

Lucas Moreira Silva

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MIP-MAGNÉTICO
SELETIVO À CIPROFLOXACINA E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE
DO USO SIMULTÂNEO DE DOIS MONÔMEROS FUNCIONAIS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

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

Coorientador: Dr. Marcos Vinicius Foguel

**Araraquara-SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

S586s Silva, Lucas Moreira
Síntese, caracterização e otimização de MIP-magnético seletivo à ciprofloxacina e avaliação da viabilidade do uso simultâneo de dois monômeros funcionais / Lucas Moreira Silva. – Araraquara : [s.n.], 2018.
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Coorientador: Marcos Vinicius Foguel

1. Ciprofloxacina. 2. Polímeros impressos. 3. Nanotecnologia. 4. Monômeros. 5. Nanopartículas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MIP-MAGNÉTICO SELETIVO À CIPROFLOXACINA E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO USO SIMULTÂNEO DE DOIS MONÔMEROS FUNCIONAIS"

AUTOR: LUCAS MOREIRA SILVA

ORIENTADORA: MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR

COORIENTADOR: MARCOS VINICIUS FOGUEL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof^ª. Dr^ª. HIDEKO YAMANAKA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. IVO MILTON RAIMUNDO JUNIOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 08 de agosto de 2018

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Moreira Silva

Nascimento: 03/10/1993

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Carmo do Paranaíba/MG - Brasil

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Monir Reis Moreira e Selma Luiza da Silva Moreira

E-mail: lucas_silvamg@hotmail.com

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55 Bairro: Quitandinha. CEP: 14800-060
Araraquara/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em Biotecnologia

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP.

Período: 08/2015 – 09/2018

Título da dissertação: Síntese e caracterização de MIP-magnético para desenvolvimento de sensor eletroquímico para determinação de ciprofloxacina em amostras complexas para aplicação biotecnológica

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

Coorientador: Dr. Marcos Vinicius Foguel

Bolsa: CAPES

Graduação em Biotecnologia

UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Campus de Patos de Minas, Patos de Minas/MG

Período: 08/2011 – 08/2016

Título do trabalho de conclusão de curso: Ziram herbicide determination using a polished silver solid amalgam electrode.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Djenaine de Souza

PUBLICAÇÕES

SILVA, L. M.; DE SOUZA, D. Ziram herbicide determination using a polished silver solid amalgam electrode. **Electrochimica Acta**, v. 224, p. 541-550, 2016. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.11.133

- Capítulo de livro

SILVA, L. M.; FOGUEL, M. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Ciprofloxacina: analytical methods for its monitoring in the environment. In: Ciprofloxacina: biosynthesis, applications, and adverse effects. Nova science publishers, 2018.

1. Participação em eventos científicos:

SILVA, L. M.; FOGUEL, M. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Síntese, caracterização e otimização de mIP-magnético seletivo à ciprofloxacina e avaliação da viabilidade do uso simultâneo de dois monômeros funcionais. In: 19 Encontro Nacional de Química Analítica; 7 Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas. Resumo do 19 ENQA e 7 CIAQA, 2018.

SILVA, L. M.; MAIA, V. C. P.; PUPIN, R. R.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; De SOUZA, D. New insights in the dithiocarmates herbicides electroanalytical determination: the thiram case. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, NATAL/RN.

SILVA, L. M.; VAZ, C. M. P.; MACHADO, S. A. S.; De SOUZA, D. Utilização de microeletrodos como sensor na determinação de fitohormônio em solos. In: II Simpósio de Tecnologia e Ciência, 2016, Patos de Minas. Resumos do II SIMTECI, 2016.

SILVA, L. M.; VAZ, C. M. P.; MACHADO, S. A. S.; De SOUZA, D. Determinação do fitohormônio ácido indolacético em solos empregando-se microeletrodo. In: 18 Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis. Resumos do 18 ENQA, 2016.

SILVA, L. M.; DE SOUZA, D. Determinação eletroanalítica do Ziram um complexo ditiocarbamato. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE), 2015, Uberlândia. XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE), 2015.

SILVA, L. M.; DE SOUZA, D. Metodologia para avaliação do mecanismo redox do pesticida Ziram empregando eletrodo sólido de amálgama de prata. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Poços de Caldas. Programação e Livro de Títulos, 2014. v. 1. p. 22-22.

SILVA, L. M.; DE SOUZA, D. Identificação e quantificação do pesticida ditiocarbamato (ziram) em amostras de interesse ambiental. In: 1º simpósio de tecnologia e ciência de patos de minas, 2014, Patos de Minas. Anais do I Simpósio de Tecnologia e Ciência, 2014. v. 1. p. 26-26.

MAIA, V. C. P.; SILVA, L. M.; DE SOUZA, D. Utilização do eletrodo sólido de amálgama na otimização experimental e voltametria para o desenvolvimento de método de ana líse do pesticida tiram. In: XIX Jornada em Engenharia Química, 2014, Uberlândia. Anais de resumo, 2014.

Dedico este trabalho a Deus pelo dom da vida, aos meus pais Monir e Selma, ao meu irmão Mateus e a Priscila pelo amor e apoio na minha vida.

*“É de sonho e de pó
O destino de um só
Feito eu perdido
Em pensamentos
Sobre o meu cavalo
É de laço e de nó
De jibeira o jiló
Dessa vida
Cumprida a sol”
(Romaria - Renato Teixeira)*

*“O sucesso consiste em ir de derrota em derrota sem perder o
entusiasmo.”*

(Winston Churchill)

*“Covardes vacilam,
mas o perigo é muitas vezes superado
por aqueles que nobremente ousam.”*

(Elizabeth II)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade e misericórdia para com minha vida, dando-me força nos momentos difíceis, coragem e sabedoria. A Ele toda honra e toda glória, pois todas as conquistas e vitórias alcançadas em minha de vida é para glorificar seu nome.

Aos meus pais, Monir e Selma, e ao meu irmão Mateus, por sempre apoiarem meus caminhos e incentivar a minha formação.

Às minhas avós Andrezina e Helena, por sempre me colocar em suas orações.

À minha família, pelo apoio, e por entender os momentos que eu não pude estar com vocês.

À minha namorada Priscila, por sempre me incentivar e apoiar meus caminhos, por estar ao meu lado nos dias de desânimo sempre com seu ombro amigo e fazer parte das pequenas conquistas que obtive nesta caminhada. Obrigado pelo seu amor, carinho e por sua compreensão na distância física que nos separa. Te amo. Obrigado também, a sua família por todo apoio e acolhimento.

À Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor, pela orientação, por todas as oportunidades concedidas e pelos ensinamentos essenciais ao desenvolvimento deste trabalho e construção da minha carreira.

Ao Dr. Marcos Vinícius Foguel, pela coorientação, colaboração, ensinamentos e discussões sempre pertinentes e instigantes, que levaram a execução e conclusão deste trabalho.

Prof.^a Dr.a Hídeko Yamanaka e o Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano pela avaliação e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

Ao meu amigo de longa data Samuel Siqueira, por sempre ser presente em minhas conquistas mesmo não estando presente no meu dia, pelo apoio e pelos inúmeros conselhos. Obrigado pelos nossos encontros semestrais no Bar do Valdir e pelos conselhos que forma importante para minha vida.

A minha amiga Prof^a Dr^a Djenaïne de Souza por todo o apoio. Obrigado por ter me favorecido a melhor iniciação científica que eu poderia ter tido. Foram ensinamentos profissionais e pessoais que levarei comigo por toda a minha vida.

Aos meus amigos, Bárbara Camila, Rafael Fonseca e Bruna Bergamin que o Grupo de Eletroanalítica - GEAr me deu e que levarei para o resto de minha vida. Obrigado pela amizade construída, por todos os momentos de descontração, pelo suporte nos momentos de estresse e desânimo, e por toda a parceria que tornaram esses anos inesquecíveis.

Aos meus amigos da União da Mocidade Presbiteriana (UMP) da Igreja Presbiteriana Central de Araraquara (IPA). Obrigado pelo acolhimento, pelos encontros e momentos de descontração, vocês foram instrumentos de Deus em minha vida.

A todos os colegas do GEAr pelas discussões científicas e momentos de descontração durante os cafés.

A todos os técnicos pelas análises realizadas e discussões dos resultados, bem como aos funcionários e servidores do Instituto de Química.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Ao INCT-Datrem, processo 2014/50945-4, pelo suporte técnico proporcionado.

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!”

