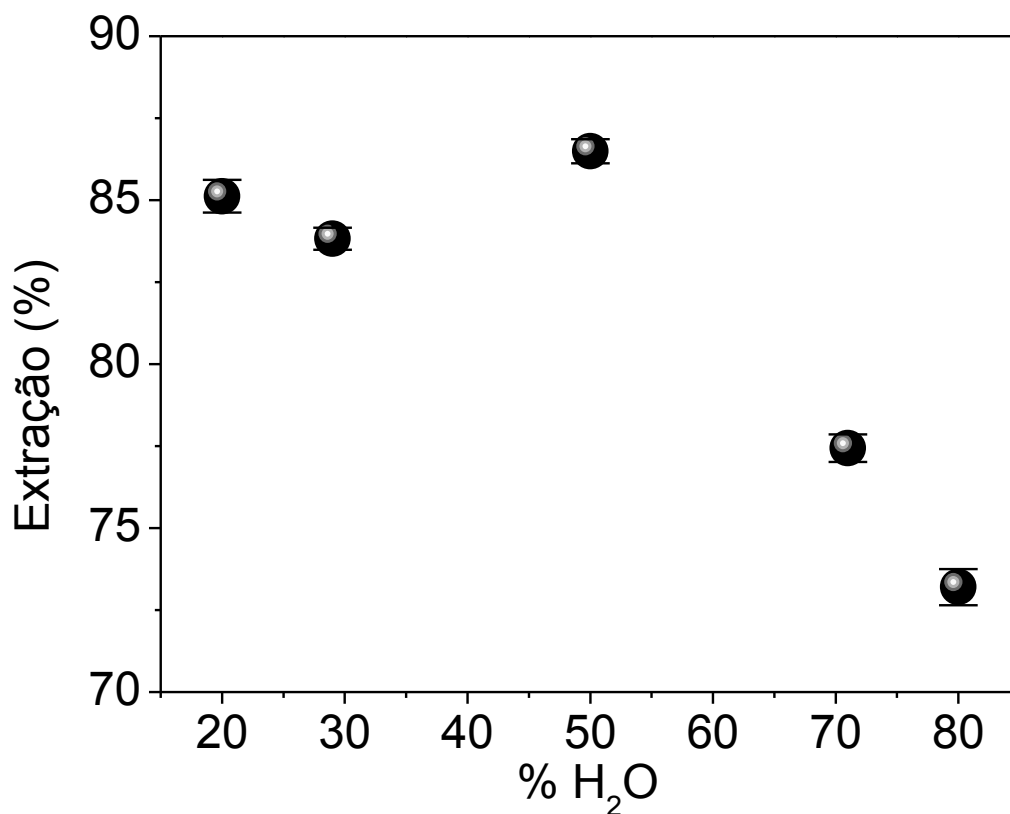


Figura 24. Percentual de água no solvente para religação de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero 1VN (o percentual restante corresponde a Acetonitrila).

O que se pode perceber para os três monômeros é que abaixo de 50% de água a extração foi praticamente a mesma. Assim, levando-se em consideração que a amostra real será de urina escolheu-se trabalhar com 50% de água a fim de facilitar o experimento e causar o menor impacto ambiental possível, minimizando o solvente orgânico.

Para comparar os resultados dos polímeros, além de todos terem sido sintetizados de maneira e condições similares, as condições de verificação de eficiência teriam que ser as mesmas, desta maneira, os experimentos de religação para obtenção das isotermas de adsorção foram realizados com soluções compostas por 50% de água e 50% de acetonitrila.

### 4.3.2. Otimização do pH na solução de religação

Como a solubilidade da Ciprofloxacina é fortemente dependente do pH, foi realizado um experimento para verificar sua variação no comportamento da religação, como apresentado nas Figuras 25 a 27. O solvente utilizado para o estudo foi o que apresentou o melhor resultado no item anterior, ou seja, 50% de água e 50% de acetonitrila.

A Ciprofloxacina é altamente solúvel em soluções ácidas, desta maneira, os testes foram realizados em  $\text{pH} < 7$ . Não foram possíveis análises com  $\text{pH} > 5$ , visto que nestas condições as amostras apresentaram-se pouco solúveis, devido a suas características ácido-base.

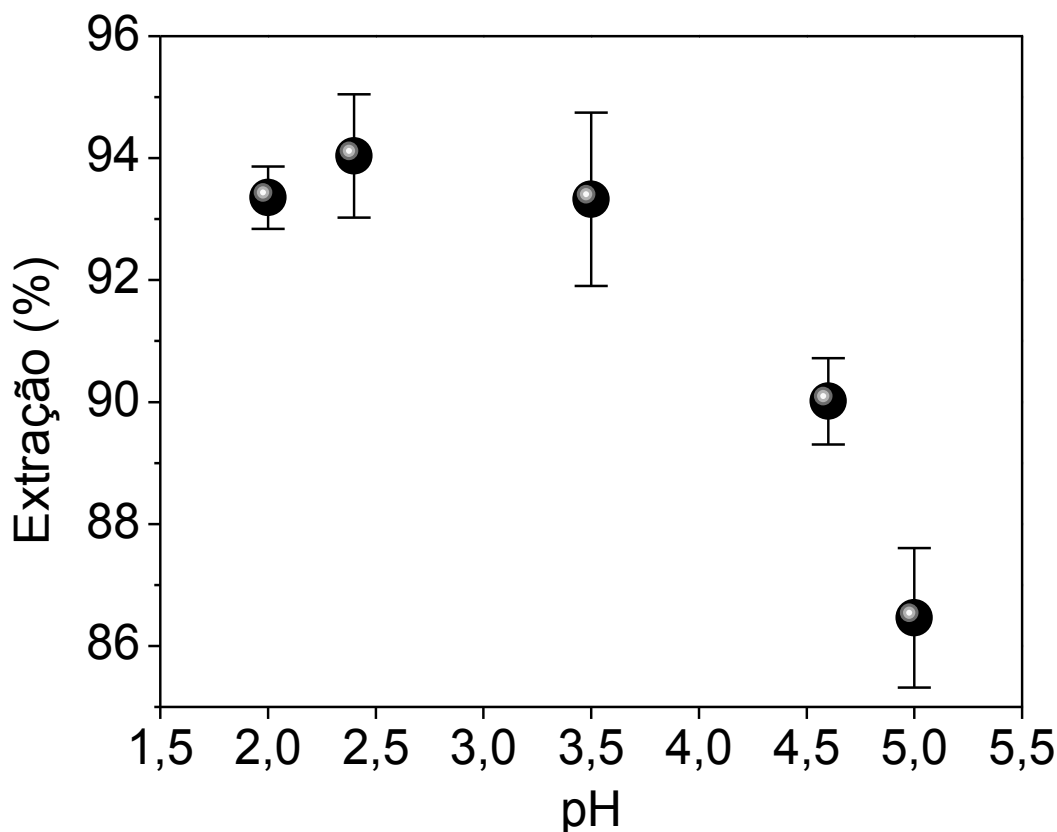


Figura 25. Influência do pH na extração de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero AA.

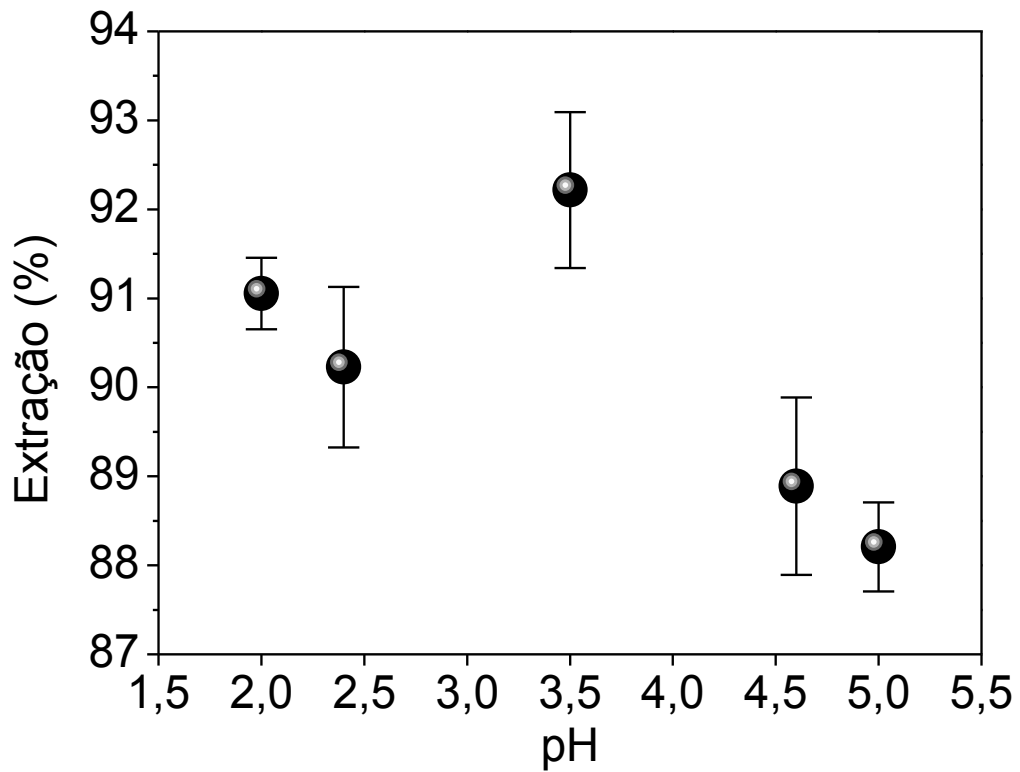


Figura 26. Influência do pH na extração de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero ACL.

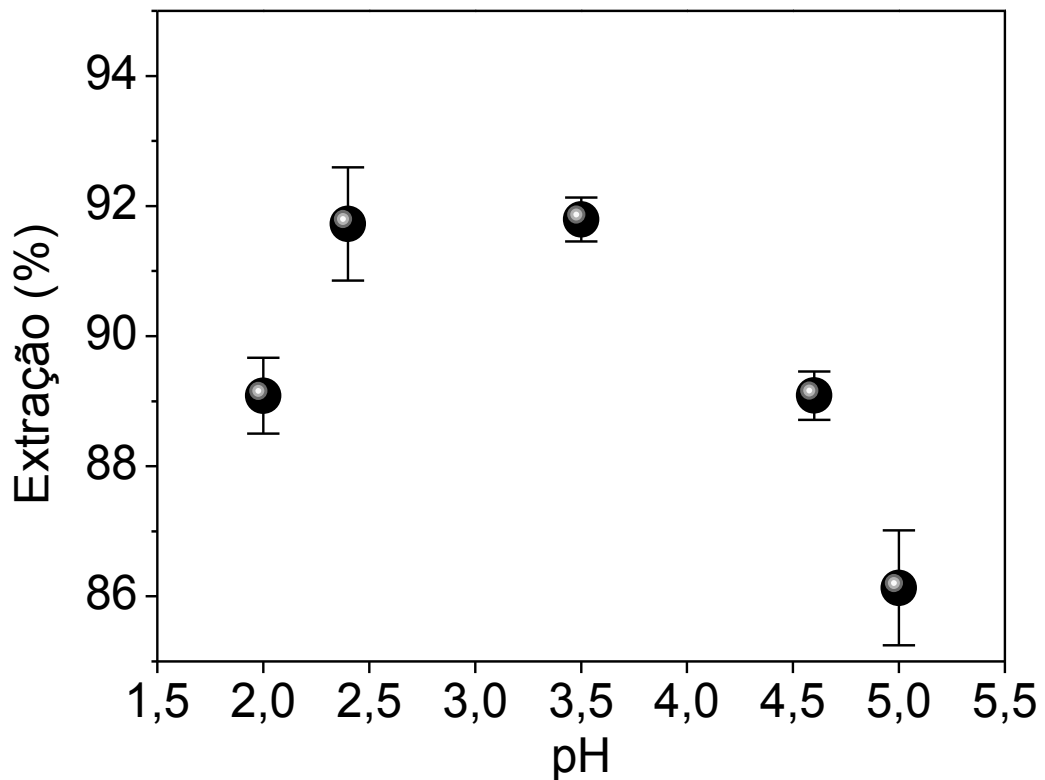


Figura 27. Influência do pH na extração de Ciprofloxacina pelo MIP sintetizado com o monômero 1VN.

Como pode ser observado, para os três MIPs, a máxima adsorção de Ciprofloxacina ocorre em torno do pH 3,5, abaixo deste valor a adsorção fica comprometida provavelmente devido a Ciprofloxacina estar fortemente solubilizada no meio, de maneira que se favorece o processo de dessorção.

Para pH > 3,5 a adsorção também é comprometida, nestas condições as moléculas de Ciprofloxacina não devem estar protonadas o suficiente para favorecer as ligações de hidrogênio.

### **4.3.3. Cinética da Adsorção**

De maneira a entender o comportamento da cinética da reação, as condições acima de solvente (H<sub>2</sub>O:ACN, 1:1, v/v) e pH (3,5) foram ajustadas e a exposição da Ciprofloxacina ocorreu na mesma temperatura (298K) e pressão (10<sup>5</sup> Pa) para todos os MIPs, porém variando-se os tempos. Na Figura 28 é apresentado o resultado do estudo para o monômero ACL.

Pode-se observar que a cinética de transferência de massa é relativamente boa e que, claramente após 120 min atinge-se o equilíbrio da reação, ou seja, a taxa de adsorção se iguala a taxa de dessorção.

Levando-se em consideração que o tempo de equilíbrio não foi muito baixo e que no momento das isotermas de adsorção as condições de religação da Ciprofloxacina devem ser iguais para todos os MIPs, julgou-se necessário o entendimento da cinética de somente um polímero e posteriormente estender as condições aos demais. Para isso, o polímero sintetizado com o monômero ACL foi selecionado, pois apresentava afinidade intermediária na simulação.