Romanos 11:36

RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos com maior seletividade e sensibilidade tem ampla importância para a determinação de diferentes compostos químicos. O emprego de polímeros molecularmente impressos, do inglês “*Molecularly Imprinted Polymers*” (MIP), que são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde (*template*) a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do. No caso deste trabalho, o *template* utilizado foi a ciprofloxacina, antibiótico amplamente empregado no tratamento de doenças de seres humanos e animais. Desta maneira foi realizado a síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, pelo método de co-precipitação, estas foram recobertas com MIP em sua superfície, formando assim um material híbrido do tipo *Core-Shell*. Foram realizadas duas sínteses distintas, sendo um primeiro MIP utilizando apenas o ácido acrílico como monômero funcional (Mag-MIP1), e um segundo MIP tendo em sua estrutura o ácido acrílico e o 1-vinilimidazol como monômeros funcionais (Mag-MIP2). Os materiais foram caracterizados fisicamente por diferentes técnicas. Foram realizados experimentos de otimização do Mag-MIP1 e Mag-MIP2, foi observado que o Mag-MIP1 exibiu um tempo ótimo de interação de 120 min em meio aquoso, enquanto que o Mag-MIP2 apresentou um tempo ótimo de interação de 30 min em meio de água/metanol (70:30) v/v. No que se refere ao parâmetro de seletividade, o Mag-MIP2 exibiu um valor de seletividade ($S \geq 2$), enquanto que o Mag-MIP1 apresentou valores de $S \geq 1$. Os materiais desenvolvidos foram aplicados como fase dispersiva extratora em amostras de leite bovino do tipo integral e do tipo desnatado. Sob as mesmas condições experimentais, foi avaliada a capacidade de extração da ciprofloxacina adsorvida nos materiais sintetizados. O Mag-MIP1 apresentou um percentual de recuperação médio de 85% para amostras de leite bovino do tipo integral e 90% para amostras de leite bovino do tipo desnatado. O Mag-MIP2 exibiu o valor de 80% para amostras de leite bovino do tipo integral e 55% para amostras de leite bovino do tipo desnatado, sugerindo que neste caso precisa-se ainda otimizar a dessorção do analito para obtenção de resultados satisfatórios para o Mag-MIP2. Contudo, os Mag-MIP desenvolvidos mostraram-se promissores para serem utilizados como fase adsorvente em sistemas de extração em fase sólida e, evidencia que o uso de dois monômeros funcionais poderá melhorar a eficiência dos polímeros molecularmente impressos, uma vez que mostrou maior seletividade e menor tempo de interação para a adsorção de ciprofloxacina, contribuindo para o avanço no grupo e na área de pesquisa.

Palavras chaves: Ciprofloxacina, polímeros molecularmente impressos, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e materiais híbridos.

ABSTRACT

The development of analytical methods with greater selectivity and sensitivity is of great importance for the determination of different chemical compounds. The use of molecularly imprinted polymers (Molecularly Imprinted Polymers) (MIP), which are obtained by polymerization in the presence of a template molecule to be printed, such that a polymeric backbone is formed around the polymer. In the case of this work, the template used was ciprofloxacin, an antibiotic widely used in the treatment of diseases of humans and animals. In this way the synthesis of iron oxide magnetic nanoparticles was performed by the co-precipitation method, these were covered with MIP on their surface, forming a hybrid material of the Core-Shell type. Two distinct syntheses were performed, a first MIP using only acrylic acid as a functional monomer (Mag-MIP1), and a second MIP having acrylic acid and 1-vinylimidazole as functional monomers (Mag-MIP2). The materials were physically characterized by different techniques. Mag-MIP1 and Mag-MIP2 optimization experiments were performed, Mag-MIP1 showed an optimal interaction time of 120 min in aqueous medium, while Mag-MIP2 showed an optimal interaction time of 30 min in water / methanol (70:30) v / v medium. As for the selectivity parameter, the Mag-MIP2 exhibited a selectivity value ($S \geq 2$), while the Mag-MIP1 presented values of $S \geq 1$. The materials developed were applied as extractive phase dispersion in samples of bovine milk of the whole type and skimmed-milk type. Under the same experimental conditions, the extraction capacity of ciprofloxacin adsorbed on the synthesized materials was evaluated. Mag-MIP1 presented an average recovery percentage of 85% for bovine whole milk samples and 90% for skim milk type samples. Mag-MIP2 showed the value of 80% for bovine milk samples of the integral type and 55% for samples of bovine milk of the skimmed type, suggesting that in this case it is still necessary to optimize the desorption of the analyte to obtain satisfactory results for the Mag-MIP2. However, the developed Mag-MIPs have shown to be promising to be used as an adsorbent phase in solid phase extraction systems, and it shows that the use of two functional monomers may improve the efficiency of the molecularly printed polymers since it showed greater selectivity and lower interaction time for adsorption of ciprofloxacin, contributing to the advancement in the group and in the research area.

Keywords: Ciprofloxacin, molecularly printed polymers, magnetic nanoparticles of iron oxide and hybrid materials.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura molecular da ciprofloxacina.25
- Figura 2** – Síntese, modificação e sinalização das nanopartículas magnéticas.46
- Figura 3** – Síntese do Mag-MIP1, usando um monômero funcional (ácido acrílico).47
- Figura 4** – Síntese do Mag-MIP2, usando dois monômeros funcionais (ácido acrílico e 1-vinilimidazol).48
- Figura 5** – Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Ciprofloxacina.52
- Figura 6** – Interação da ciprofloxacina com o ácido acrílico (MP18) (a) e com o ácido acrílico (MP18) e 1-vinilimidazol (MP16) (b).53
- Figura 7** – Curva analítica ciprofloxacina em CLAE/UV-Vis, em meio aquoso, comprimento de onda de 280 nm, vazão de 1 mL min⁻¹, fase móvel 83% de uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e 17% de acetonitrila. Insert: curva analítica e equação da reta.54
- Figura 8** – Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em função do aumento da massa polimérica. Tempo de interação de 2h, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de 5,0 µmol L⁻¹, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg. ...55
- Figura 9** - Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em função do aumento do tempo de interação entre o analito e o polímero. Massa de polímero de 10 mg, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de 5,0 µmol L⁻¹, tempos avaliados 5,0 min; 10,0 min; 15,0 min; 30,0 min; 60,0 min; 90,0 min; 120,0 min; 180,0 min; 240,0 min e 300,0 min.56
- Figura 10** - Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em diferentes valores de pH. Massa de polímero de 10 mg, tempo de interação de 2 h, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de 5,0 µmol L⁻¹, pH avaliado nos valores de 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0.57
- Figura 11** - Isoterma de adsorção da ciprofloxacina aos polímeros em meio aquoso a pH 5, e meio orgânico 10:90 água:acetonitrila (v/v), massa de polímero de 10 mg e tempo de interação de 2 h, no intervalo de concentração de ciprofloxacina de 1,0 a 50 µmol L⁻¹.58
- Figura 12**- Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em função da massa polimérica. Tempo de interação de 2 h, 1,0 mL de solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de 5,0 µmol L⁻¹, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg. ...59
- Figura 13** - Percentual de retenção em função do aumento da massa polimérica. Tempo de interação de 2 h, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina em pH 5 na concentração de 5,0 µmol L⁻¹, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg..60

Figura 14 - Percentual de retenção em função do aumento do tempo de interação entre o analito e o polímero. Massa de polímero de 10 mg, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tempos avaliados 5,0 min; 10,0 min; 15,0 min; 30,0 min; 60,0 min; 90,0 min; 120,0 min; 180,0 min; 240,0 min e 300,0 min.	61
Figura 15 – DRX das Fe_3O_4 (a). Picos de DRX disponíveis na base de dados <i>Inorganic Crystal Structure Database</i> ICSD Number 082432 (b).	62
Figura 16 – Halos obtidos por meio da difração de elétrons de Fe_3O_4 em MET.	63
Figura 17 – Imagem de MET com ampliação de 200.000X da magnetita (a) e histograma de distribuição de tamanho da magnetita (b).	64
Figura 18 - DRX das Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	65
Figura 19 - Difratomogramas de raios x de Mag-MIP1 e Mag-NIP1 (a) e Mag-MIP2 e Mag-NIP2 (b).	66
Figura 20 – Espectro de FTIR das Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$	67
Figura 21 - Espectro de FTIR do EGDMA.	68
Figura 22 - Espectro de FTIR da comparação entre a estrutura do EGDMA e do Mag-MIP1/Mag-NIP1 (a), e comparação entre a estrutura do EGDMA e do Mag-MIP2/Mag-NIP2 em (b).	69
Figura 23 - Imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (a), histograma de distribuição de tamanho da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (b), imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ (c), histograma de distribuição de tamanho da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ (d).	70
Figura 24 - Imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-MIP1 (a), histograma de distribuição de tamanho da Mag-MIP1 (b), imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-NIP1 (c), histograma de distribuição de tamanho da Mag-NIP1(d), Imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-MIP2 (e), histograma de distribuição de tamanho da Mag-MIP2 (f), imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-NIP2 (g), histograma de distribuição de tamanho da Mag-NIP1(h).	72
Figura 25 - Ilustração do momento magnético (M) de diferentes tipos de materiais sob aplicação de um campo magnético (H).	73
Figura 26 - Curvas de histerese magnética para Fe_3O_4 ; $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ (a); e curvas de histerese magnética para Mag-MIP1; Mag-MIP2; Mag-NIP1 e Mag-NIP2 (b).	75
Figura 27 - Percentual de retenção em função do aumento da massa polimérica. Tempo de interação de 120 min, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg; Mag-MIP1/Mag-NIP1 (a) e Mag-MIP2/Mag-NIP2 (b).	77

Figura 28 - Percentual de retenção em função do aumento do tempo de interação entre o analito e o polímero, Mag-MIP1/Mag-NIP1 (a) e Mag-MIP2/Mag-NIP2 (b). Foram pesados 10 mg dos polímeros, tempos avaliados 5,0 min; 10,0 min; 15,0 min; 30,0 min; 60,0 min; 90,0 min; 120,0 min; 180,0 min; 240,0 min e 300,0 min. Mag-MIP1/Mag-NIP1 foram dispersos em 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que Mag-MIP2/Mag-NIP2, estes foram 1 mL solução em uma solução de H₂O/MeOH (70:30) v/v de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$78

Figura 29 - Isotherma de adsorção de ciprofloxacina em (a) Mag-MIP1/Mag-NIP1 em meio aquoso; (a) Mag-MIP2/Mag-NIP2 em meio 70:30 H₂O/MeOH (v/v), massa de polímero de 5 mg e tempo de interação de 120 min (a) e 30 min (b).81

Figura 30 – Percentual de retenção de diferentes interferentes para avaliação dos parâmetros de seletividade. Em (a) Mag-MIP1/Mag-NIP1; massa de polímero de 5 mg; dispersos em solução aquosa de ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, levofloxacina, ácido ascórbico e paracetamol na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por um tempo de interação de 120 min. (b) Mag-MIP2/Mag-NIP2; massa de polímero de 5 mg; dispersos em meio 70:30 H₂O/MeOH (v/v) de ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, levofloxacina, ácido ascórbico e paracetamol na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por um tempo de interação de 30 min.85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais monômeros funcionais empregados na síntese de polímeros molecularmente impressos.	32
Tabela 2 - Monômeros avaliados na simulação computacional para a síntese de MIP.	41
Tabela 3 – Comparação entre as distâncias interplanares obtidas pela DRX e MET.	63
Tabela 3 – Comparação entre as distâncias interplanares obtidas pela DRX e MET.	68
Tabela 5 – Bandas de FTIR referentes ao EGDMA em comparação com Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2.	69
Tabela 6 - Resultados de porosidade obtidos pelas isotermas de BET para as amostras de Mag-MIP1; Mag-NIP1; Mag-MIP2 e Mag-NIP2.	76
Tabela 7 - Classificação dos poros segundo seu diâmetro.	76
Tabela 8 – Resultados dos parâmetros dos ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2.	82
Tabela 9 – Parâmetros relacionados ao efeito de impressão do Mag-MIP1/Mag-NIP1.	85
Tabela 10 – Parâmetros relacionados ao efeito de impressão do Mag-MIP2/Mag-NIP2.	85
Tabela 11 – Aplicação dos polímeros sintetizados em amostras de leite diluídas 200,00 vezes. Massa de polímero 5 mg; dispersos por 120 min em 1 mL de solução aquosa de ciprofloxacina preparada na amostra de leite integral e desnatado nas concentrações de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Mag-MIP1/Mag-NIP1, e por 30 min em 1 mL de uma solução 70:30 H ₂ O/MeOH (v/v) de ciprofloxacina preparada na amostra de leite integral e desnatado nas concentrações de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Mag-MIP2/Mag-NIP2.	87
Tabela 12 – Percentual de recuperação das concentrações de concentrações de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, massa polimérica de 5 mg, tempo total de dessorção de 120 min para Mag-MIP1/Mag-NIP1 Mag-MIP2/Mag-NIP2 em amostras de leite integral desnatado.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% Ret: porcentagem de retenção

% : porcentagem

ΔG : Energia livre de Gibbs

μg : Micrograma

μL : Microlitro

$2\theta_f$: Ângulo final

$2\theta_i$: Ângulo inicial

AIBN: 2,2-azobisisobutironitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A_p : Área de uma solução padrão

A_s : Área solução remanescente após a interação com os polímeros

A_s : Área superficial

ATR: Reflectância total atenuada

BET: *Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett e Edward Teller*

BJH: *Barrett-Joyner-Halenda*

C_e : Concentração remanescente no equilíbrio

C_i : Concentração inicial do analito

CIPRO®: Nome comercial da ciprofloxacina utilizado pela Bayer AG

CLAE/UV-Vis: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a u detector ultravioleta-visível

CLAE: Cromatógrafo líquido de alta eficiência

CPF_X – BSA : Ciprofloxacina associada a soro albumina bovina

CPF_X – HSA: Ciprofloxacina associada a soro albumina humana

d_{med} : Diâmetro médio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DRX: Difractometria de raios X

DSE: Extração em fase sólida dispersiva

EC: Eletroforese capilar

EGDMA: Etilenoglicol dimetacrilato

$F_3O_4@SiO_2$: Magnetita-TEOS

Fe_3O_4 : Óxido de ferro

$Fe_3O_4@SiO_2-C=C$: Magnetita-TEOS- silanizada

FeCl₂.4H₂O: Cloreto de ferro II tetrahidrato

FeCl₃.6H₂O: Cloreto de ferro III hexahidratado

FEG-MEV: Microscópio eletrônico de varredura com campo de emissão

FTIR: *Fourier-transform infrared spectroscopy*

GABA_A: ácido gama-aminobutírico

-H_c: Campo coercitivo

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

I: Fator de impressão

ICSD: *Inorganic Crystal Structure Database*

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K: Constante de afinidade

K_p: Coeficiente de partição

LD: Limite de detecção

LMR: limites máximos aceitáveis

LQ: Limite de quantificação

M: Carga máxima de polímero

Mag-MIP1: Polímero

Mag-MIP1: Polímero molecularmente impresso magnético com um monômero funcional

Mag-MIP2: Polímero molecularmente impresso magnético com dois monômero funcional

Mag-NIP1: Polímero não impresso magnético com um monômero funcional

Mag-NIP2: Polímero não impresso impresso magnético com dois monômero funcional

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MIP: Polímeros molecularmente impressos