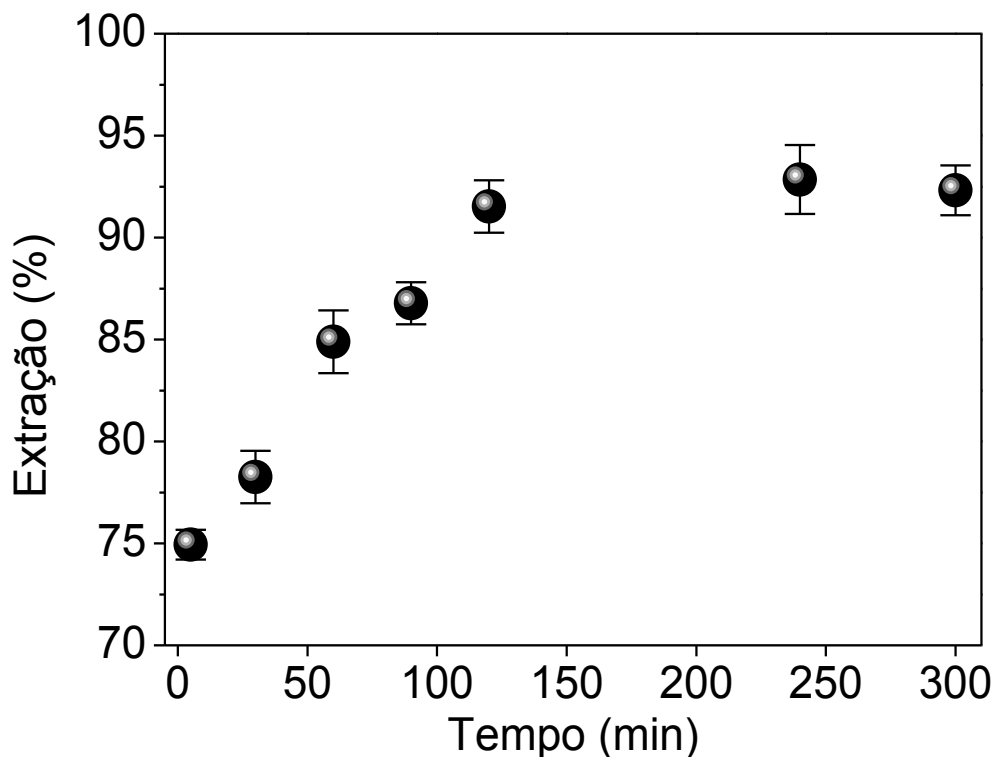


Figura 28. Cinética de adsorção da Ciprofloxacina pelo monômero ACL.

#### 4.3.4. Curva de ruptura

Pode-se observar na curva de ruptura, apresentada na Figura 29, que quanto menor o fluxo menor o efeito de dispersão, desta maneira a escolha do menor fluxo representaria a melhor escolha, no entanto, quanto menor o fluxo mais tempo as análises demoram, como apresentado na Figura 30. Desta maneira, as análises foram no sentido de aperfeiçoar o maior fluxo possível que não interferisse na qualidade dos resultados, ou seja, que mantivesse a capacidade de retenção do MIP.

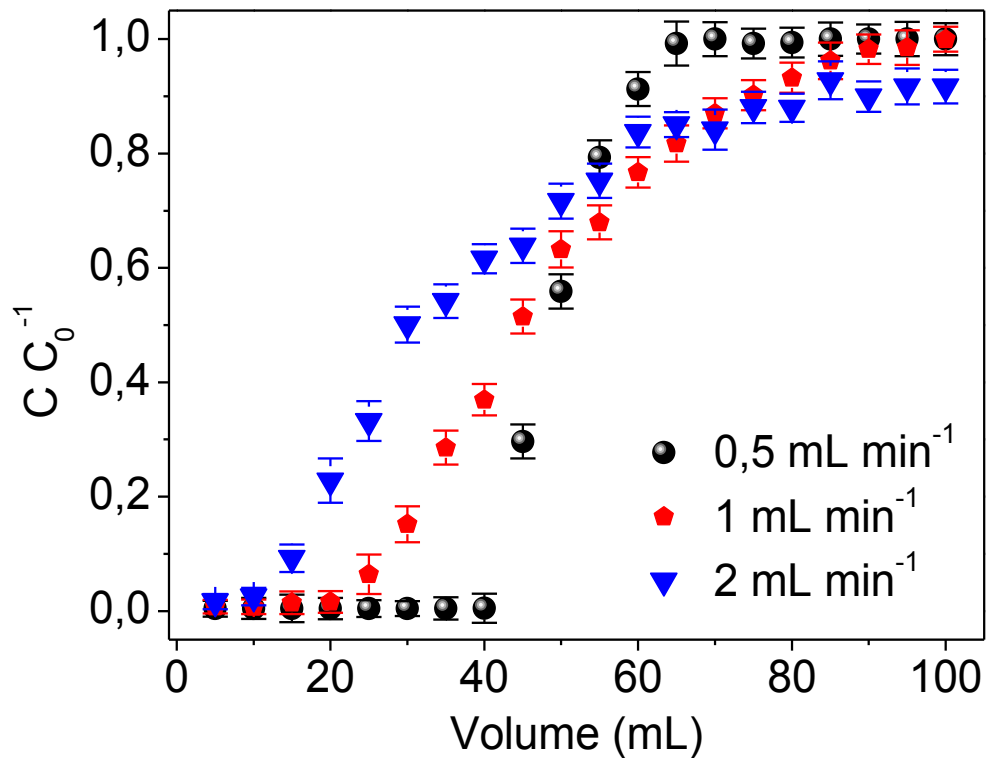


Figura 29. Curva de ruptura em relação ao volume da solução de Ciprofloxacina na coluna de MIP sintetizado com o monômero ACL variando o fluxo de 0,5 a 2 mL min<sup>-1</sup>.

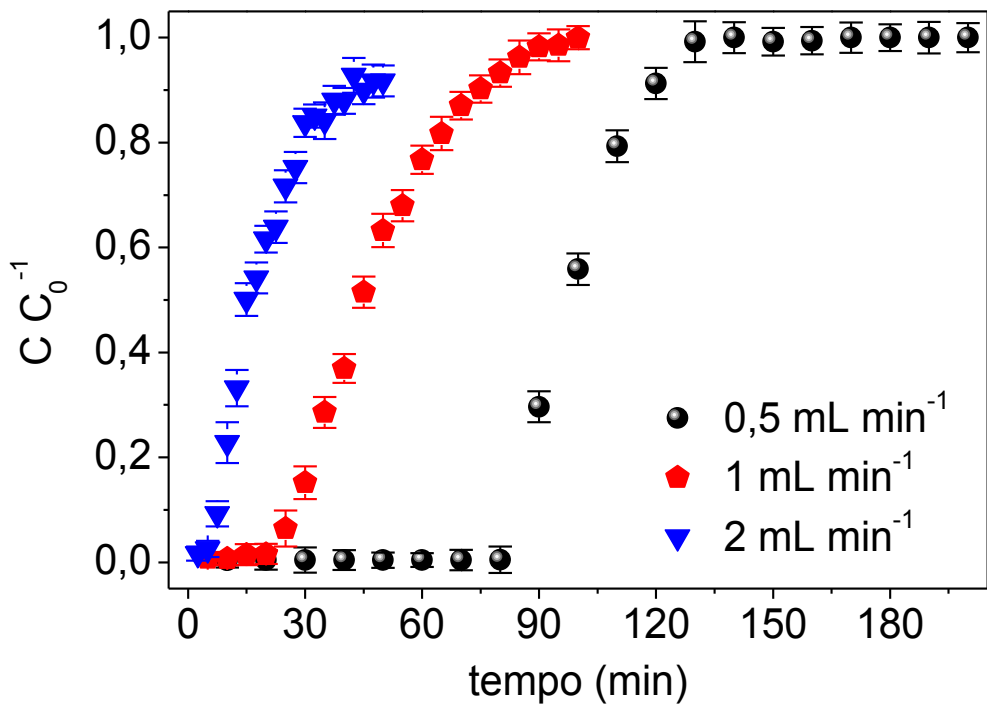


Figura 30. Curva de ruptura em relação ao tempo de análise para a coluna de MIP sintetizado com o monômero ACL variando o fluxo de 0,5 a 2 mL min<sup>-1</sup>.

A análise do desempenho da adsorção da Ciprofloxacina através do MIP foi realizada utilizando a linearização do modelo de Thomas, conforme apresentado na Figura 31. Para isso o ajuste dos dados foi realizado no intervalo de concentração relativa:  $0,1 < C/C_0 < 0,9$  (Chowdhury *et al.*, 2013).

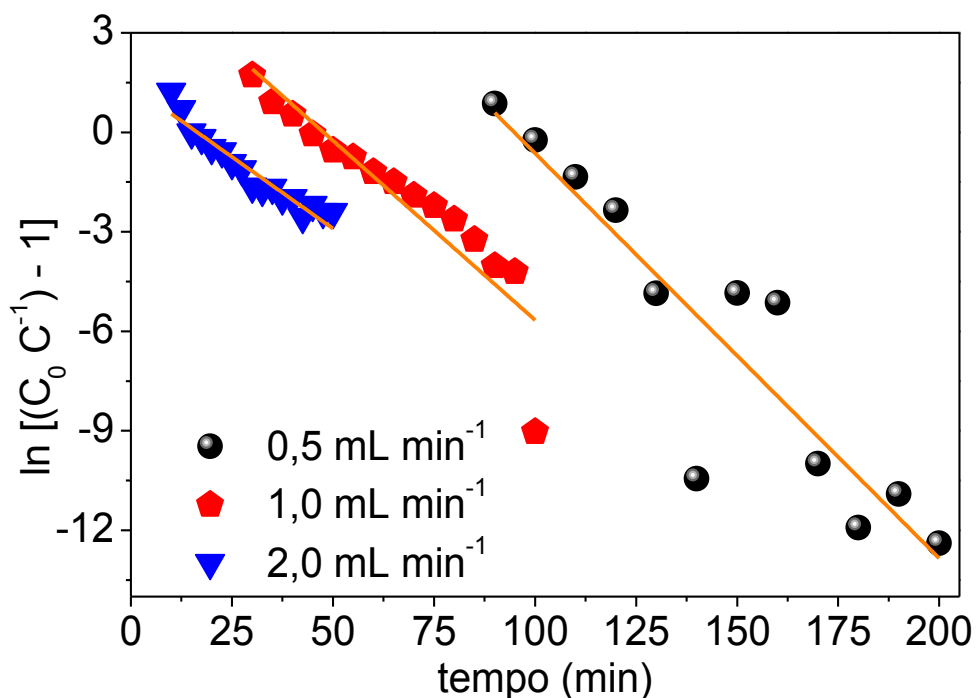


Figura 31. Linearização da curva de ruptura da Figura 30 para obtenção dos parâmetros de adsorção.

Na Tabela 4 são apresentados os parâmetros de ajuste da equação linearizada de Thomas, apresentada na equação 5.

Tabela 4. Parâmetros do modelo de Thomas para Ciprofloxacina em diferentes fluxos usando análise de regressão linear (massa de MIP de 35 mg e concentração da solução de 100 mg L<sup>-1</sup>).

$\phi$ (mL min <sup>-1</sup> )	Ajuste	$k_{Th} \cdot 10^{-4}$ (mL min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	$M$ ( $\mu$ mol g <sup>-1</sup> )	R
0,5	$\ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right) = 11,6(2,5) - 0,122(0,017) \cdot t$	12,2	397,5	0,90
1,0	$\ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right) = 5,15(0,89) - 0,108(0,013) \cdot t$	10,8	399,0	0,91
2,0	$\ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right) = 1,42(0,21) - 0,0865(0,0064) \cdot t$	8,6	274,8	0,96

Pode-se observar na Tabela 4 que o ajuste dos dados foi relativamente bom e que, como esperado, quando o fluxo é aumentado para 2,0 mL min<sup>-1</sup> a capacidade máxima de adsorção é reduzida em aproximadamente 30% em relação ao fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, isto devido aos efeitos de dispersão e menor tempo de interação da Ciprofloxacina com o polímero. No entanto, observa-se que praticamente não há mudança significativa entre os valores de  $M$  para os fluxos de 0,5 e 1,0 mL min<sup>-1</sup> (aproximadamente 0,3%), desta maneira qualquer fluxo abaixo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> poderá ser utilizado sem perda na capacidade de retenção do polímero.

Pelos mesmos motivos apresentados para a análise da cinética da adsorção, os experimentos foram realizados somente com o polímero sintetizado com o monômero ACL.

#### 4.4. ESTUDOS DE RELIGAÇÃO ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

No processo de adsorção normalmente são empregados os modelos de isoterma de Langmuir e Freundlich para interpretar os dados experimentais de

adsorção, devido à facilidade de linearização destas equações, onde os parâmetros podem ser estimados mais facilmente. Entretanto, esta forma simplificada não considera que na análise dos dados muitas vezes se revelam desvios sistemáticos da isoterma ajustada (Klug *et al.*, 1998).

Neste sentido, os múltiplos parâmetros de uma isoterma são melhor ajustáveis através de um método de regressão não linear. O ajuste dos dados experimentais das isotermas de adsorção para os três monômeros foram realizados com os modelos de isoterma de Langmuir (L), Freundlich (F), Langmuir-Freundlich (LF), Redlich-Peterson (RP), Tóth (T), Dubinin-Radushkevich (DR) e Temkim (TK). Nas Figuras 32 a 34 são apresentados os ajustes das funções para os três monômeros.

Esta análise é fundamental para a comprovação da aplicabilidade da melhoria dos MIPs utilizando simulação computacional semi-empírica do complexo de pré-polimerização, visto que todos os polímeros foram sintetizados de maneiras idênticas, variando somente o monômero entre si, as diferenças entre eles devem ser apresentadas com as isotermas de adsorção.

Desta maneira, o estudo cuidadoso dos melhores modelos se torna essencial para o trabalho.

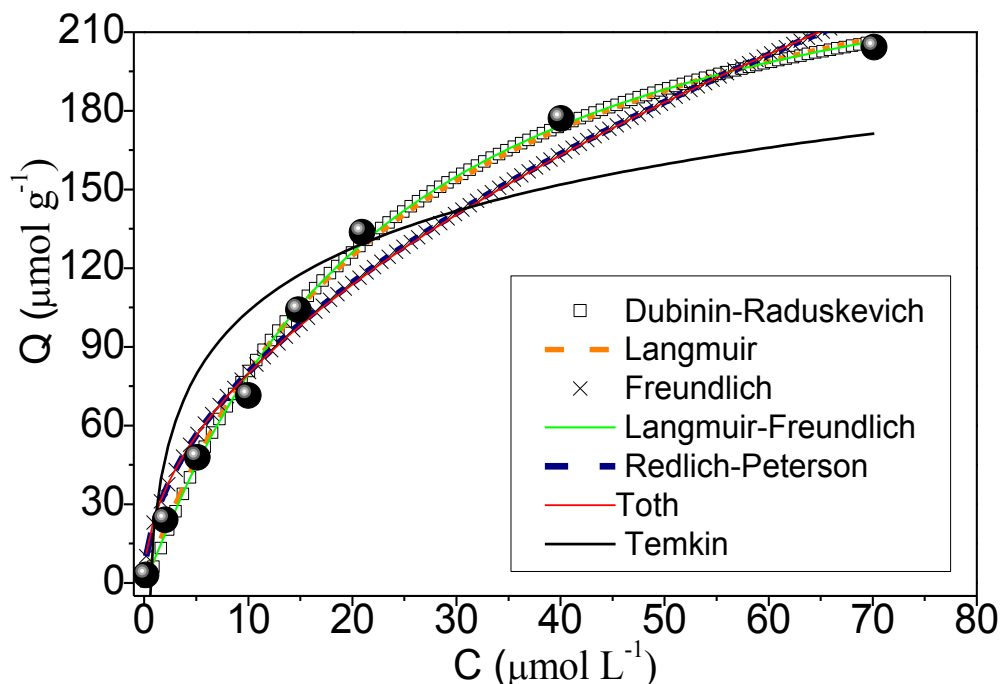


Figura 32. Ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIP utilizando o monômero AA empregando sete modelos de isoterma.