MP: Código dos monômeros funcionais utilizados na simulação computacional

m_{pol}: Massa de polímero

MPS: Metacrilóxiopropil trimetoxissilano

M_R: Magnetização remanescente

M_s: Magnetização de saturação

NaDC: Desoxicolato de sódio

ng: Nanograma

NIP: Polímero não impresso

Ø: Diâmetro médio de poro

PAMVet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos

PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

Q: Eficiência de adsorção

Q_{\max} : Capacidade máxima de adsorção

RC: Celulose regenerada

rpm: Rotação por minuto

S: Seletividade

SPE: *Solid phase extraction*

TEOS: Tetraetilortosilicato

Tris-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano

uA: Unidade de área

UV-Vis: Ultravioleta-visível

V: Volt

v: Volume

V: Volume de solução adicionada

V_{med} : Volume médio de poro

VOQ: Voltametria de onda quadrada

VSM: *Vibrating Sample Magnetometer*

α : Fator de separação

β : Heterogeneidade

γ : gama

γ -CD: γ -cilcodextrinas

δ : deformações angulares representadas

v: Deslocamento axial

$^{\circ}\text{C}$: Grau Celsius

σ : Tensão superficial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	OBJETIVOS	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	<i>Reagentes e soluções</i>	3737
3.2	<i>Método cromatográfico</i>	38
3.3	<i>Instrumentação.....</i>	38
	<i>3.3.1Caracterizações físicas.....</i>	38
3.4	<i>Simulação computacional.....</i>	40
3.5	<i>Síntese do MIP proporção 1:4:32</i>	41
	<i>3.5.1 Síntese.....</i>	41
	<i>3.5.2 Estudo de religação.....</i>	42
	<i>3.5.3 Estudo de cinético.....</i>	43
	<i>3.5.4 Efeito do pH do meio.....</i>	43
	<i>3.5.5 Isotermas de adsorção</i>	43
3.6	<i>Síntese do MIP proporção 1:4:200.....</i>	44
	<i>3.6.1. Síntese.....</i>	44
	<i>3.6.2. Estudo de religação.....</i>	44
	<i>3.6.3. Estudo cinético</i>	45
3.7.	<i>Síntese das nanopartículas magnéticas</i>	45
3.8.	<i>Síntese do Mag-MIP/ Mag-NIP</i>	46
	<i>3.8.1 Síntese</i>	46
	<i>3.8.2 Estudo de religação do Mag-MIP1 e Mag-MIP2.....</i>	48
	<i>3.8.3 Estudo cinético do Mag-MIP1 e Mag-MIP2.....</i>	49
	<i>3.8.4 Isotermas de adsorção do Mag-MIP1 e Mag-MIP2</i>	49
	<i>3.8.5 Estudo de seletividade</i>	49
3.9	<i>Aplicação do Mag-MIP1 e Mag-MIP2 em amostras de leite bovino.....</i>	50
	<i>3.9.1 Preparo e contaminação da amostra para avaliação da adsorção em leite bovino ...</i>	50
	<i>3.9.2 Dessorção em amostras de leite bovino</i>	5050
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	5252
4.1	<i>Simulação Computacional.....</i>	52
4.2.	<i>Método cromatográfico</i>	54

4.3.	<i>Avaliação da eficiência do MIP 1:4:32</i>	55
4.3.1	<i>Estudo de religação</i>	55
4.3.2	<i>Estudo cinético</i>	55
4.3.3	Estudo da influência do pH do meio	56
4.3.4	<i>Isoterma de adsorção</i>	58
4.4.	<i>Avaliação da eficiência do MIP 1:4:200</i>	59
4.1.1	Estudo de religação.....	59
4.1.2	Estudo cinético	61
4.5.	<i>Mag-MIP1 e Mag-MIP2</i>	61
4.5.1	Difratometria de raios x.....	62
4.5.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	66
4.5.3	Caracterizações morfológicas	70
4.5.4	Magnetometria de amostra vibrante (VSM).....	73
4.5.5	Fisissorção de N ₂ e análise com ajuste BET.....	75
4.6.	<i>Avaliação da eficiência do Mag-MIP1 e Mag-MIP2</i>	76
4.6.1	<i>Estudo de religação</i>	77
4.6.2	<i>Estudo cinético</i>	78
4.6.3	Isotermas de adsorção.....	79
4.6.4	<i>Seletividade</i>	83
4.6.5	Aplicação em amostras de leite bovino	86
5.	CONCLUSÕES	89
6.	REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças infecciosas que assolaram a população já foram descritas durante o desenvolvimento da humanidade. O primeiro relato registrado na história foi descrito pelo historiador Tucídides, por volta do ano 430 a.C., de uma peste que acometeu a população de Atenas. (1). Na Idade Média, por volta do século XII, cerca de um terço da população mundial da época foi morta devido à Peste Negra, infecção altamente contagiosa que ganhou esse nome pelo fato de o principal sintoma ser o surgimento de feridas que apresentavam secreção de cor escura. (2,3). No avançar da história, outra doença infecciosa que se destacou foi a sífilis, que teve seu primeiro diagnóstico nos anos de 1494 e 1495 e matou milhões de pessoas. (4)

Desde os primeiros registros históricos da humanidade até o século XVII, as doenças eram associadas a algum tipo de desequilíbrio do homem com a natureza, ou ligadas à religião, como forma de castigo dos deuses para com a desobediência de seu povo. Entretanto, em 1665, o cientista Robert Hooke desenvolveu o primeiro microscópio óptico, no qual foi possível observar pequenas unidades na forma de “caixas ou células” em um pedaço de cortiça. Com o passar do tempo, Hooke melhorou seu invento e conseguiu visualizar de forma separada cada célula. A descoberta de Hooke assinalou a origem da teoria celular, a qual afirmou que “todas as coisas vivas são formadas por células”. (5)

Em 1673, Antonie van Leeuwenhoek, mercador holandês e cientista amador, projetou um novo microscópio, no qual foi possível observar pela primeira vez um microrganismo. Entre 1673 e 1723, ele escreveu uma série de cartas para a *Royal Society of London* relatando suas observações, que ele nomeou como “animálculos”. (6) Van Leeuwenhoek fez desenhos minuciosos de “animálculos” do material raspado de seus dentes, de suas próprias fezes e água da chuva. No entanto, apenas em 1828 o termo *Bacterium* foi introduzido pelo microbiologista alemão Christian Gottfried Ehrenberg. O gênero *Bacterium* concebia bactérias com formato de bastão não formadoras de esporos. (7,8)

Louis Pasteur, cientista francês, desenvolveu em 1860 uma série de experimentos utilizando caldo de carne com a finalidade de comprovar a existência dos microrganismos no ar, os quais poderiam contaminar soluções estéreis, mostrando assim, que o ar por si só não teria a capacidade de criação de micróbios. (5,9)

O trabalho de Pasteur foi decisivo e evidenciou que os microrganismos não podem se originar das forças místicas existentes em materiais não vivos. Ele mostrou que os microrganismos podem estar presentes na matéria não viva, em sólidos, líquidos e no ar.

Também comprovou que o calor extinguiu a vida microbiana, baseando assim técnicas de assepsia que são utilizadas de forma rotineira em indústrias alimentícias e procedimentos médicos-laboratoriais até nos dias atuais. (5,9)

No ano de 1876, um jovem médico alemão conhecido como Robert Koch, o qual era rival de Pasteur na corrida para o descobrimento da causa da doença de antraz, realizou vários experimentos utilizando sangue de gado, que foram capazes de isolar a bactéria *Bacillus anthracis* causadora do antraz. Deste modo, Koch estabeleceu uma série de etapas experimentais para a correlação de uma determinada infecção com um microrganismo específico. Esses passos foram chamados de “postulados de Koch”, e ainda são utilizados como critério de avaliação e seleção. (5,10,11)

Embora já tivesse sido descoberto na segunda metade do século XIX que as bactérias eram as causadoras de inúmeras doenças, ainda não existia um método efetivo para o seu combate. No entanto, dois médicos realizaram estudos de grande relevância para o combate de doenças infecciosas, os bacteriologistas Paul Ehrlich e Alexander Fleming. Ehrlich observou uma afinidade de determinados corantes por alguns tipos de células bacterianas, animais e humanas. Com isso, ele apontou a ideia da possibilidade de criar substâncias químicas que seriam capazes de agir de forma seletiva às células bacterianas, sem que afetassem o hospedeiro, o que ele chamou de “bala mágica”. Deste modo, Ehrlich e seus colaboradores sintetizaram uma droga organoarsênica para o combate da sífilis. Esta droga foi chamada de arsfenamina e a empresa Hoechst realizou a sua comercialização até o final de 1910 sob o nome de Salvarsan. (5,12–15).

Alexander Fleming observou, em 1928, o aparecimento de um bolor azul em algumas áreas específicas de uma placa de Petri, onde era cultivava *Staphylococcus aureus*, o qual apresentava a capacidade de inibir o crescimento das colônias bacterianas na área que ele circundava. Esse mecanismo de inibição observado entre colônias em meios de cultura sólida é denominado de antibiose, o que deu origem ao termo antibiótico, que é uma substância produzida por um certo tipo de microrganismo que, em baixas quantidades, tem a capacidade de inibir a ação de outros microrganismos. O bolor observado por Fleming foi identificado como o fungo *Penicillium notatum*, e seu composto ativo foi isolado e chamado de penicilina. (5,12,14,16,17)

Os trabalhos de Paul Ehrlich e Alexander Fleming foram de extrema importância e abriram novas perspectivas no desenvolvimento de antibióticos para o combate de doenças infecciosas. Atualmente, existem diversas classes de antibióticos, sendo que são classificados de acordo com a estrutura química e o mecanismo de ação contra a bactéria. As principais classes

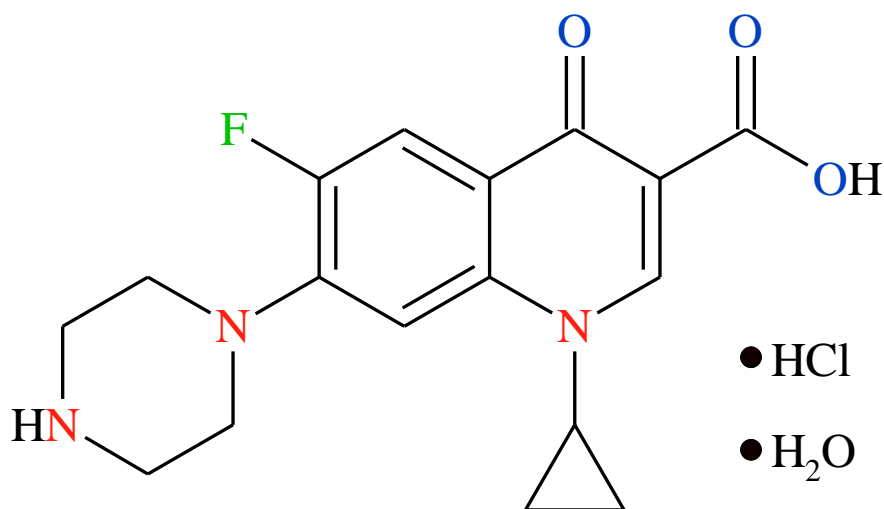
de antibióticos são: aminoglicosídeos, macrolídeos, anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos e quinolonas. (5,14,18)

Uma classe de antibióticos sintéticos que possui extremo destaque pelo seu amplo espectro de ação é a classe das quinolonas. A molécula que deu origem a essa classe foi o ácido nalidíxico, que foi isolada em 1962 por George Lesher como um subproduto da síntese de cloroquina, originando a primeira geração de compostos da classe das quinolonas. A introdução do ácido nalidíxico, em meados do ano de 1962, no tratamento de doenças infecciosas do trato urinário não apresentou grande sucesso devido a sua alta toxicidade, baixo espectro de ação e baixa eficiência de tratamento. (19,20)

Com isso, houve uma série de pesquisas com a finalidade de diminuir a toxicidade, aumentar a eficiência e o espectro de ação do ácido nalidíxico. A primeira mudança foi a inserção de um anel piperizídico na posição C6, formando assim o ácido pipemídico, o que melhorou a eficácia da droga. No entanto, o grande avanço no desenvolvimento de medicamentos à base do ácido nalidíxico foi a inserção de um átomo de flúor na posição C7, formando assim a norfloxacin. Com isso, houve um aumento significativo no espectro de ação em bactérias gram-negativas e gram-positivas. Desta forma, surgiu a segunda geração de quinolonas, nomeadas como fluoroquinolonas. Esta descoberta foi realizada por Hiroshi Koga e colaboradores em 1977, no Kyorin Companhia no Japão e patenteada em 1978. (21–23)

Em 1981, três anos após o patenteamento da norfloxacin, foi sintetizada pelo laboratório da Bayer AG mais um composto da segunda geração de quinolonas, a ciprofloxacina, cuja estrutura é mostrada na Figura 1, com nome comercial CIPRO® e código Bay 09867, a qual foi patenteada sob o número EP-B-0 049 355 e registrada na data de 21.08.1981. (24–26)

Figura 1 – Estrutura molecular da ciprofloxacina.



Fonte: Próprio autor.

A ciprofloxacina, cujo nome IUPAC é ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazinil-1-quinolina-3-carboxílico, possui um sal na forma de cloridrato, sendo um pó branco solúvel em água, com massa molecular de $385,82 \text{ g mol}^{-1}$. O composto apresenta dois valores de pKa, o primeiro valor é 6,3, sendo referente à desprotonação do grupo carboxílico (pKa_1), enquanto que o segundo (pKa_2) no valor de 8,9 é referente à desprotonação do nitrogênio do anel piperizídico. (27)

No que se refere a seu espectro de ação, a ciprofloxacina é fortemente ativa contra a maioria dos cocos gram-positivos, também é ativa contra bacilos aeróbicos gram-negativos e possui ação moderada contra micoplasma, clamídia, ureplasma e algumas micobactérias. (21,22,26)

A ciprofloxacina tem sua ação sobre duas enzimas topoisomerases essenciais na replicação do DNA bacteriano, a DNA-girase e a topoisomerase IV, as quais apresentam estruturas semelhantes, porém com funções distintas. A DNA-girase atua em conjunto com a proteína ω , uma topoisomerase de tipo I, no estabelecimento da densidade super-hélica do cromossomo bacteriano. Além do mais, a girase tem o papel principal na remoção do estresse torsional que se concentra na frente dos complexos de transcrição e dos garfos de replicação. A topoisomerase IV apresenta a função de remoção de nós que se acumulam no cromossomo bacteriano após processos celulares básicos, além de separar a fita molde da nova fita de DNA formada após a replicação. (5,21,28–30)

Devido ao vasto espectro de ação, a ciprofloxacina é administrada no tratamento de doenças infecciosas de animais e humanos. Nos animais é aplicada como recurso terapêutico

para doenças do trato gastrointestinal e respiratório de gado de corte, utilizado contra a mastite em gado de leite e na avicultura no tratamento de infecções dérmicas. (31–34)

Nos seres humanos é aplicada no combate de infecções do trato urinário (35–37), trato gastrointestinal (38–40) e trato respiratório (41–43).

Diante do grande espectro de ação e do seu efeito rápido sobre a infecção, a ciprofloxacina, comumente, é prescrita pelos médicos como uma forma extremamente eficaz. Contudo, há estudos que indicam alguns problemas causados em pacientes que foram administrados com ciprofloxacina.

Hipoteticamente, a ciprofloxacina não tem ação sobre as células humanas, devido à baixa homologia entre as enzimas girase e topoisomerase. No entanto, existem estudos que mostram que a ciprofloxacina tem efeitos sobre a homeostase dos fibroblastos presentes no tendão. Outro efeito é que a ciprofloxacina tem ação quelante em contato com alguns metais, como Mg^{2+} , Al^{2+} e Ca^{2+} ; afetando assim a síntese de colágeno, promovendo a degradação da cartilagem. Essas observações foram evidenciadas com alguns estudos realizados utilizando animais de laboratório e células de fibroblastos cultivadas *in vitro*. (44–46)

Outro problema causado pela ciprofloxacina em humanos é a neuropatia periférica, doença que causa a destruição do nervo periférico, o qual transporta o impulso nervoso do cérebro e medula espinhal para os membros do corpo. O antibiótico atua sobre os receptores $GABA_A$, inibindo-o de mediar o transporte de um dos principais neurotransmissores do cérebro, o ácido aminobutírico. O que desencadeia diversos sintomas, como fraqueza, dor, sensação de ardência, mudança na sensação de toque e calor, dificuldade de locomoção, perda de massa muscular que, geralmente, afeta braços e pernas, podendo ser irreversíveis. (47–50)

É observado também que a ciprofloxacina pode causar danos hepáticos nos indivíduos em que foi administrada. O mecanismo de lesão ainda é desconhecido, porém é observada a indução de necrose hepatocelular pelo uso de ciprofloxacina. Esse dano pode ocasionar prejuízos na execução da função hepática, além de, em casos extremos, ocasionar cirrose ou hepatite. (51–54)

Além dos problemas listados acima, a ciprofloxacina apresenta uma alta permanência no meio ambiente, o que pode acarretar o surgimento de cepas de bactérias resistentes ou superbactérias. (55–57) Desta maneira, o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle dos resíduos de ciprofloxacina dispersos no meio ambiente é de suma importância, pois permite monitorar os níveis de resíduos deste antibiótico, precavendo assim todos os malefícios que o mesmo pode causar. (58)

Na Europa, os países membros da União Europeia possuem um órgão responsável específico para monitoramento de resíduos de substâncias químicas em diferentes matrizes. Dentro deste órgão, há um programa comum de monitoramento de resíduos químicos realizado por todos os países da União Europeia, a *European Environment Agency* (Agência Ambiental Européia). Este programa realizou a estipulação de limites máximos aceitáveis (LMR) de ciprofloxacina em diferentes amostras de alimentos, os LMR's por quilograma de amostra: $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para músculo de suínos, bovinos e aves, $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fígado suíno e de aves, $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fígado de bovinos e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para leite de bovinos, ovinos e caprinos. (59)

No Brasil, existem dois programas nacionais que monitoram a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal. O primeiro é o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), o qual pertence à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que analisa leite e derivados. O segundo é o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual inclui programas setoriais para análise de carne, leite, ovos, mel e pescado. Desta maneira o Limite de Resíduos Máximo permitido para a ciprofloxacina em músculo e leite de bovinos é de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e em músculo e ovos de galinha em $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$. (60)

Atualmente existem diversas metodologias relatadas na literatura para a identificação e quantificação de ciprofloxacina em matrizes. Uma técnica analítica bastante empregada é a cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês "*High performance liquid chromatography*" – (HPLC), pois por meio desta se possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia validada para a determinação de ciprofloxacina em formulações farmacêuticas, alimentícias e em meio biológico, como urina e plasma sanguíneo. Desta maneira o cromatógrafo pode ser acoplado a diferentes tipos de detectores baseados em métodos espectroscópicos.