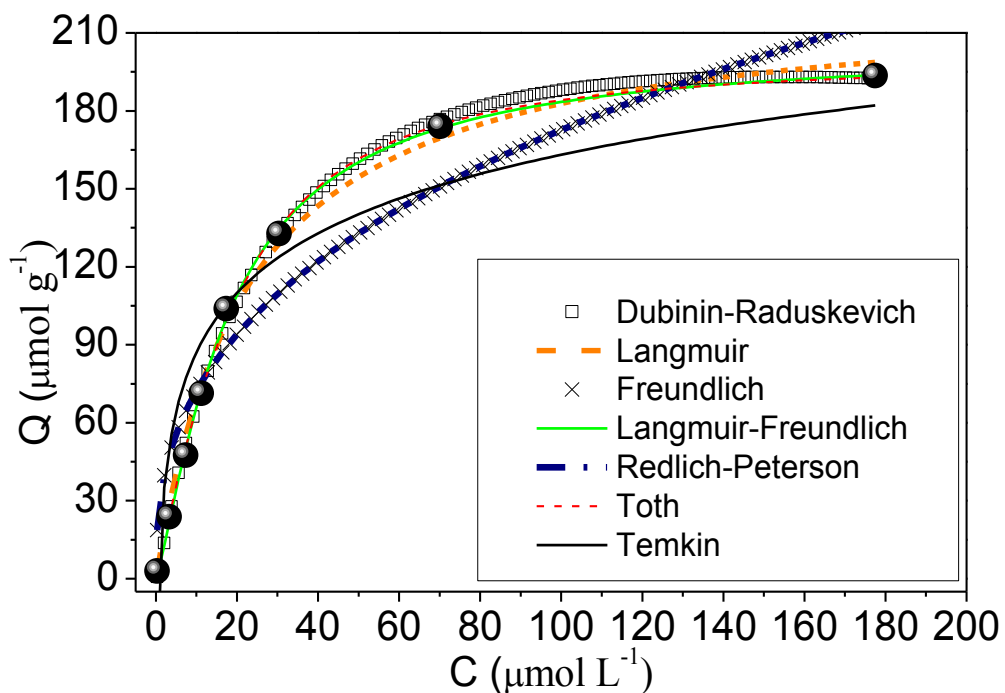


Figura 33. Ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIP utilizando o monômero ACL empregando sete modelos de isoterma.

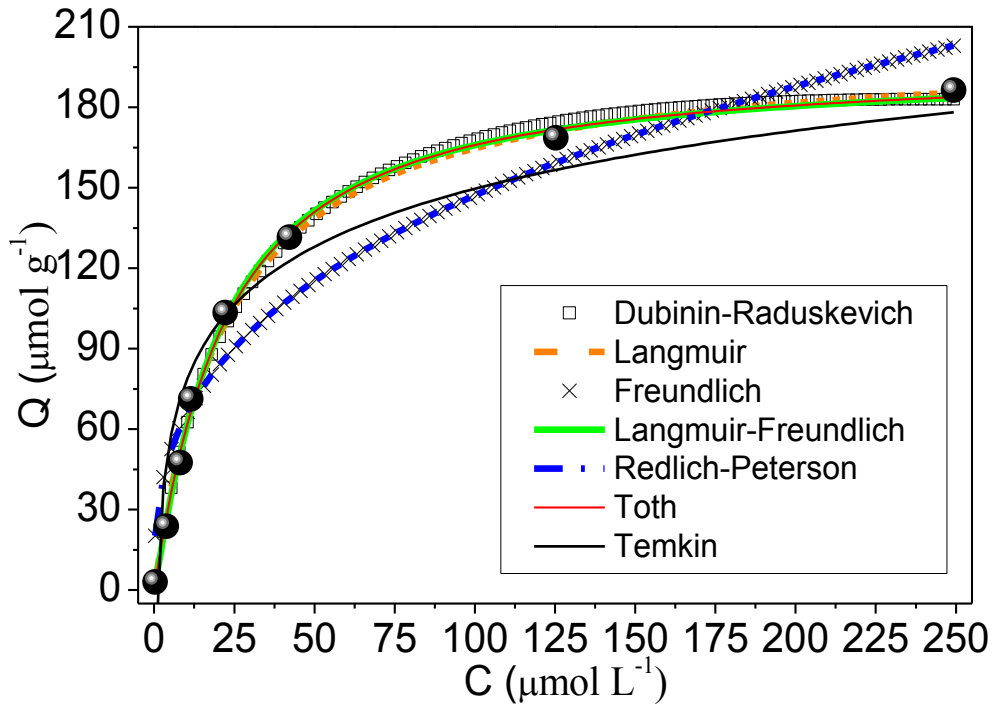


Figura 34. Ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIP utilizando o monômero 1VN empregando sete modelos de isoterma

Os parâmetros de ajustes das isoterma, tais como os  $R^2$  e a media dos desvios quadráticos dos resíduos são apresentados na Tabela 5.

A escolha do melhor modelo de isoterma, portanto o melhor ajuste dos dados, para estimar o comportamento de adsorção dos MIPs foi realizada levando em consideração o maior coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e o menor desvio médio dos dados ( $\delta$ ). Pode ser observado na Tabela 5 que dos modelos apresentados os que melhor ajustam os dados são os modelos das isoterma de Langmuir e Langmuir-Freundlich.

A similaridade entre os resultados é esperada visto que as concentrações são elevadas e neste caso os ajustes dos modelos tendem à mesma condição. Isto pode ser observado com o parâmetro  $\beta$ , que tem valor aproximadamente 1 para o modelo Langmuir-Freundlich.

Tabela 5. Resultados dos parâmetros dos ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com MIPs empregando as isotermas de Langmuir (L), Freundlich (FR), Langmuir-Freundlich (LF), Redlich-Peterson (RP), Toth (TO), Dubinin-Radushkevich(DR) e Temkim (TK).

Modelo	MN	K (L $\mu\text{mol}^{-1}$ )	M ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	$\beta$	R <sup>2</sup>	$\delta$
LA	AA	0,0396±0,0036	<b>282 ± 11</b>	---	<b>0,995</b>	<b>24,4</b>
	ACL	0,0446±0,0039	<b>223,8 ± 7,1</b>	---	<b>0,993</b>	<b>32,3</b>
	1VN	0,0434±0,0028	<b>202,5 ± 4,1</b>	---	<b>0,996</b>	<b>15,9</b>
FR	AA	24,5±4,5	---	0,514±0,049	0,967	170,5
	ACL	30,3±7,7	---	0,378±0,058	0,903	468,7
	1VN	29,1±6,9	---	0,352±0,050	0,919	363,4
LF	AA	0,0357±0,0066	265±23	1,08±0,11	<b>0,995</b>	<b>26,8</b>
	ACL	0,0263±0,0035	204,7±3,9	1,258±0,058	<b>0,998</b>	<b>7,1</b>
	1VN	0,0352±0,0063	195,4±5,7	1,102±0,077	<b>0,997</b>	<b>14,2</b>
RP	AA	(3,1±2,4)×10 <sup>45</sup>	24,5±6,7	0,486±0,090	0,961	204,6
	ACL	(5,8±3,8)×10 <sup>45</sup>	30,3±9,4	0,622±0,086	0,884	562,4
	1VN	(4,6±3,1)×10 <sup>46</sup>	29,1±7,6	0,647±0,056	0,903	436,1
TO	AA	1,04±0,99	(1,37±0,26)×10 <sup>-6</sup>	-0,03±0,30	0,958	219,6
	ACL	0,0066±0,0036	1132±570	1,52±0,15	0,998	8,0
	1VN	0,026±0,016	303±150	1,13±0,16	0,996	16,3
DR	AA	0,0061±0,0025	10,56±0,42	0,057±0,013	0,994	33,0
	ACL	0,0065±0,0006	9,831±0,067	0,062±0,005	0,997	13,2
	1VN	0,0041±0,0008	9,61±0,11	0,047±0,007	0,994	28,1
TK	AA	2,0±1,3	3,8±1,8	0,11±0,36	0,766	1219,4
	ACL	1,4±0,9	3,4±2,0	0,099±0,047	0,840	772,2
	1VN	1,2±0,9	3,5±1,6	0,113±0,059	0,893	477,6

Assim, devido a simplicidade da análise e similaridade nos resultados, pode ser concluído que o MIP se comporta de acordo com o modelo da isoterma de Langmuir, o que está de acordo com uma série de trabalhos da literatura (Liu *et al.*, 2007; Yan e Row, 2008b; Yan, Row e Yang, 2008; Yan, Tian e Row, 2008; Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011; Oliveira, Moreira e Sales, 2011).

Este resultado corrobora o ajuste bom dos dados nas curvas de retenção pelo modelo de Thomas, visto que este modelo leva em consideração as condições de Langmuir.

Desta maneira conclui-se que as cargas máximas suportadas pelos MIPs foram de  $282 \pm 11$ ,  $223,8 \pm 7,1$  e  $202,5 \pm 4,1$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  para os monômeros AA, ACL e 1VN.

Conforme os resultados da simulação computacional, estes resultados eram previstos, o que comprova a eficácia da técnica para previsão dos resultados da capacidade de retenção dos polímeros. Desta maneira, o objetivo principal do trabalho foi alcançado com sucesso, ou seja, a comprovação que a simulação do complexo de polimerização é um dos fatores primordiais e de início de estudos para formação de MIPs.

Analisando outros resultados publicados na literatura podemos observar que, na maioria dos casos, a simulação computacional do complexo de pré-polimerização realizada no trabalho foi útil para prever estes resultados, conforme apresentado na Tabela 6. Pode-se observar também que o monômero M8 seria o mais indicado para a síntese do MIP, conforme proposto por (Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011), o que, no entanto, não refletiu na seletividade do polímero.

Desta maneira, pode-se provar que a simulação semi-empírica da interação do monômero com o analito de interesse representa um estudo importante para entendimento da eficiência e capacidade de retenção de polímeros impressos.

Tabela 6. Resultados computacionais e experimentais do presente trabalho e alguns publicados na literatura. Os monômeros (M) que não estão apresentados não foram relatados para síntese de polímeros para Ciprofloxacina na literatura.

E (kJ mol <sup>-1</sup> ) (simulação)	MN	M (μmol g <sup>-1</sup> )	Referência
-218.214	M8	11300(HA)/16700(LA)*	(Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011)
-117.526	M4	282 ± 11 <sup>#</sup>	Presente trabalho
-113.812	M5	223,8 ± 7,1 <sup>#</sup>	Presente trabalho
		52(HA)/307(LA)* <sup>\$</sup>	(Yan, Tian e Row, 2008)
-111.244	M20	99 (HA)/292(LA)* <sup>\$</sup>	(Yan, Qiao e Row, 2009)
		51(HA)/258(LA)* <sup>\$</sup>	(Yan e Row, 2008a)
		49(HA)/241(LA)*	(Yan, Row e Yang, 2008)
		11800(HA)/16100(LA)*	(Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011)
		217(HA)/1106(LA)*	(Oliveira, Moreira e Sales, 2011)
-93.2959	M12	50(HA)/233(LA)*	(Yan e Row, 2008b)
		1.58(HA)/183.18(LA)*	(Liu <i>et al.</i> , 2007)
		55.78 <sup>\$</sup>	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
		7.2 – 11.8 <sup>+, \$</sup>	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
		123.68 <sup>+, \$</sup>	(Tan <i>et al.</i> , 2013)
-72.4458	M17	2400(HA)/13200(LA)*	(Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011)
		95	(Oliveira, Moreira e Sales, 2011)
-63.3452	M16	202.5±4.1	Presente trabalho

\* HA (*High Affinity*) e LA (*Low Affinity*) são parâmetros obtidos a partir da análise de Scatchard (variante da análise de Langmuir), <sup>\$</sup> trabalhos que os MIPs não se apresentaram, ou não foram sintetizados para tal, seletivos somente para a Ciprofloxacina, foram seletivos para mais de uma fluoroquinolona; <sup>+</sup> trabalhos que a polimerização foi diferente da do presente trabalho (*bulk*).

No entanto, resta saber se o polímero apresenta uma memória molecular do efeito de impressão ou se a retenção se deve somente pelos sítios ativos distribuídos aleatoriamente no polímero. Desta maneira, foi selecionado o polímero com maior capacidade de retenção para estudo da seletividade perante outras moléculas que poderiam estar presentes no momento da análise da amostra de urina e/ou que fossem semelhantes quanto ao princípio de atuação em comparação com um o polímero não impresso (NIP).

#### **4.5. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE**

De maneira a avaliar a formação de nanocavidades seletivas no MIP, adsorções competitivas de amostras binárias de ciprofloxacina e um interferente, foram realizadas em batelada. As mesmas condições de massa de polímero utilizada, concentração das amostras, temperatura, agitação e pressão na solução também foram empregadas para análise do NIP.

Um possível perfil de adsorção similar para o MIP e o NIP neste experimento indicaria a presença de uma reatividade cruzada, o que é indesejável, significando que o objetivo da síntese estaria perdido.

Nestas condições, a seletividade do MIP em relação ao NIP foi realizada e os resultados são apresentados na Tabela 7, onde pode ser observado que os valores do fator de separação ( $\alpha$ ) para o MIP são sempre maiores que 1. Isso significa que nos MIPs a religação das moléculas foi devido a um efeito de impressão, ou seja, o MIP se liga preferencialmente as moléculas de Ciprofloxacina do que para os interferentes.

Tabela 7. Parâmetros relacionados ao efeito de impressão do MIP sintetizado com o monômero AA para a Ciprofloxacina (CIP) em relação as moléculas: Amoxicilina (AMX), Ácido Nalidixico (NAL), Cloranfenicol (CLR), Norfloxacina (NOR), Tetraciclina Hidroclorada (TCL) e Ácido Úrico (URC).