O acoplamento do cromatógrafo a um detector de ultravioleta-visível (UV-Vis) consiste em uma alternativa viável para a detecção e quantificação de ciprofloxacina. Diante desta conjuntura Vella e colaboradores (61) desenvolveram uma metodologia rápida para a determinação de ciprofloxacina em plasma sanguíneo humano. Os autores obtiveram valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação de (LQ) de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Também foi avaliado o percentual de recuperação de ciprofloxacina em amostras de plasma sanguíneo humano, obtendo valores médios próximos a 95%. Assim foi concluído por Vella e colaboradores (61) que a metodologia desenvolvida é de simples execução, rápido tempo de análise e alta relação custo-benefício, pois o tempo total para de análise é de 5 min e o gasto de amostra para a análise é de apenas $400 \mu\text{L}$.

Devido à ciprofloxacina apresentar em sua estrutura dois anéis aromáticos conjugados, é possível realizar sua detecção e quantificação utilizando a espectroscopia de fluorescência. Desta forma, é acoplado ao cromatógrafo um detector de fluorescência. (62,63)

He e Blaney (64) descrevem uma metodologia para determinação e quantificação de diferentes fluoroquinolonas, incluindo a ciprofloxacina, em amostras de água e esgoto coletadas de uma estação de tratamento, utilizando como técnica de detecção a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fluorescência. Foi utilizado como fase móvel um gradiente com tempo de eluição de 0 a 33 min, onde há uma variação entre a porcentagem de metanol, acetonitrila e solução aquosa de ácido ortofosfórico $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado com trietilamina a pH 2,4. Foi selecionado como comprimento de onda de excitação/emissão os valores 270/450 nm.

A ciprofloxacina apresentou um tempo de retenção de 12 min em uma proporção de eluição de 15/10/85% de acetonitrila/metanol/ solução aquosa de ácido ortofosfórico $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,4. Foram calculados os valores de LQ para as diferentes fluoroquinolonas avaliadas, a ciprofloxacina exibiu um valor de $1,5 \text{ ng L}^{-1}$. O estudo foi realizado a partir da coleta de amostras de água e esgoto em diferentes dias. Sendo assim foram encontrados valores equivalentes a 600 a 1292 ng L^{-1} e 8,9 a 102 ng L^{-1} de ciprofloxacina respectivamente. (64)

Outra técnica utilizada para detecção de ciprofloxacina é a eletroforese capilar (EC) (65–67), a qual é baseada na separação de diferentes compostos por meio da aplicação de um campo elétrico em um capilar, o qual é preenchido com um eletrólito adequado a depender da amostra. A detecção das moléculas separadas é realizada por meio de um detector, usualmente com leitura na faixa do UV-Vis, o qual é acoplado na extremidade oposta do capilar onde a amostra foi inserida. (68–70)

XU e colaboradores (71) descrevem em seu trabalho a utilização de EC para a determinação de enrofloxacin e ciprofloxacina em amostras de leite bovino, leite em pó, carne de frango, carne suína, rins e fígado suínos. Os autores avaliaram diferentes parâmetros para o desenvolvimento desta metodologia; como eletrólito adequado, pH ótimo para a análise, ação do uso de γ -ciclodextrinas (γ -CD), concentração de desoxicolato de sódio (NaDC), efeito da tensão elétrica aplicada e tempo de injeção das amostras.

A metodologia desenvolvida apresentou duas condições para a análise de enrofloxacin e ciprofloxacina. Uma primeira composição (A) constituída de tampão Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ e NaDC $0,080 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,8 e tempo de injeção de 300 s. A segunda composição (B) foi constituída de tampão Tris-HCl $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ e NaDC $0,120 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,8 e tempo de injeção de 240 s. A matriz de amostra onde é

realizado a injeção da amostra foi preparada em meio de tampão Tris-HCl $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e γ -CD $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10,0, foi aplicado uma voltagem para a migração das moléculas de 15 kV e realizado a detecção utilizando um detector espectrofotométrico Uv-Vis no comprimento de onda de 270 nm.

Desta maneira foram calculados o LQ nos dois compostos nos dois meios otimizados, sendo que a ciprofloxacina apresentou valores de LQ de $7,39 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,87 \text{ ng mL}^{-1}$ para as condições A e B respectivamente. Pode-se observar valores de percentual de recuperação de 95% para todas as amostras avaliadas pelo método desenvolvido por XU e colaboradores. (71)

Há estudos que mostram que imunoensaio enzimático, do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”, pode ser utilizado como método para a determinação de ciprofloxacina em diferentes matrizes. (72,73) Este método baseia-se na detecção de anticorpos específicos a uma determinada substância imunogênica. (74,75)

Por meio do trabalho de Duane e Yuan (76), pode-se observar o desenvolvimento de um imunoensaio enzimático competitivo indireto, com a finalidade de detectar e quantificar a presença de ciprofloxacina em amostras de leite bovino, carne suína e carne de frango.

Os autores realizaram uma conjugação da ciprofloxacina com soro albumina humana (CPFEX – HSA) e soro albumina bovina (CPFEX – BSA). Esses conjugados permitiram a produção de antissoro de coelho específico a ciprofloxacina. Uma placa de microtubulação foi revestida com CPFEX – HSA em meio de tampão carbonato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,6, a 4°C overnight. Em seguida as placas foram lavadas conforme descrito no trabalho, foram adicionadas diferentes concentrações de ciprofloxacina e a placa foi deixada sobre incubação por 2 h, posteriormente foi realizado outro procedimento de lavagem e adicionado o CPFEX – BSA na proporção 1:1000, após esta etapa a placa sobre agitação a 200 rpm por 2 h a 37°C . (76)

Os autores do trabalho relatam que o método apresentou um LD $0,32 \text{ ng mL}^{-1}$ mostrando assim altamente sensível. Também pode-se observar que a metodologia proposta exibiu valores de percentual de recuperação de 75,58%, 81,29% e 84,30%, para as amostras de carne suína, carne de frango e leite bovino, respectivamente. (76)

Há também descrito na literatura a utilização sensores e biossensores eletroquímicos para a detecção e quantificação de ciprofloxacina em diferentes tipos de amostras, de maneira diminuir o tempo necessário para a realização das análises. Há diferentes superfícies utilizadas como transdutor físico-químico, as quais podem ser modificadas com diversas formas de fase sensora, como por exemplo, polímeros, nanomateriais e material biológico, no caso dos biossensores. (77–82)

Syazana e Minhaz (83) descrevem o desenvolvimento de um dispositivo de fácil utilização para a determinação de ciprofloxacina em amostras de soro sanguíneo e urina de humanos. Os autores descrevem a modificação da superfície de um eletrodo impresso de grafite modificado com óxido de grafeno com uma fita dupla de DNA. Em seguida é colocado em contato a ciprofloxacina por 2 min para a interação e então é realizada a medida utilizando voltametria de onda quadrada (VOQ) em tampão acetado $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4, no intervalo de potencial de 0,0 a 1,6 V, amplitude de pulso de 0,04 V, incremento de pulso de varredura $0,0015 \text{ V}$ e frequência de pulso de 25 s^{-1} . (83) Segundo os autores a detecção da ciprofloxacina foi possível, devido a interação eletrostática existente entre a ciprofloxacina e os grupos fosfatos presentes na cadeia de DNA. O dispositivo desenvolvido apresentou valores de percentual de recuperação para as amostras de soro sanguíneo e urina de 84,3% e 107,8% respectivamente. (83)

Porém, essas metodologias apresentam altos custos de obtenção de equipamentos e de manutenção, elevado tempo de preparo de amostras e instabilidade física e química dos modificantes, no caso dos biossensores, assim não sendo possível a aplicação direta em algumas amostras.

Desta maneira, uma alternativa simples, com baixo custo de preparo, estabilidade química, mecânica e térmica, e que podem ser usados para extração do analito da amostra ou como elemento reconhecedor de um sensor são os polímeros molecularmente impressos (“*molecularly imprinted polymer*” - MIP).

Estes foram desenvolvidos por Arshady e colaboradores (84) e têm como princípio a interação da molécula molde com um polímero, mimetizando a interação do tipo antígeno-anticorpo. Estes materiais podem ser empregados na extração, detecção e quantificação de diversos compostos de interesse industrial e ambiental.