	Polímero	$C$ (mg L <sup>-1</sup> )	$Q$ (μmol g <sup>-1</sup> )	$K_p$ (mL g <sup>-1</sup> )	$\alpha$	$I$	$S$
MIP	CIP	8,370	4,21319	166,73	6,41	CIP	2,17
	AMX	16,439	1,28871	25,99			
5,55							
NIP	CIP	12,185	2,83093	76,96	1,16	AMX	0,39
	AMX	12,864	2,58345	66,57			
5,42							
MIP	CIP	9,086	3,95364	144,15	6,52	CIP	1,71
	NAL	16,889	1,12573	22,10			
NIP	CIP	11,758	2,98485	84,11	1,20	NAL	0,32
	NAL	12,638	2,66494	69,90			
9,72							
MIP	CIP	9,293	3,87819	138,25	7,72	CIP	2,14
	CLR	17,404	0,93861	17,90			
NIP	CIP	13,003	2,53516	64,58	0,80	CLR	0,22
	CLR	11,92	2,92449	81,25			
1,31							
MIP	CIP	9,919	3,65184	121,97	1,36	CIP	1,03
	NOR	11,427	3,10557	90,01			
NIP	CIP	10,056	3,60053	118,65	1,03	NOR	0,78
	NOR	10,213	3,54319	114,99			
7,62							
MIP	CIP	8,995	3,98684	146,81	8,25	CIP	2,24
	TCL	17,418	0,93559	17,79			
NIP	CIP	12,934	2,5593	65,55	1,08	TCL	0,29
	TCL	13,292	2,42953	60,56			
9,19							
MIP	CIP	7,982	4,35203	180,68	7,75	CIP	2,73
	URC	16,746	1,17704	23,31			
NIP	CIP	12,898	2,57138	66,08	0,84	URC	0,30
	URC	12,102	2,86111	78,31			

Em média o MIP apresentou um fator de separação de 6,34 para a Ciprofloxacina em relação aos interferentes. Em relação a uma das principais moléculas que estarão presentes na urina, o ácido úrico, o MIP apresentou um fator

de separação de 7,75. A única molécula que apresentou um fator de separação de aproximadamente 1 foi a de Norfloxacin, o que é esperado devido a grande semelhança entre as moléculas. No entanto, este fato não é preocupante devido a improbabilidade de ambas estarem presentes em situações cotidianas, pois quando um indivíduo é tratado com uma não é tratado com a outra, já que apresentam princípio ativo e eficácia semelhantes.

Como previsto, os resultados para o NIP não apresentaram o mesmo comportamento. Em média o fator de separação foi de 1,01, o que mostra que a afinidade para a ligação de todas as moléculas é semelhante neste polímero.

Pode-se observar também que o fator de impressão (I) para a molécula de Ciprofloxacina é sempre superior a unidade enquanto que para os interferentes é sempre inferior, desta maneira, pode-se concluir que existiu a formação da cavidade seletiva.

A seletividade é outra variável que demonstra a aplicabilidade do polímero. Para a molécula de Cloranfenicol a seletividade foi quase dez vezes maior o que demonstra a eficiência do MIP sintetizado para a Ciprofloxacina. Para a molécula de Norfloxacin a seletividade apresentou o pior resultado, no entanto, ainda foi maior que 1, o que demonstra que as nanocavidades seletivas foram criadas com êxito e que são altamente favoráveis a ligação especificamente com a Ciprofloxacina. Adicionalmente, a seletividade em relação ao ácido úrico também foi elevada, dado que o valor obtido foi acima de 9.

Desta maneira, pode-se concluir que o MIP apresentou um resultado altamente satisfatório e que a impressão foi obtida com sucesso. Assim, a seguir foi realizada a caracterização física do polímero, a fim de determinar sua morfologia,

composição e estabilidade e para poder determinar em quais condições o MIP poderá ser empregado em amostras reais de urina.

#### **4.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA**

Polímeros são notoriamente difíceis de caracterizar, em grande parte por conta de sua natureza insolúvel. Os polímeros impressos não são uma exceção, ainda mais levando em conta a necessidade de preservação das nanocavidades seletivas. Um grau de caracterização é possível, porém restrito.

A caracterização física permite investigar a morfologia de polímeros impressos da mesma maneira que é realizado com a maior parte dos sólidos porosos. Dependendo do método de análise, a informação é útil e pode ser recolhida sobre os volumes de poros específicos, tamanhos de poro, distribuição de tamanho de poro e áreas de superfície específicas dos materiais.

Técnicas instrumentais adequadas incluem: Termogravimetria, Microscopia Eletrônica de Varredura e Porosimetria por adsorção de nitrogênio.

##### **4.6.1. Análises Térmicas**

As análises termogravimétricas e térmicas diferenciais dos MIPs são apresentadas nas Figuras 35 a 37.

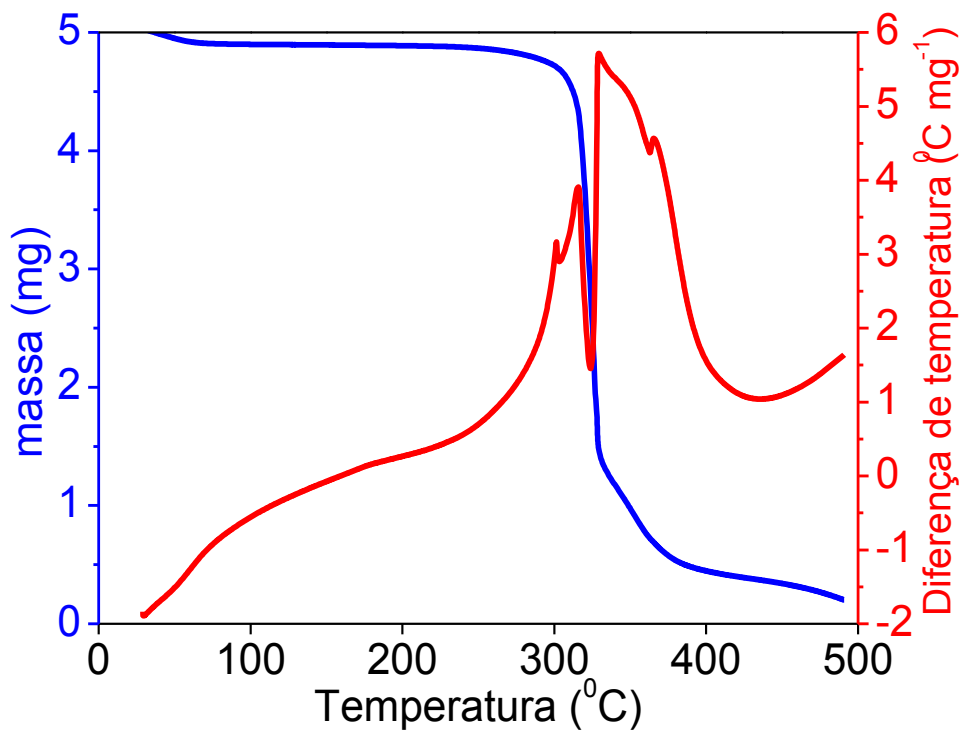


Figura 35. Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial para o MIP sintetizado com o monômero AA.

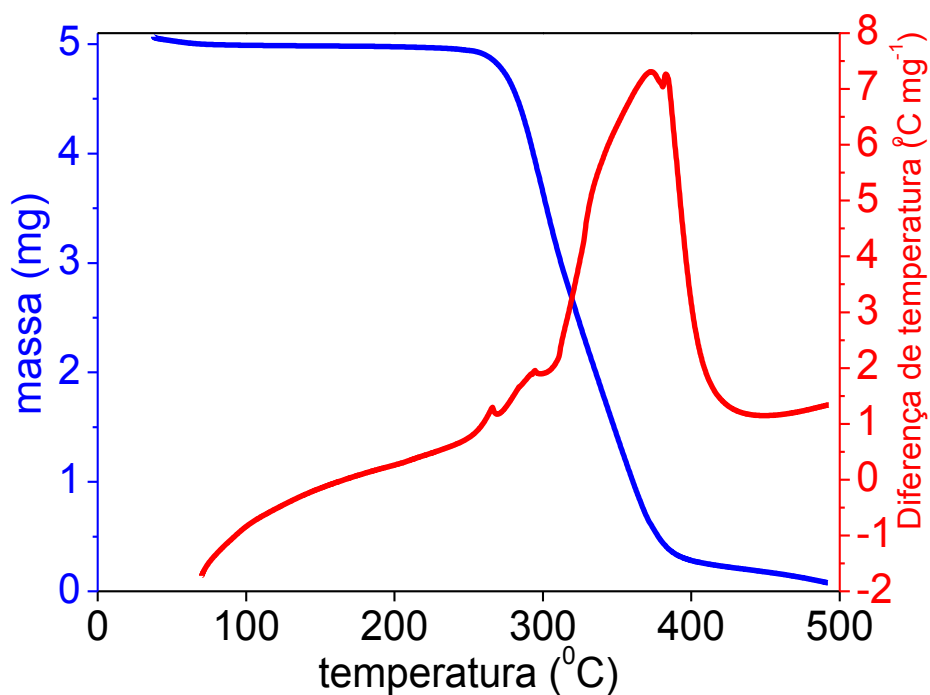


Figura 36. Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial para o MIP sintetizado com o monômero ACL.

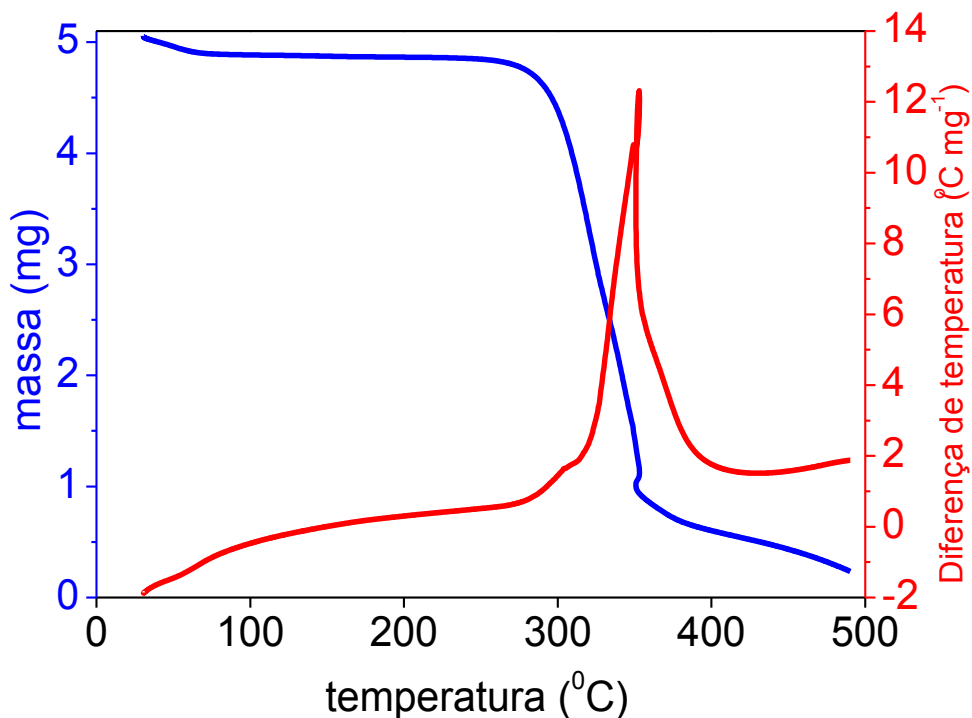


Figura 37. Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial para o MIP sintetizado com o monômero 1VN.

Das análises TG pode-se verificar que todos os polímeros apresentaram comportamento térmico semelhante. Até aproximadamente 250 °C não apresentam perda de massa e após aproximadamente 300 °C apresentam perda de massa significativa. Nas análises DTA pode ser observado que esta transição corresponde a picos exotérmicos. A transição de fases se completa em aproximadamente 500 °C, em um único passo, o que resulta em menos de 3% da massa inicial de resíduo sólido de polímero, ou seja, praticamente todos os compostos se transformaram em produtos gasosos.

Com o experimento supõe-se que os polímeros podem ser utilizados em uma ampla faixa de temperatura, o que comprova a teoria inicial das vantagens de aplicação em relação à utilização de compostos biológicos como enzimas e anticorpos, visto serem altamente sensíveis a pequenas mudanças na temperatura. Outro ponto importante é a comprovação que a utilização da extração das moléculas

de Ciprofloxacina após a síntese para criação das nanocavidades seletivas utilizando-se o extrator soxhlet não interfere na estrutura das nanocavidades, visto que a temperatura de ebulição do metanol é aproximadamente 65 °C, fato este que já tinha sido comprovado pela análise de seletividade.

#### 4.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Uma das características físicas (morfológicas) que são possíveis de se observar nos MIPs é avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados dos MEV são apresentados nas Figuras 38 a 40.

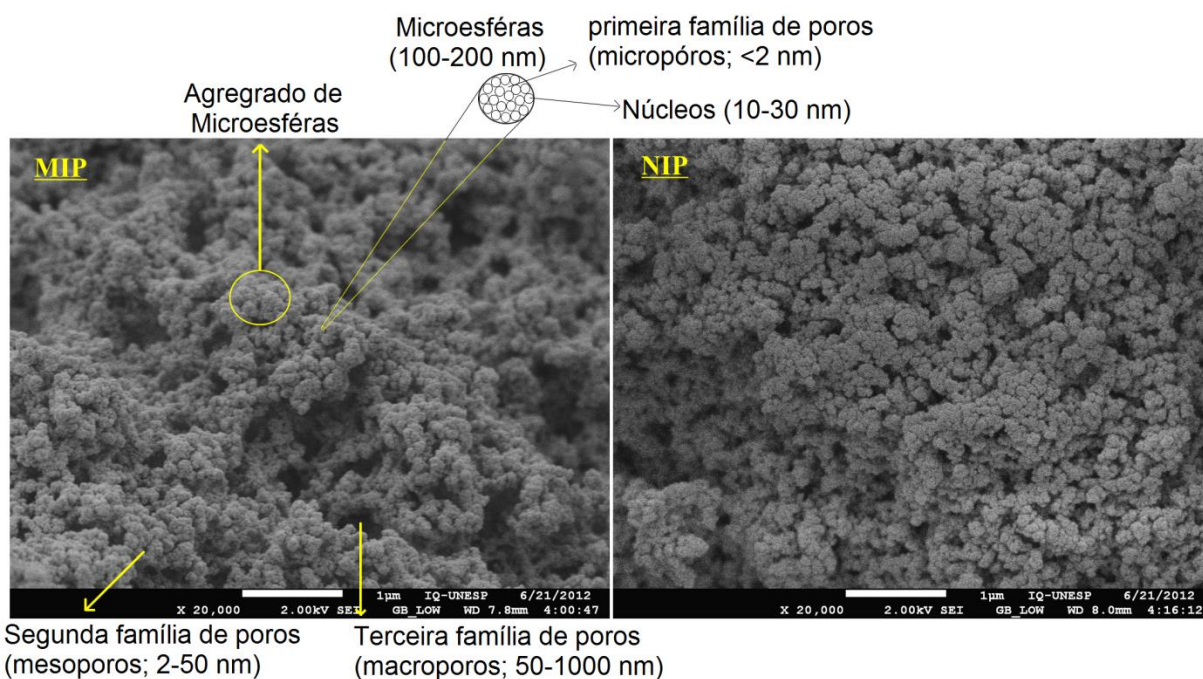


Figura 38. Microscopia Eletrônica de Varredura (equipamento FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) para o MIP sintetizado com o monômero AA e explicação sobre a porosidade resultante dos MIPs proposta por Spivak (Spivak, 2005).