Em geral, os MIP são obtidos por polimerização radicalar na presença de uma molécula molde a ser impressa (*template*), a qual interage com monômeros funcionais em sítios específicos do *template*. Então, é adicionado um monômero estrutural, de tal forma que um esqueleto polimérico seja formado ao redor do complexo *template*-monômero funcional ou de uma molécula com estrutura análoga, (84). 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 ao 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. (85)

O MIP tem como objetivo mimetizar a interação que ocorre em sistemas biológicos, desta forma um dos parâmetros que deve ser avaliado é tipo de interação que ocorrerá entre o *template* e o monômero funcional empregado, pois a intensidade desta interação determinará se o método de impressão molecular ocorrerá de forma covalente, não-covalente ou semi-covalente. (86,87)

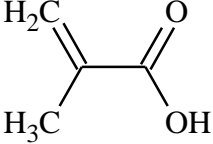
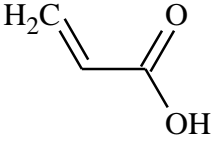
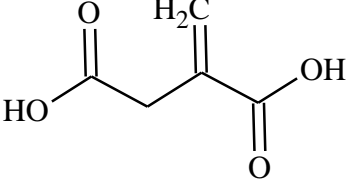
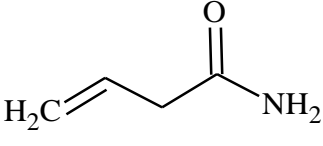
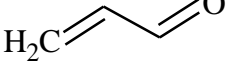
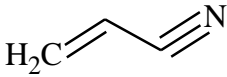
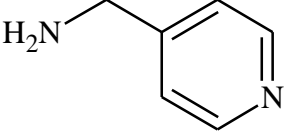
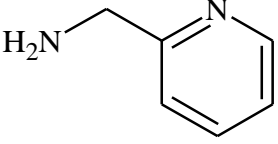
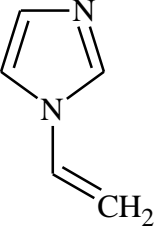
Na impressão covalente, a energia de ligação entre o *template* e o monômero funcional é intensa, de tal forma que há uma ligação covalente entre os componentes na formação do complexo *template*-monômero funcional, assim gerando cavidades mais uniformes e seletivas ao *template*. Entretanto é necessária a realização de uma clivagem química para a remoção do *template* da cavidade formada; outro fator negativo na impressão covalente é a restrição do uso, pois poucos são os *templates* e os monômeros funcionais que apresentam ligação do tipo covalente. (86,87)

Na impressão não covalente a energia de ligação entre *template* e monômeros funcionais não é tão intensa em comparação com a impressão covalente. Desta forma, podem ocorrer diferentes tipos de interações intermoleculares, das quais podem ser destacadas: ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou do tipo dipolo-dipolo. Este tipo de impressão tem sido majoritariamente utilizado no desenvolvimento de MIP, pois apresenta vantagens como simples preparação do material, fácil eluição do *template* da estrutura polimérica e apresenta uma gama de possibilidades de uso de diferentes monômeros funcionais. (86,87)

Na impressão semi-covalente, há uma mescla das duas formas anteriormente expostas, pois inicialmente há a formação da ligação covalente no processo de síntese polimérica e, após a retirada da *template* da cavidade, a interação entre o analito e o monômero funcional ocorre de forma não-covalente. (86,87)

Assim, a escolha do monômero funcional empregado para a síntese do MIP, depende das características que o *template* dispõe, estas podem ser: propriedades ácido-base, por exemplo, um *template* que possui natureza ácida terá maior interação com monômeros funcionais que possuem características básicas, ou, um *template* com caráter básico apresentará maior afinidade por monômeros funcionais que dispõe de características ácidas. Outra característica que pode ser ressaltada é a polaridade do *template* e do monômero funcional empregado. Na Tabela 1 são dispostos os principais monômeros funcionais empregados na síntese de MIP. (86,87)

Tabela 1 - Principais monômeros funcionais empregados na síntese de polímeros molecularmente impressos.

Monômero funcional	Nome do monômero	Tipo de interação	Função
	ácido metacrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio	Ácido
	ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio	Ácido
	ácido metilenosuccínico	Interação iônica e ligação de hidrogênio	Ácido
	acrilamida	Ligação de hidrogênio	Neutro
	acroleína	Interação iônica	Neutro
	acrilonitrila	Interação iônica	Neutro
	4-vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais.	Básico
	1-vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais.	Básico
	1-vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais.	Básico

Fonte: (86,87).

A interação *template*-monômero funcional é governada por um processo em equilíbrio, desta maneira são adicionadas quantidades superiores do monômero em relação ao *template*, habitualmente 4:1, com intuito de deslocar o equilíbrio favorecendo a formação do *template*-monômero funcional. (86,87)

Em linhas gerais, há descrito na literatura três metodologias distintas para a síntese dos MIP, sendo elas “*bulk*”, suspensão e precipitação. Independente do método empregado, o meio deve ser desoxigenado com um gás inerte, comumente argônio ou nitrogênio, pois o oxigênio impede que a reação radicalar ocorra. O radical formado é proveniente da quebra do iniciador radicalar, que é induzido pela incidência de energia, que pode ser proveniente de luz ultravioleta ou aquecimento. (86)

No método em “*bulk*” a síntese ocorre de forma homogênea em um recipiente, no qual são adicionados o *template*, o monômero funcional, o monômero estrutural, o solvente e o iniciador radicalar. O meio é então desoxigenado e selado. Por este método há a formação de uma pasta polimérica rígida, devido à formação das ligações cruzadas referentes à radicalização entre as moléculas de monômero estrutural. Os MIP sintetizados por “*bulk*” são empregados em diferentes processos de análise, contudo por estes formarem um material rígido, é necessário triturar o polímero. Com isso pode ocorrer a clivagem de parte dos sítios de reconhecimento específicos a molécula molde, além de produzir partículas não-uniformes. (86,87)

A síntese realizada pelo método de suspensão é realizada de maneira análoga ao método em “*bulk*”, porém são empregados dois solventes com polaridades opostas. Em uma primeira etapa todos os componentes necessários para a formação do MIP (*template*, monômero funcional, monômero estrutural e iniciador radicalar) são solubilizados em um solvente orgânico apolar. Em seguida, a mistura reacional é adicionada em um segundo solvente que apresente característica polar e um agente surfactante é acrescentado, com a função de evitar a coagulação dos monômeros adicionados durante o processo. O MIP sintetizado por este método apresenta uniformidade no tamanho das partículas sintetizadas. No entanto, um fator limitante é a solubilidade dos componentes da síntese em solventes apolares, pois há vários compostos que são solúveis somente em solventes polares. (86–88)

A síntese do MIP pelo método de precipitação também é realizada de forma análoga ao método em “*bulk*”, contudo são adicionados volumes de solvente superiores, cerca de cinco vezes mais, evitando desta maneira a formação de uma pasta polimérica. Este método tem como vantagem em comparação com os demais a facilidade em sua execução, não necessitando do uso de dois solventes com características opostas e o uso de surfactante, e a formação de partículas

com tamanhos uniformes e homogeneidade na disposição dos sítios de ligação específicos ao template utilizado.

Os polímeros impressos podem ser empregados na extração, detecção e quantificação de diversos compostos de interesse industrial e ambiental, como fármacos, corantes alimentícios, pesticidas, entre outros. (89–92).

Com o avanço da ciência, houve o desenvolvimento dos nanomateriais, os quais podem ser definidos como matérias que possuem estrutura em escala nanométrica, de 1 a 100 nm, e apresentam características diferentes destes materiais em escalas superiores. Alguns exemplos de nanomateriais que são amplamente utilizados no uso acadêmico e industrial são os nanotubos de carbono, nanofios de magnéticos e as nanopartículas metálicas. (93)

Em relação ao uso de nanopartículas metálicas associadas à síntese e aplicação de MIP tem-se em destaque o desenvolvimento de MIP magnético, os quais são sintetizados pelo método *core-shell*, ou seja, possui um núcleo metálico (*core*) que é revestido com uma camada polimérica em sua superfície (*shell*). (94)

Dos diversos materiais que podem ser utilizados como núcleo metálico, podemos destacar as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4) por apresentarem características superparamagnéticas, alta estabilidade e baixa toxicidade. (95)

A síntese de nanopartículas de magnetita de óxido de ferro pode ser realizada de variadas maneiras, sendo os métodos mais comumente reportados na literatura a sonificação (96), o hidrotérmico (97), o poliol (98) e a coprecipitação (99). Esta última é uma das sínteses abundantemente utilizadas, devido a sua fácil executabilidade e simples preparo. Neste método, habitualmente, são utilizados sais de cloreto de ferro (II) e ferro (III) que precipitam em meio alcalino formando a magnetita (Fe_3O_4). (99)

Entre as diversas vantagens exibidas por essas partículas, as suas características superficiais são as mais notáveis, permitindo sua fácil encapsulação e modificação para protegê-las da degradação, conservando sua propriedade magnética. As modificações realizadas sobre estas nanopartículas incluem desde simples funcionalizações de diferentes grupos em sua superfície, até a adesão moléculas orgânicas, polímeros e elementos biológicos.