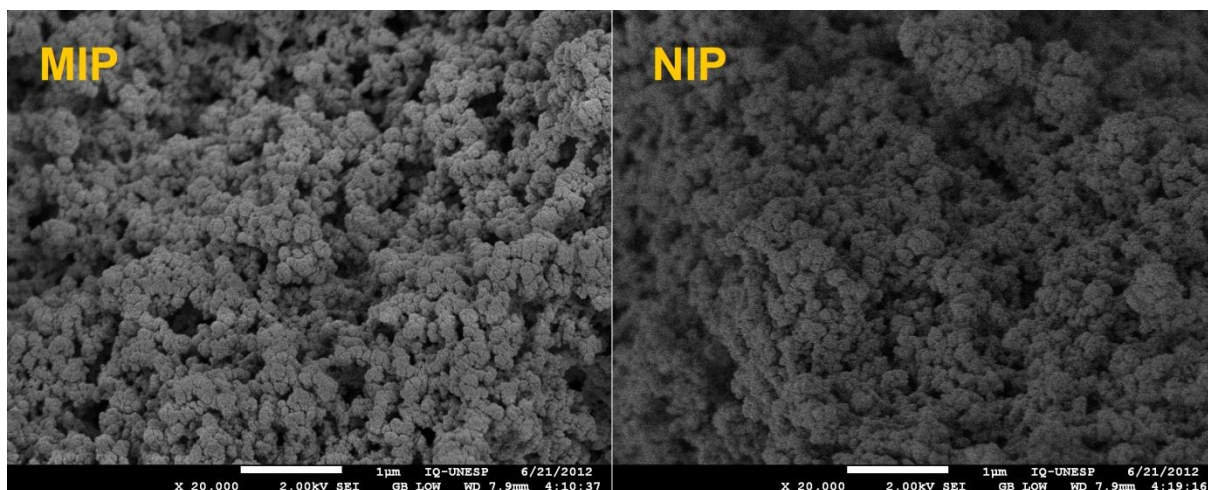


Figura 39. Microscopia Eletrônica de Varredura (equipamento FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) para o MIP sintetizado com o monômero ACL.

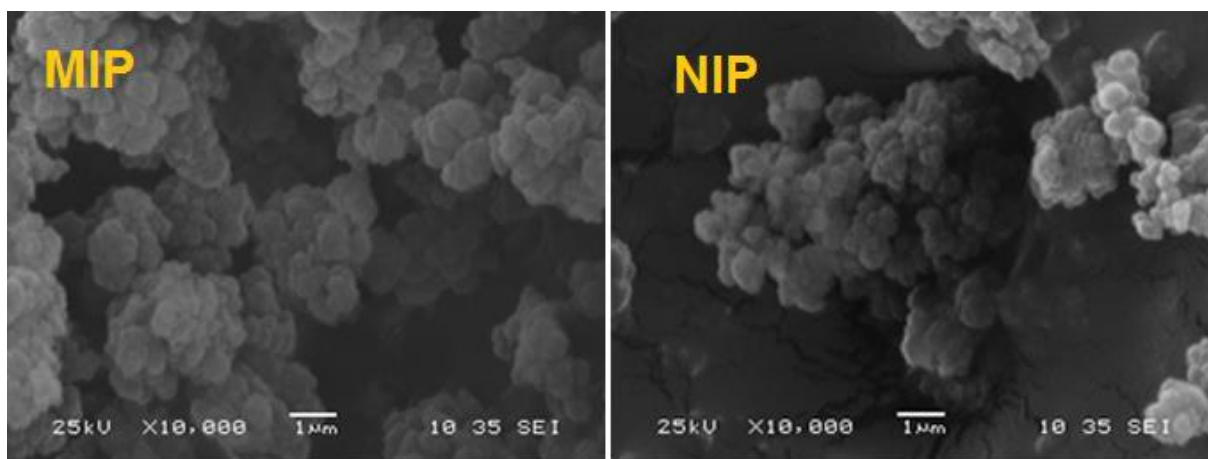


Figura 40. Microscopia Eletrônica de Varredura (equipamento MEV; Topcon, modelo SM300) para o MIP sintetizado com o monômero 1VN.

O MEV apresentado na Figura 38 mostra claramente a morfologia proposta por Spivak (Spivak, 2005), onde se verifica a formação de núcleos que se formam ao redor do iniciador com diâmetro entre 10 e 30 nm, que, em seguida, agregam-se para formar as microesferas, com diâmetros que variam entre 100 nm e 200 nm que se agregam em conjuntos maiores e formam o corpo do MIP (grânulos).

A área superficial do MIP é formada de poros irregulares localizados entre os agregados de microesferas, denominados macroporos que apresentam diâmetro

maior que 50 nm ou pelos espaços entre os agregados de microesferas, que são denominados mesoporos e apresentam diâmetro entre 2 e 50 nm e pelos espaços entre as microesferas, que são denominados microporos e apresentam diâmetro menor que 2 nm, que é onde deve estar presente as nanocavidades seletivas. Um estudo de distribuição de volume de poros pode mostrar quais destes poros representam a maior contribuição.

De acordo com os resultados de MEV apresentados nas Figuras 38 a 40, nota-se que, devido ao processo de trituração, tanto os polímeros impressos quanto os não impressos apresentam aparentemente partículas bastante irregulares e distribuição dos tamanhos não uniformes. Contudo, essa afirmação da diferença na porosidade dos materiais somente poderá ser comprovada utilizando-se a técnica de adsorção de nitrogênio.

#### **4.6.3. Adsorção de Nitrogênio**

As aparentes diferenças nas imagens que são realizadas com MEV, Figuras 38 a 40, podem ser confirmadas utilizando-se a análise de adsorção de nitrogênio para determinação da área superficial específica, volume dos poros e diâmetro médio dos poros entre os MIPs, os NIPs e entre si, conforme apresentado na Tabela 8, onde se apresentam os resultados da comparação dos polímeros.

Pode ser observado que a área superficial específica média dos MIPs ( $264,55 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) é maior que a dos NIPs ( $133,38 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), resultados estes que também são observados em outros trabalhos, como o trabalho realizado por Farrington e colaboradores (Farrington, Magner e Regan, 2006). A alta porosidade exibida por ambos os MIPs pode ser atribuída à presença de mesoporos (Spivak,

2005), o que contribui, não só para o reconhecimento molecular, mas, também, para processos adsortivos.

Tabela 8. Porosimetria dos polímeros impresso e não impressos (temperatura de secagem 80 °C).

<b>Polímero</b>	<b>Área Superficial (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume de poro (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Diâmetro médio do poro (Å)</b>
AA	515,408	0,09103	20,229
MIP ACL	197,564	0,01821	19,276
1VN	80,689	0,00115	18,858
AA	295,081	0,05601	16,180
NIP ACL	91,336	0,01749	16,076
1VN	13,732	0,00171	15,609

Pode-se observar também que o polímero sintetizado com o monômero AA apresentou área superficial maior que a dos outros polímeros. Tais resultados podem ser confrontados com os da capacidade máxima de adsorção dos polímeros pelo método de Langmuir (Tabela 5). Percebe-se claramente a proporcionalidade dos resultados, ou seja, quanto maior a área superficial dos polímeros (Tabela 8) maior sua capacidade de adsorção (Tabela 5). A explicação da relação entre área superficial e capacidade de adsorção pode ser entendida quando se verifica que os poros apresentaram volumes médios semelhantes para todos os MIPS, neste caso, os incrementos na área só podem ocorrer pela formação de maior quantidade de poros e, portanto, maior a imobilização do analito e a capacidade de adsorção.

Ainda, pode-se observar que o tamanho médio dos poros dos MIPS foi de 19,45 Å. Este resultado comprova a teoria de distribuição de poros de Spivak (Spivak, 2005) e pode-se concluir que o principal fator de impressão é devido aos microporos.

De maneira a verificar a hipótese de que estes poros seletivos correspondem à impressão pela molécula de Ciprofloxacina, uma modelagem computacional foi realizada pelo método de melhoria de geometria por mecânica quântica, utilizando a teoria de densidade funcional (DFT, *sigla em inglês para Density Functional Theory*), para estimar a dimensão da molécula, levando em consideração sua estrutura eletrônica.

A definição das fronteiras da molécula foi considerada como a região onde a densidade eletrônica total apresentou valores maiores que  $0,00001 \text{ e}^{-}/\text{Å}^3$ . O valor do comprimento do maior eixo da molécula de Ciprofloxacina calculado após a simulação foi de  $18,71 \text{ Å}$ , muito próximo do valor determinado nos experimentos de adsorção de nitrogênio para os MIPs, ou seja,  $3,8 \%$  menor que o valor determinado pelos experimentos de adsorção de nitrogênio.

Estes resultados sugerem que o MIP pode ser considerado um nano material seletivo e com potencial para aplicação comercial para extração de moléculas em níveis muito baixos em amostras reais.

Outro ponto a se considerar é o fato dos MIPs apresentarem tamanhos de poros maiores que o simulado, enquanto que os NIPs apresentam tamanhos de poros inferiores, tal resultado sugere a impressão molecular e, portanto, a seletividade dos MIPs, visto que uma molécula de Ciprofloxacina não poderia “se encaixar” em um poro com tamanho inferior a sua dimensão e as ligações com este polímero são não específicas.

Tal experimento também explica a seletividade menos pronunciada para a Norfloxacina. Sua molécula apresenta, além de sítios de interação bastante semelhantes, dimensão ligeiramente inferior a molécula de Ciprofloxacina, o que permite sua quase perfeita interação com o MIP.

Apesar de a área superficial ser consideravelmente maior para os MIPs, pode-se concluir que os valores satisfatórios do fator de separação para o MIP e da maior seletividade em relação ao NIP se devam exclusivamente ao efeito de impressão (formação de nanocavidades).

#### **4.7. APLICAÇÃO EM AMOSTRA DE URINA HUMANA**

##### **4.7.1. Desempenho analítico (pré-concentração)**

De maneira a avaliar a aplicabilidade em amostras reais, o MIP sintetizado com o monômero AA foi usado com o objetivo de pré-concentrar a Ciprofloxacina em um volume cinco vezes menor com amostras com concentrações de 5 a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  conforme apresentado nas Figuras 41 a 46.

As medidas do desempenho da técnica foram realizadas utilizando o HPLC UV-Vis Shimadzu®, com o mesmo método cromatográfico dos experimentos de religação proposto por Uslu e colaboradores (Uslu *et al.*, 2008). O comprimento de onda de absorção do detector foi de 280 nm. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna de fase reversa com sílica C18 phenomenex® (250×4,60 mm e 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula).

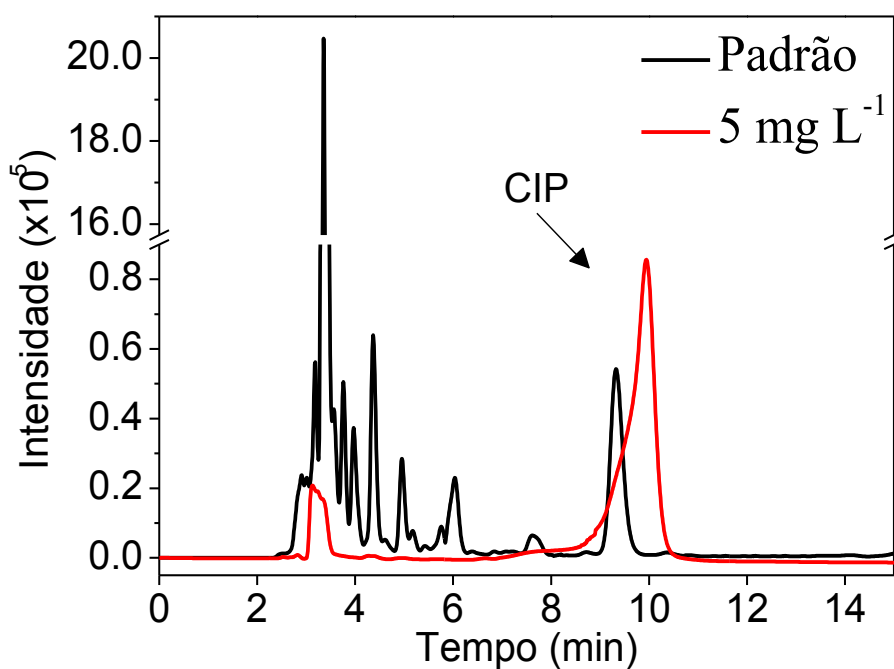


Figura 41. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com  $5 \text{ mg L}^{-1}$ .

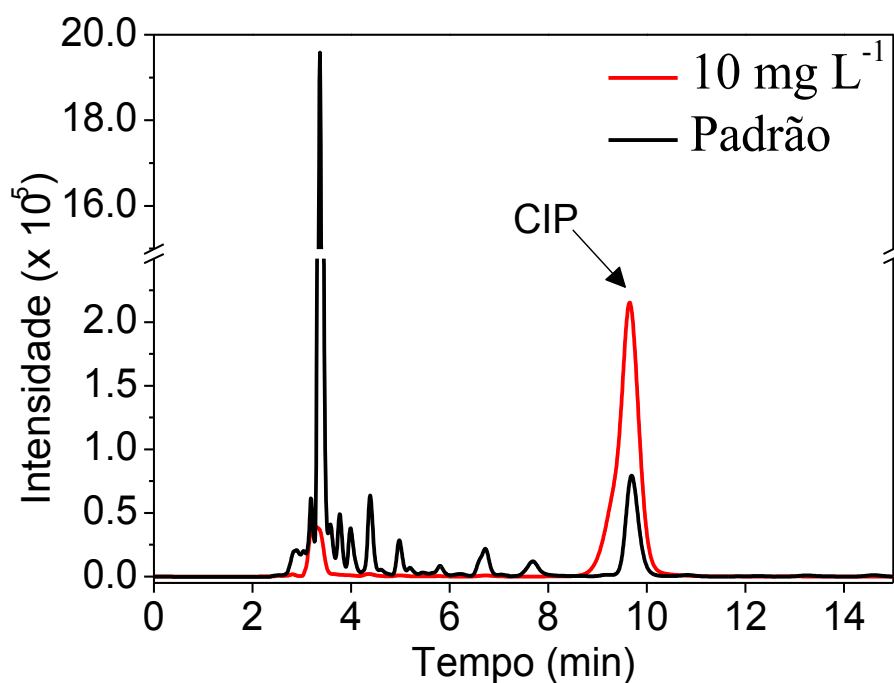


Figura 42. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

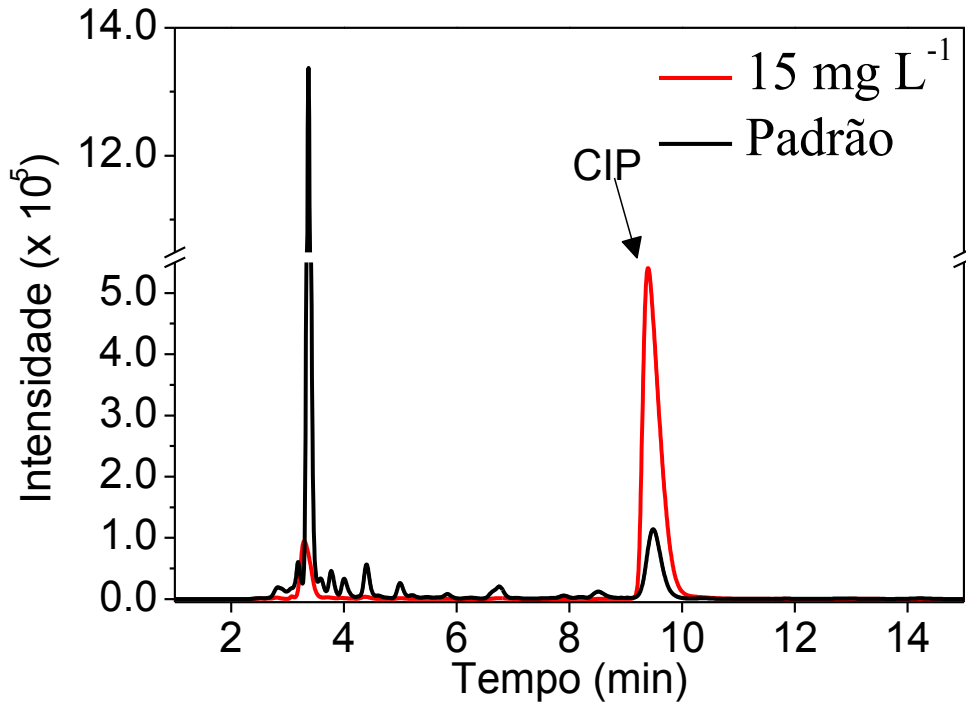


Figura 43. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 15 mg L<sup>-1</sup>.

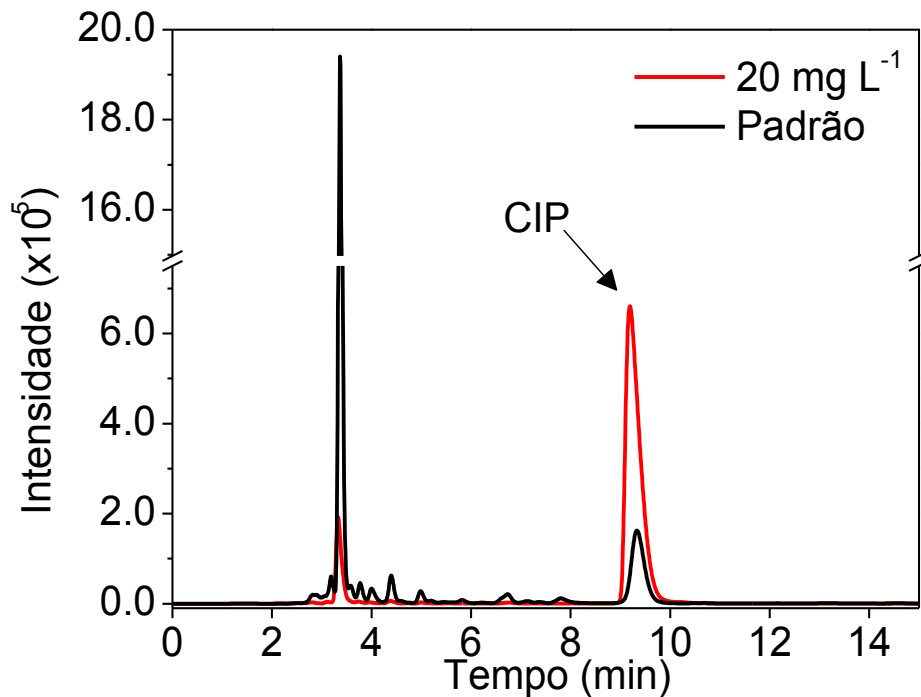


Figura 44. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 20 mg L<sup>-1</sup>.

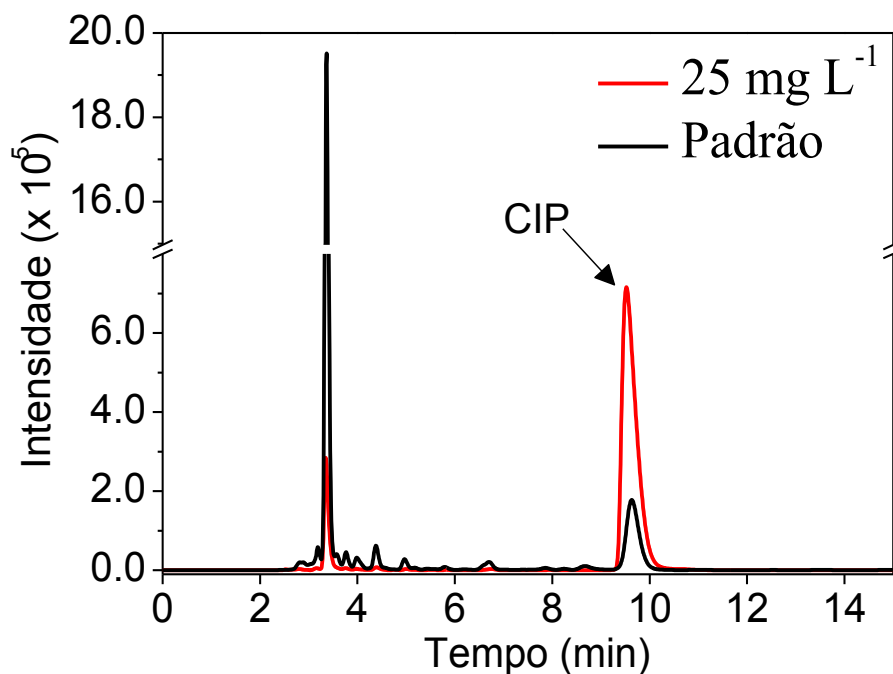


Figura 45. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 25 mg L<sup>-1</sup>.

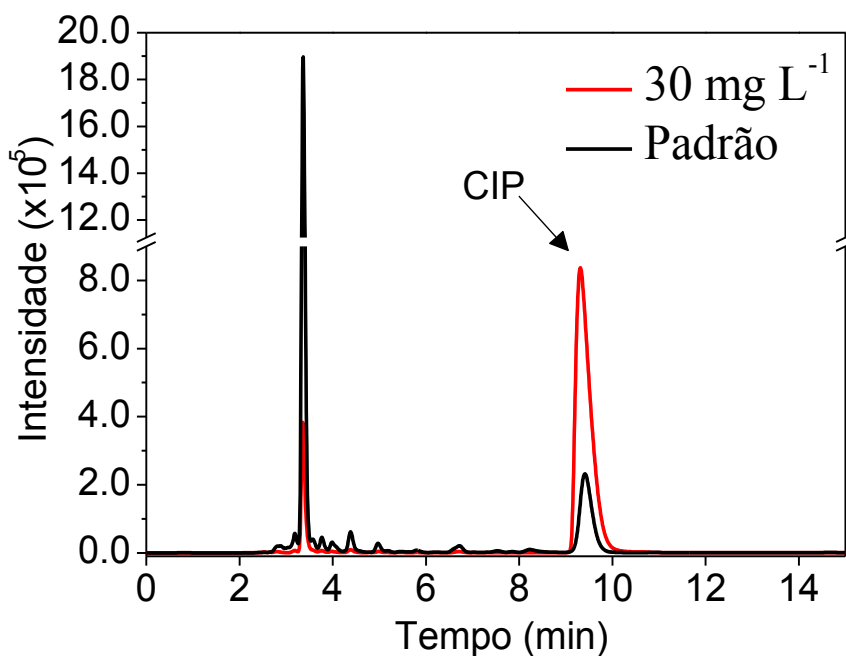


Figura 46. Perfil cromatográfico da amostra de urina pré-concentrada por MISPE (polímero sintetizado com o monômero AA) para amostras com 30 mg L<sup>-1</sup>.

Como observado nos cromatogramas das Figuras 41 a 46, o experimento, além de pré-concentrar a amostra, também retirou os interferentes, ou seja, realizou uma limpeza da amostra, como desejado e discutido mais detalhadamente no próximo item.

Os resultados do ajuste do desempenho da MISPE sintetizado com o monômero AA antes e depois da pré-concentração estão apresentados na Figura 47 e compilados na Tabela 9.

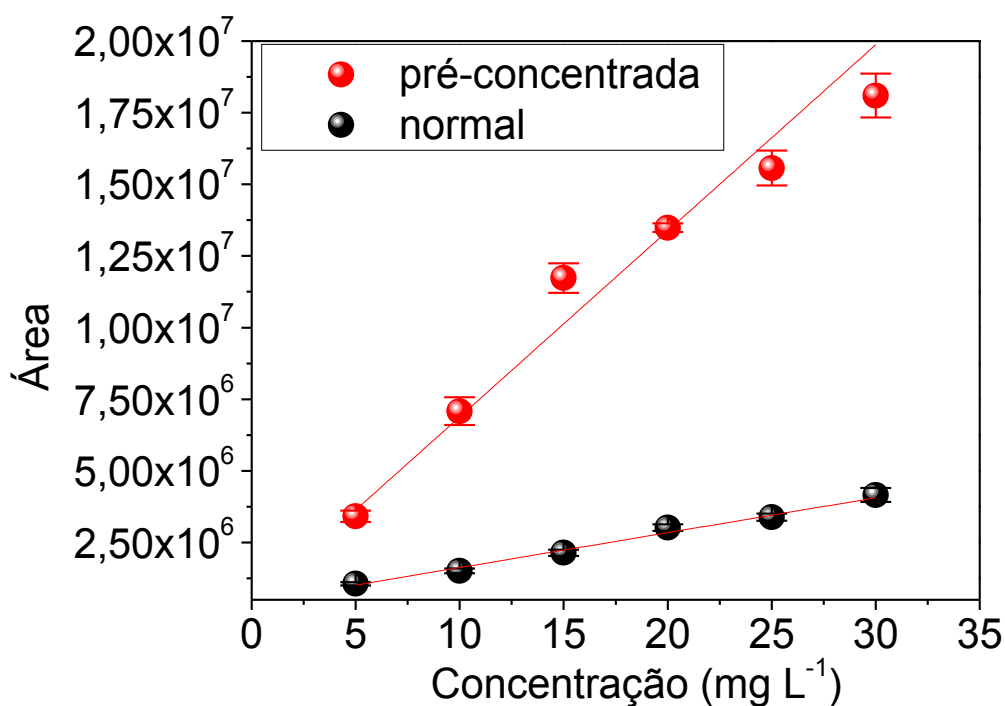


Figura 47. Curva analítica das amostras antes e após a MISPE (monômero AA).

Tabela 9. Características de desempenho do experimento de pré-concentração (MISPE – Monômero AA).

Parâmetros	CIP
Precisão (R.S.D.)	4,8 %
Limite de detecção (3 $\sigma$ )	70 ng mL <sup>-1</sup>
Faixa de calibração linear	5 – 30 $\mu$ g mL <sup>-1</sup>
Regressão após a pré-concentração	AA=649482,8C <sub>CIP</sub> + 387799,2
Regressão convencional	AA=121858,4C <sub>CIP</sub> + 405500,1
Fator de enriquecimento	$\frac{649482,8}{121858,4} = 5,32$

A precisão do método para os padrões, avaliadas em termos do desvio padrão relativo para nove amostras (R.S.D., n=9) foi de 4,8 %. O limite de detecção foi de 70 ng mL<sup>-1</sup>. Outros trabalhos publicados na literatura encontraram valores de 41.300; 46.300 e 32.000 ng mL<sup>-1</sup> no trabalho de Kamel e colaboradores (Kamel, Mahmoud e Mostafa, 2011) utilizando MISPE para serem aplicados à urina humana; 3.000 ng mL<sup>-1</sup> para o trabalho de Oliveira e colaboradores (Oliveira, Moreira e Sales, 2011) analisado Ciprofloxacina com membranas impressas em PVC como sensor; utilizando uma coluna de fase reversa C18 Kamberi e colaboradores (Kamberi *et al.*, 1998) encontraram um limite de quantificação de 10 ng mL<sup>-1</sup> para amostras em plasma humano e 500 ng mL<sup>-1</sup> em urina humana.

O limite de calibração linear, definido como o intervalo onde o ajuste  $R^2 > 0,98$ , se apresentou satisfatório para o intervalo de 5 a 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, o que permite a utilização em uma gama de amostras ambientais.

Quanto ao fator de pré-concentração, este foi definido como a razão entre a inclinação da curva analítica obtida após a pré-concentração e a inclinação antes da

pré-concentração. O resultado encontrado foi de 5,32, o que representa 6,4% a mais do que o previsto, que seria de cinco vezes.

#### 4.7.2. Limpeza e recuperação

De maneira a verificar a possibilidade de eliminação dos interferentes em amostras complexas, foram utilizadas amostras de urina humana enriquecidas com Ciprofloxacina com concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas Figuras 48 a 53 estão apresentados os cromatogramas das amostras de urina humana enriquecidas antes e após a MISPE e sem pré-concentração. Os experimentos foram realizados utilizando-se o HPLC Shimadzu®, conforme descrito anteriormente.

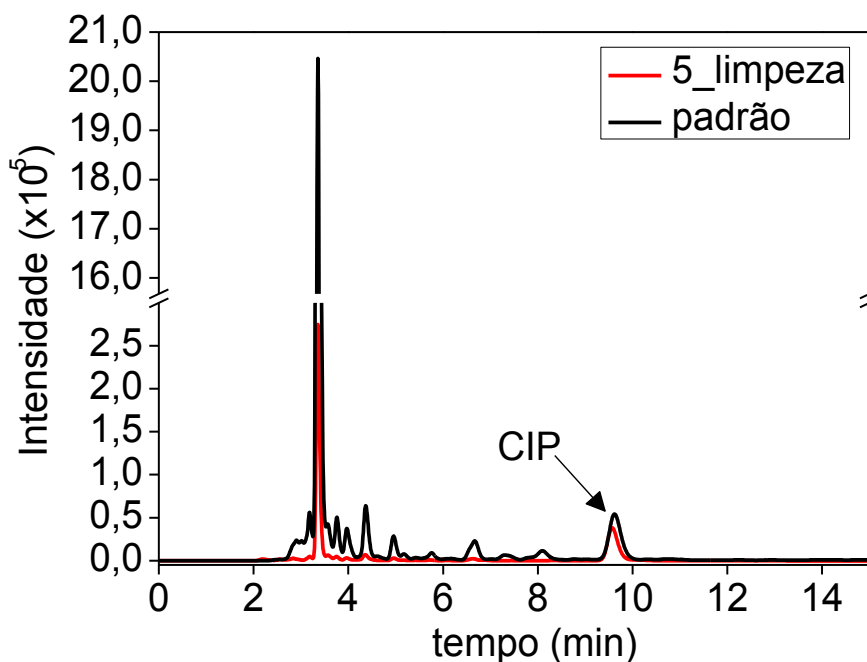


Figura 48. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

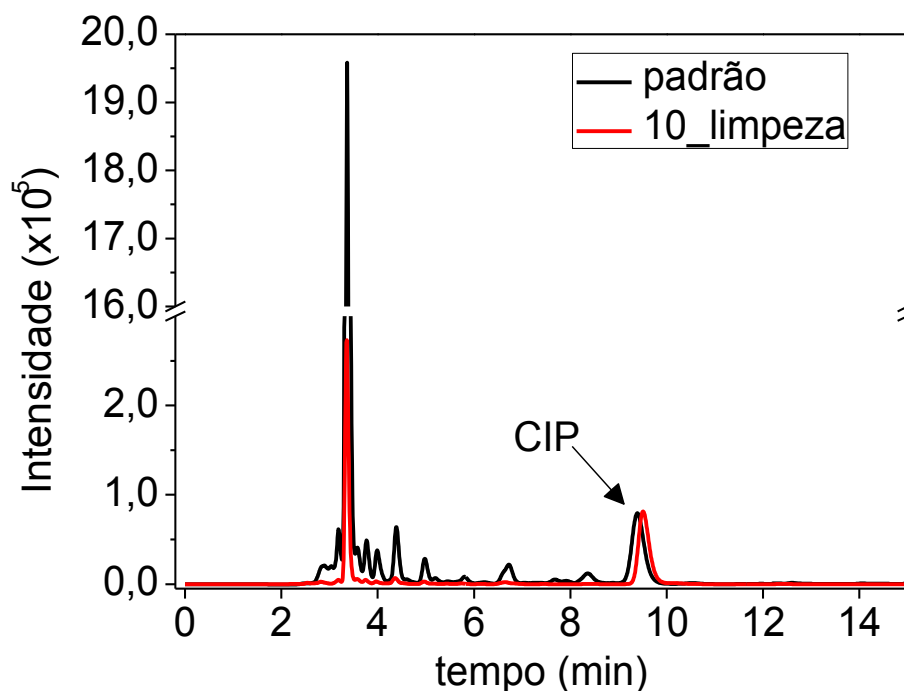


Figura 49. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 10 µg mL<sup>-1</sup>.

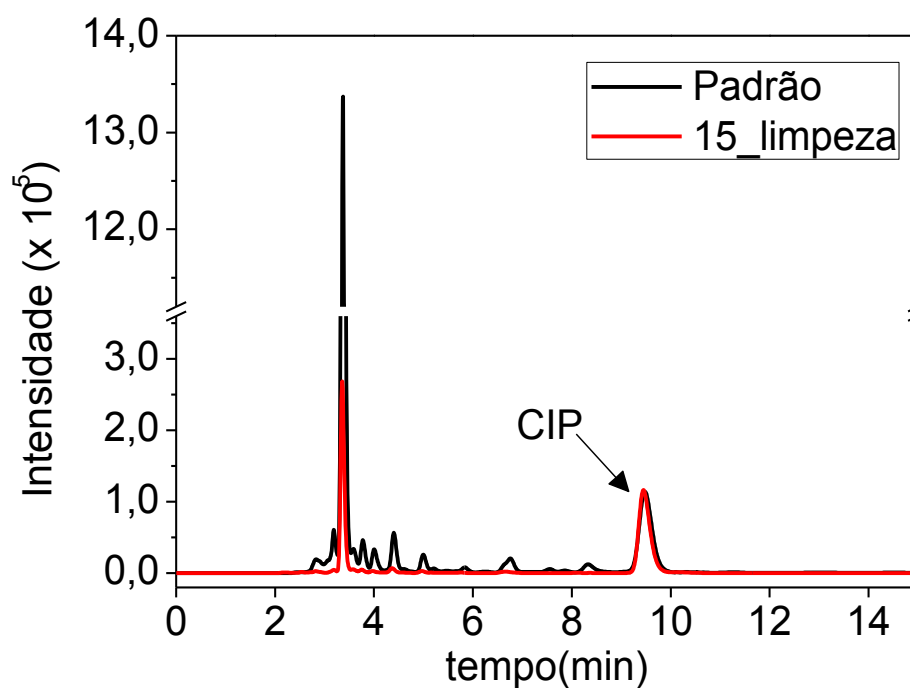


Figura 50. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 15 µg mL<sup>-1</sup>.

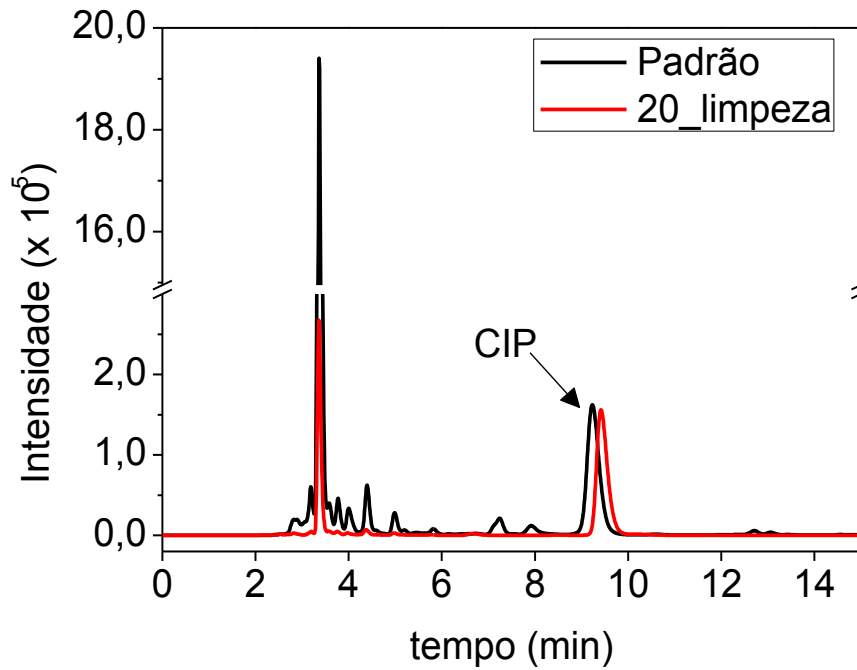


Figura 51. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 20 µg mL<sup>-1</sup>.

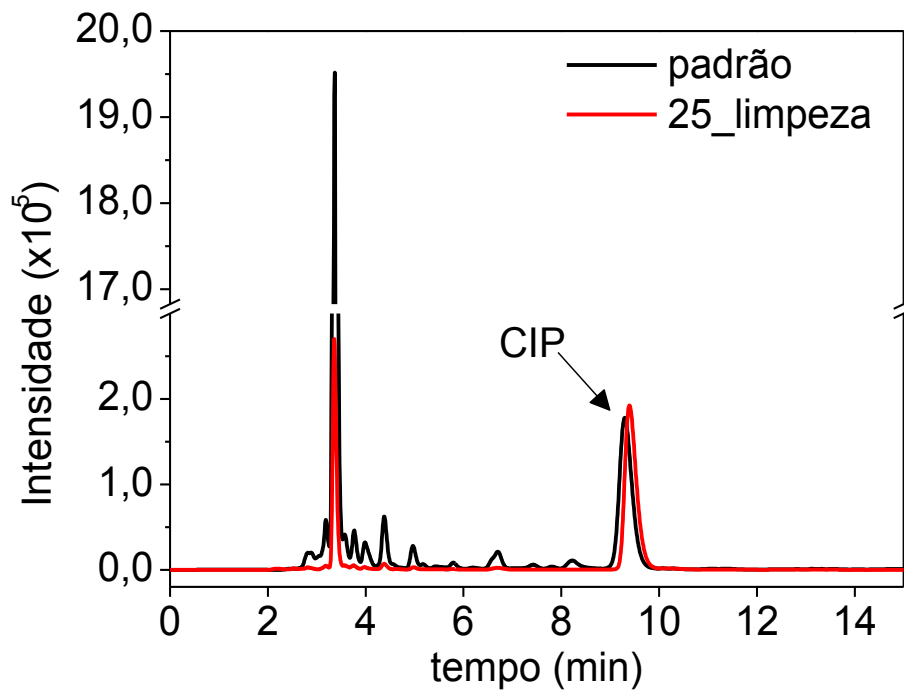


Figura 52. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 25 µg mL<sup>-1</sup>.

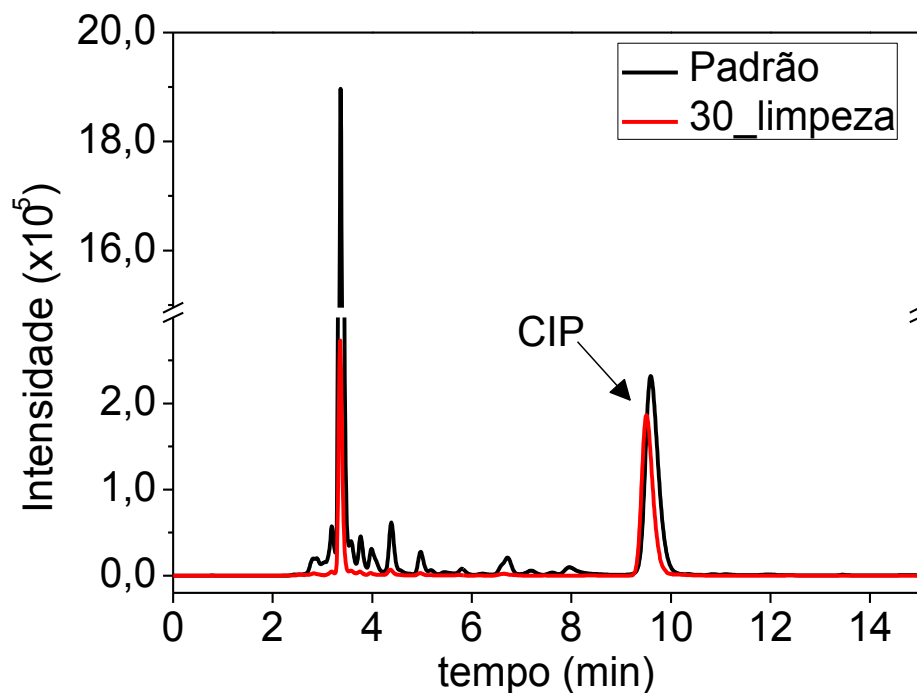


Figura 53. Perfil cromatográfico da amostra de urina enriquecida com Ciprofloxacina antes e após ser limpa por MISPE (monômero AA) para amostra com 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Pode ser observado que o MIP, além de ser altamente seletivo e possibilitar a pré-concentração da Ciprofloxacina, também oferece um grande poder de limpeza das amostras, permanecendo a molécula de interesse enquanto que as outras são reduzidas consideravelmente em aproximadamente 85% em relação à concentração inicial.

Desta maneira, os MIPs possibilitam a utilização de métodos analíticos menos seletivos para detecção deste fármaco, como o UV-Vis, pois com a limpeza da amostra os picos do espectro não se sobrepõem e o pico obtido é devido somente à Ciprofloxacina. Além disso, permite a melhoria no limite de detecção e quantificação de outros métodos utilizados atualmente, como os cromatográficos.

Por fim, de maneira averiguar a exatidão das medidas empregaram-se testes de adição e recuperação. Os resultados podem ser vistos na Tabela 10.

Tabela 10. Recuperação da Ciprofloxacina (CIP) com coluna MISPE-AA para amostras de urina humana.

Amostra	CIP adicionada ( $\mu\text{g}$ )	CIP medida ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação (%)
Urina humana	0	$0,88 \pm 0,12$	---
	25	$24,4 \pm 0,5$	97,6%
	50	$53,6 \pm 2,8$	107,2%
	75	$90,6 \pm 3,2$	120,8%
	100	$104,6 \pm 0,3$	104,6%
	125	$121,2 \pm 3,2$	97,0%
	150	$141,3 \pm 4,2$	94,2%

Pode-se verificar que a recuperação foi satisfatória, em média de 102%. No entanto o método é limitado a concentrações menores, pois quando se tende a concentrações elevadas de Ciprofloxacina na solução a recuperação cai rapidamente. No entanto, este resultado não é um fator preocupante, visto que o método foi desenvolvido exatamente para limpeza e pré-concentração de amostras pouco concentradas, o caso de concentrações maiores pode ser facilmente resolvido utilizando-se somente o HPLC.

De maneira a avaliar a comparação do método com a utilização de SPE utilizando coluna de fase reversa C18, as amostras também foram injetadas nesta coluna, conforme apresentado na Tabela 11. Pode-se verificar que no caso da coluna C18 a recuperação média foi de 157,6%. O valor elevado deve-se ao fato desta coluna pré-concentrar todos os analitos que são apolares, o que resultou na superposição de picos cromatográficos. Mostrando uma vez mais as vantagens oferecidas pelo MIP sintetizado neste trabalho.

Tabela 11. Recuperação da Ciprofloxacina (CIP) com coluna C18 para amostras de urina humana.

Amostra	CIP adicionada ( $\mu\text{g}$ )	CIP medida ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação (%)
Urina Humana	0	$5,0 \pm 1,9$	---
	25	$58,2 \pm 4,0$	232,8%
	50	$109 \pm 3,5$	218,0%
	75	$114 \pm 2,9$	152,0%
	100	$87,4 \pm 2,6$	87,4%
	125	$149 \pm 4,1$	119,2%
	150	$204 \pm 3,9$	136,0%

CAPÍTULO V

# CONCLUSÕES

## 5. CONCLUSÕES

Como proposto na literatura, as simulações computacionais se apresentaram como ferramenta para desenvolvimento de produtos mais específicos e o entendimento de seus comportamentos.

No trabalho, provou-se que um estudo sistemático e detalhado da interação do complexo de pré-polimerização (monômeros mais utilizados na literatura e a Ciprofloxacina), utilizando simulação quântica semi-empírica, resulta em energias de interação que podem ser utilizadas para melhoramento dos polímeros molecularmente impressos.

As isotermas de adsorção realizadas com MIPs sintetizados variando-se somente os monômeros provaram que a afinidade dos polímeros pela Ciprofloxacina foi diretamente proporcional à energia de ligação resultante da simulação computacional, confirmando o ponto principal do trabalho que foi provar que a simulação poderia ser útil para economia de tempo e investimento no desenvolvimento destes polímeros.

Desta maneira, a simulação quântica facilitou, e com grande precisão, a pré-seleção dos monômeros funcionais para impressão molecular, permitindo a preparação de matrizes impressas pré-melhoradas.

A seletividade do material se mostrou bastante elevada em relação ao polímero não impresso, chegando a quase dez vezes maior para a Ciprofloxacina do que para uma lista de seis moléculas interferentes, o que demonstra que a nanocavidade seletiva foi criada com sucesso.

A caracterização física do material mostrou que foi criado um material resistente a temperatura e estável até aproximadamente 250 °C, o que possibilita a aplicação em situações onde sistemas biológicos não podem atuar. Além do mais,

foi possível verificar com a medida da porosidade e confirmação por simulação computacional quântica DFT que a maioria dos poros criados se deve as nanocavidades formadas pela extração da Ciprofloxacina.

O MIP ainda permitiu concentrar as amostras de urina humana de ciprofloxacina em torno de cinco vezes, além de permitir limpar a amostra de interferentes, o que possibilita a utilização de técnicas menos sensíveis e/ou a melhoria nos limites de detecção de técnicas mais sensíveis. A recuperação média de Ciprofloxacina em amostras de urina humana foi de aproximadamente 102% em média, o que não foi o caso de quando se utilizou a coluna comercial de fase reversa C18, que, além de pré-concentrar a ciprofloxacina, também pré-concentrou uma série de outros compostos presentes na urina humana, e resultou em uma recuperação média de aproximadamente 150%. Tais características permitem afirmar que o material apresenta aplicabilidade comercial elevada.

Assim, pode ser comprovado que a simulação computacional se apresenta como uma ferramenta fundamental para o entendimento do funcionamento dos MIPs e principalmente para seu melhoramento, além disso, foi provado que a simulação quântica semi-empírica é uma ferramenta útil para criação de polímeros impressos com aplicabilidade comercial.

CAPÍTULO VI

# REFERÊNCIAS

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical chemistry of surfaces**. New York: Wiley, 1997.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. parte 2, fasc. 3. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/4\\_edicao/parte2/4\\_edicao\\_fasc3.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/4_edicao/parte2/4_edicao_fasc3.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. São Paulo, 2006. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm)>. Acesso em: 10 maio 2014.

ANSARI, R. et al. Application of nano surfactant modified biosorbent as an efficient adsorbent for dye removal. **Separation Science and Technology**, v. 47, n. 12, p. 1802-1812, 2012.

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

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, Oct. 1990.

BAGGIANI, C. et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1/2, p. 35-44, 2001.

BARREIRO, E. J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 1-9, maio 2001.

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

BLASCO, C.; PICO, Y. Development of an improved method for trace analysis of quinolones in eggs of Laying Hens and Wildlife Species using molecularly imprinted polymers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 11005-11014, Nov. 2012.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1/2, p. 33-44, Sept. 1999.

CACHO, C. et al. Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly-imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 4, p. 491-496, June 2003.

- CARO, E. et al. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 2, Feb. 2006a.
- CARO, E. et al. Direct determination of ciprofloxacin by mass spectrometry after a two-step solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 9, p. 1230-1236, June 2006b.
- CARO, E. et al. Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated quinolones from urine and tissue samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, n. 2, p. 145-151, Mar. 2006c.
- CHEN, B. et al. Separation, enrichment and determination of ciprofloxacin using thermoseparating polymer aqueous two-phase system combined with high performance liquid chromatography in milk, egg, and shrimp samples. **Food Chemistry**, v. 148, p. 105-111, 2014.
- CHEN, Z. et al. Separation of fluoroquinolones by MEKC modified with hydrophobic ionic liquid as a modifier. **Chromatographia**, v. 75, n. 1/2, p. 65-70, Jan. 2012.
- CHOWDHURY, Z. Z. et al. Breakthrough curve analysis for column dynamics sorption of Mn(II) ions from wastewater by using Mangostana garcinia peel-based granular-activated carbon. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 8, 2013.
- CLORIDRATO DE CIPROFLOXACINO. Responsável técnico Shideu Ishitani. São Paulo: Bayer S. A., 2013. Bula de remédio.
- CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 804, n. 1, p. 173-182, May 2004.
- DAILYMED. **Ciprofloxacin hydrochloride tablet**. 2010. Disponível em: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=02a9c070-77ab-445b-9bf0-78dcb47bf4da>>. Acesso em: 10 jan. 2014.
- DAVANKOV, V.; KURGANOV, A.; BOCHKOV, A. Resolution of racemates by high-performance liquid-chromatography. **Advances in Chromatography**, v. 22, p. 71-116, 1983.
- FARRINGTON, K.; MAGNER, E.; REGAN, F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, n. 1, p. 60-68, Apr. 2006.
- FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 361-375, 2008.
- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 1, p. 2-10, Jan. 2010.
- FRATINI, L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Ciprofloxacin determination by visible light spectrophotometry using iron(III)nitrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 127, n. 2, p. 279-282, Feb. 1996.

GALES, A. C. et al. Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 137-144, 1997.

GIBBS, J. et al. Persistence of pharmaceuticals and other organic compounds in chlorinated drinking water as a function of time. **Science of the Total Environment**, v. 373, n. 1, p. 240-249, Feb. 2007.

HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, July 2000.

HOSOYA, K. et al. Uniform-size macroporous polymer-based stationary-phase for hplc prepared through molecular imprinting technique. **Chemistry Letters**, n. 8, p. 1437-1438, Aug. 1994.

INGERSLEV, F. et al. Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. **Chemosphere**, v. 44, n. 4, p. 865-872, Aug. 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2008**. Rio de Janeiro, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa anual de comércio**. Rio de Janeiro, 2011. v. 21, p. 1-67.

KAMBERI, M. et al. Determination of ciprofloxacin in plasma and urine by HPLC with ultraviolet detection. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1251-1255, June 1998.

KAMEL, A. H.; MAHMOUD, W. H.; MOSTAFA, M. S. Biomimetic ciprofloxacin sensors made of molecularly imprinted network receptors for potential measurements. **Analytical Methods**, v. 3, n. 4, p. 957-964, Apr. 2011.

KANG, I. J. et al. Effect of 17 beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 47, n. 1, p. 71-80, Apr. 2002.

KASSAB, N. M. et al. Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 507-513, 2005.

KLUG, M. et al. Análise das isotermas de adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) pela N-(3,4-dihidroxibenzil) quitosana empregando o método da regressão não linear. **Química Nova**, v. 21, p. 410-413, 1998.

KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, Mar. 2002.

LIANG, H. R.; KAYS, M. B.; SOWINSKI, K. M. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 772, n. 1, p. 53-63, May 2002.

- LIU, S. et al. Water-compatible molecularly imprinted microspheres in pipette tip solid-phase extraction for simultaneous determination of five fluoroquinolones in eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 49, p. 11974-11980, Dec. 2013.
- LIU, Z-L. et al. Synthesis of molecularly imprinted polymeric microspheres with ciprofloxacin as template and the study of their binding characteristics. **Hebei Daxue Xuebao, Ziran Kexueban**, v. 27, n. 4, p. 368-372, 2007.
- LIZONDO, M. et al. Physicochemical properties of enrofloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1845-1849, 1997.
- LOKE, M. L. et al. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 759-765, Apr. 2000.
- LUACES, M. D. et al. Chemiluminescence analysis of enrofloxacin in surface water using the tris(1,10-phenantroline)-ruthenium(II)/peroxydisulphate system and extraction with molecularly imprinted polymers. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 458-464, Sept. 2013.
- MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, n. 7, p. 795-802, Aug. 2001.
- MATSUI, J. et al. Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor. **Analytical Communications**, v. 34, n. 3, p. 85-87, Mar. 1997.
- MEIER, F. et al. Computational and experimental study on the influence of the porogen on the selectivity of 4-nitrophenol molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 68-74, Sept. 2012.
- MICHALSKA, K.; PAJCHEL, G.; TYSKI, S. Determination of ciprofloxacin and its impurities by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, n. 1/2, p. 267-272, Oct. 2004.
- MULROY, A. When the cure is the problem. **Water Environmental and Technology**, v. 13, n. 2, p. 32-36, 2001.
- NICHOLLS, I. A. et al. Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 3, p. 543-552, 2009.
- NYAMWERU, B. C. et al. Development and validation of a thin-layer chromatographic-densitometric method for the analysis of ciprofloxacin hydrochloride tablets. **Journal of Planar Chromatography: Modern TIC**, v. 26, n. 4, p. 370-374, Aug. 2013.
- OLIVEIRA, H. M. V.; MOREIRA, F. T. C.; SALES, M. G. F. Ciprofloxacin-imprinted polymeric receptors as ionophores for potentiometric transduction. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 2017-2023, Feb. 2011.

O'MAHONY, J. et al. Design and implementation of an imprinted material for the extraction of the endocrine disruptor bisphenol A from milk. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 931, p. 164-169, July 2013.

PAGANINI, P. P. **Síntese e caracterização de trocadores iônicos inorgânicos a base de óxidos mistos estanho-titânio para utilização na recuperação de cádmio e níquel e estudos fotoluminescentes**. 2007. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

PILETSKY, S. A.; ALCOCK, S.; TURNER, A. P. F. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 9-12, Jan. 2001.

POLYAKOV, M. V. The question of possible transition of a catalytic reaction from surface into space. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, v. 3, p. 201-203, 1932.

QUAGLIA, M. et al. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrochromatography. **Analyst**, v. 126, n. 9, p. 1495-1498, Sept. 2001.

RABOLLE, M.; SPLIID, N. H. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 715-722, Apr. 2000.

SANTOS, W. D. J. R. **Nanoreatores biomiméticos à peroxidase baseados em MIP: Uma estratégia promissora para determinação de compostos fenólicos**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Molecularly imprinted polymers for controlling drug release. Part 1: synthesis and characterization. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1609-1619, 2009.

SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p.1779-1794, Dec. 2005.

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

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

SZULTKA, M. et al. Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 940, p. 66-76, Dec. 2013.

- TAKAGISH, T.; KLOTZ, I. M. Macromolecule-small molecule interactions: introduction of additional binding-sites in polyethyleneimine by disulfide crosslinkages. **Biopolymers**, v. 11, n. 2, p. 483-491, 1972.
- TAMAYO, F. G.; CASILLAS, J. L.; MARTIN-ESTEBAN, A. Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 482, n. 2, p. 165-173, Apr. 2003.
- TAN, F. et al. Preparation of molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective removal of fluoroquinolone antibiotics in aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244, p. 750-757, Jan. 2013.
- 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, p. 1076-1086, 2005a.
- TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, p. 1087-1101, 2005b.
- TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, Nov. 1998.
- TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1/2, p. 81-90, Jan. 1999.
- TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; TADEO, J. L. Molecular imprinting-based separation methods for selective analysis of fluoroquinolones in soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 2, p. 97-104, Nov. 2007.
- USLU, M. O. et al. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. **Water Air and Soil Pollution**, v. 190, n. 1/4, p. 55-63, May 2008.
- VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.
- VIENO, N. M. et al. Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination a pilot-scale drinking water treatment plant. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 14, p. 5077-5084, July 2007.
- VYBIRALOVA, Z. et al. High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 851-858, Apr. 2005.
- WANG, H.; WANG, R.; HAN, Y. Preparation of molecular imprinted microspheres based on inorganic-organic co-functional monomer for miniaturized solid-phase extraction of fluoroquinolones in milk. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 949, p. 24-29, Feb. 2014.

- WANG, J. et al. Surface molecularly imprinted polymers based on yeast prepared by atom transfer radical emulsion polymerization for selective recognition of ciprofloxacin from aqueous medium. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 11, June 2014.
- WHITCOMBE, M. J. et al. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 27, p. 7105-7111, July 1995.
- WILLIAMS, D. H. et al. Toward the semiquantitative estimation of binding constants - guides for peptide peptide binding in aqueous-solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 18, p. 7020-7030, Aug. 1991.
- WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. The fluoroquinolones - structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 4, p. 581-586, 1985.
- WULFF, G.; SARHAN, A. Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 11, n. 4, p. 341, 1972.
- YAN, H.; ROW, K. H. Molecularly imprinted solid-phase extraction for determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in chicken muscle. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1173-1178, June 2008a.
- YAN, H.; ROW, K. H. Novel molecularly imprinted monolithic column for selective on-line extraction of ciprofloxacin from human urine. **Biomedical Chromatography**, v. 22, n. 5, p. 487-493, May 2008b.
- YAN, H.; QIAO, F.; ROW, K. H. Molecularly imprinted-matrix solid-phase dispersion for selective extraction of five fluoroquinolones in eggs and tissue. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 21, p. 8242-8248, Nov. 2007.
- YAN, H.; QIAO, F.; ROW, K. H. Molecularly imprinted monolithic column for selective on-line extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin from urine. **Chromatographia**, v. 70, n. 7/8, p. 1087-1093, Oct. 2009.
- YAN, H.; ROW, K. H.; YANG, G. Water-compatible molecularly imprinted polymers for selective extraction of ciprofloxacin from human urine. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 227-232, 2008.
- YAN, H.; TIAN, M.; ROW, K. H. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in milk using molecularly imprinted solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 16/17, p. 3015-3020, Sept 2008.
- YANG, X. et al. Synthesis of a novel molecularly imprinted organic-inorganic hybrid polymer for the selective isolation and determination of fluoroquinolones in tilapia. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 945, p. 127-134, Jan. 2014.
- YE, L.; MOSBACH, K. The technique of molecular imprinting: principle, state of the art, and future aspects. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 41, n.1/4, p. 107-113, Dec. 2001.

YILMAZ, E. et al. A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 1577-1581, 2002

YOUNG, D. **Computational chemistry**: a practical guide for applying techniques to real world problems. Chichester: Wiley-Interscience, 2001.

ZOTOU, A.; MILTIADOU, N. Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 3/4, p. 559-568, May 2002.

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS  
FUTURAS

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como perspectivas futuras de continuidade do trabalho serão realizadas simulações computacionais utilizando-se a mecânica molecular para o entendimento das melhores estequiometrias do analito em relação aos demais componentes da síntese: monômero, agente reticulante, iniciador radicalar e solvente. Serão também estudados os melhores solventes porogênicos.

A escolha para a simulação por dinâmica molecular se deve neste caso pelo custo computacional empregado. Uma síntese em nível semi-empírico teria um custo proporcional ao estudo experimental, o que inviabilizaria o fundamento. Para comprovar os resultados novas sínteses deverão ser realizadas e o material resultante caracterizado.

Outra perspectiva possível para utilização do trabalho é a utilização do MIP em sensores ópticos e eletroquímicos. Para isso, outras técnicas de síntese poderão ser empregadas com os aperfeiçoamentos já estudados.