Para a síntese de MIP magnético, utilizando como núcleo a magnetita, é então realizada a cobertura das nanopartículas com uma substância silicada, dando a ela um caráter vítreo, que, em seguida, é sinalizada com compostos vinílicos, os quais contêm duplas ligações entre carbonos que são sítios de reações radicalares. Desta forma, é possível a formação de uma camada de polímero com impressão molecular na superfície da partícula magnética (*shell*), obtendo-se, assim, o MIP magnético, que combina as melhores características de ambos os materiais, aliando

a especificidade das cavidades impressas no MIP com a propriedade magnética da magnetita, o que facilita no processo de extração do material do seio da amostra.

Outra característica que deve ser ressaltada é que há um favorecimento na exposição das cavidades seletivas formadas na polimerização, uma vez que a síntese da cadeia polimérica no MIP magnético ocorre de forma superficial sobre as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. (100–103)

Devido às características presentes no MIP magnético, pode-se destacar diferentes formas de aplicação em medidas analíticas. Ele é utilizado principalmente em extrações em fase sólida, do inglês “*Solid-phase extraction*” - (SPE) uma vez que pode ser aplicado diretamente na amostra, não necessitando assim a ocorrência de etapa de tratamento prévio. Além disso, o material pode ser facilmente separado do meio analisado pela aplicação de um campo magnético externo, por exemplo, um ímã de neodímio. Desta forma, este material pode ser empregado na substituição dos cartuchos comumente utilizados em SPE, os quais necessitam de um trabalho de empacotamento e ativação das partículas poliméricas. (104)

Foram desenvolvidos diversos tipos de MIP magnético para análises de matrizes complexas de diferentes contaminantes, como corantes (105–108), antibióticos (109–111), pesticidas (112–115), dentre outros, tendo como método de análise a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*” – (HPLC).

Outra maneira descrita na literatura sobre a aplicação do MIP magnético é a sua utilização como fase de reconhecimento em sistemas eletroquímicos (116), pois o MIP-magnético favorece a adsorção de forma seletiva do analito avaliado, e a característica magnética do material possibilita a pré-concentração do composto na interface eletrodo solução, quando é utilizado eletrodos que possuem um ímã de neodímio em seu interior. Assim alguns trabalhos na literatura descrevem o uso dos MIP-magnético para análises eletroquímicas em várias matrizes complexas. (117–120)

Há descrito na literatura diversas maneiras de síntese de MIP e MIP-magnético para a ciprofloxacina, com a finalidade de aplicação em diferentes matrizes e detecção por diferentes métodos. (85,121–125) No entanto, os trabalhos referentes ao desenvolvimento de um polímero impresso específico a ciprofloxacina, utilizando em sua constituição apenas um monômero funcional (ácido acrílico ou ácido metacrílico), o qual, como já foi exposto anteriormente, é responsável pela interação com o analito. Assim, a presente dissertação tem como objetivo a avaliação da viabilidade do emprego de dois monómeros funcionais distintos na síntese de MIP para aplicação em amostras de leite bovino.

2. OBJETIVOS

Síntese, caracterização e otimização de polímeros molecularmente impressos ligados a nanopartículas magnéticas para a interação específica do antibiótico ciprofloxacina, avaliando o desempenho dos MIP magnéticos sintetizados com um e dois monômeros funcionais em sua estrutura, para posterior aplicação destes materiais na determinação do teor do analito em amostras de leite bovino.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados para a síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich®), NH_4OH (Synth®), tetraetilortossilicato - TEOS (Sigma-Aldrich®), metacriloxipropil trimetoxissilano (MPS) (Sigma-Aldrich®), e etanol e tolueno, ambos fornecidos pela Synth®.

Os reagentes utilizados na síntese dos polímeros foram; cloridrato de ciprofloxacina, ácido acrílico, 1-vinil-imidazol, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN), todos fornecidos pela Sigma-Aldrich®. Como solvente porogênico foi utilizado acetonitrila (Panreac®). Os solventes utilizados na remoção da molécula molde foram metanol (Panreac®) e ácido acético glacial (Synth®).

Para as experimentos de seletividade foram utilizadas soluções de norfloxacina, ofloxacina e levofloxacina, ácido ascórbico e paracetamol, todos fornecidos pela Sigma-Aldrich®.

Para todos os experimentos de avaliação da eficiência dos materiais sintetizados foram utilizados tubos Eppendorf® de 2 mL e homogeneizador mecânico.

Para a realização da pesagem de todos os reagentes e polímeros utilizados foi utilizada uma balança analítica Modelo AUW-220D – SHIMADZU® com precisão 0,00001g.

Empregou-se um pHmetro da marca Digital Gehaka® modelo PG 2000 para a obtenção das medidas de pH e bomba a vácuo é da EIKONAL® (Modelo 131/132).

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV/vis da Agilent Technologies® modelo Cary 60; o software usado para as medidas foi o ScanCaryWinUV®. Para as medidas em solução utilizou-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, na faixa de comprimentos de onda no intervalo de 200 a 800 nm.

Os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho foram de grau analítico ou HPLC. Todas as soluções que necessitaram de água empregou-se o sistema Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore® para a obtenção de água ultrapura.

3.2 Método cromatográfico

A partir do trabalho de Perine e colaboradores (126), foi adaptado um método cromatográfico, utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu®, o qual possui os seguintes componentes: detector UV-Vis (modelo SPD-20A), auto-amostrador (modelo SIL-20A), bomba (modelo LC-20AT) e interface (modelo CBM-20A). Para isso, foi utilizando uma coluna Zorbax SB-C₁₈ da Agilent® nas dimensões 150 mm X 2,4 mm, vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura ambiente, comprimento de onda de absorção de 280 nm e fase móvel constituída por 85% de uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e 15% de acetonitrila em modo isocrático. Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica (P.A).

Uma curva analítica foi construída a fim de avaliar o tempo de retenção da ciprofloxacina no intervalo de concentração de 1,00 a 200 µmol L⁻¹. As soluções foram filtradas em filtros de celulose regenerada (RC) com diâmetro de poro de 0,45 µm e volume de injeção de 20 µL.

3.3. Instrumentação

3.3.1. Caracterizações físicas

Com o intuito de avaliar as características físicas dos materiais sintetizados realizou-se uma série de caracterizações físicas.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos empregando um espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy* - FTIR) - VERTEX 70 da BRUKER®. Para coleta dos espectros foram realizadas 64 varreduras entre o intervalo 4000 a 400 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos pela técnica de reflectância total atenuada (ATR), utilizando cristal de diamante.

A morfologia dos polímeros foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura com campo de emissão (FEG-MEV), marca JEOL®, modelo JSM-7500F operando em voltagem de 300 kV, com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3. Os polímeros foram sonicados em álcool isopropílico por 10 min e recobertos com carbono para posterior análise no microscópio.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada pelo equipamento da marca Phillips CM 200®, operando a 200 kV, filamento de LaB₆. As amostras foram preparadas em

grades de cobre (TED PELLA®, ultrathin C type A, 400 mesh). Os polímeros foram dispersos em isopropanol e mantidos em ultrassom por 10 minutos para sua redispersão. Gotejou-se 2 μL da suspensão na grade de cobre, que foi seca à temperatura ambiente para a realização da análise.

Utilizando o software Image J foi possível a realização da contagem e medição do tamanho das nanopartículas magnéticas e do Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2; bem como a construção de curva de distribuição do tamanho do material, calculada utilizando a Equação de distribuição LogNormal, empregando o software Origin 8.

A análise de difratometria de raios X (DRX) foi realizada com as amostras em pó, e utilizou-se um difratômetro da marca Rigaku®, modelo Rint 2000, ânodo rotatório de Cu, modo de varredura contínuo, detector PSD D/Tex, foram analisados espectros de difração de raios X pelo método de Debye-Scherrer, com velocidade de passo $2,0^\circ \text{ s}^{-1}$ em $2\theta_i = 6^\circ$ a $2\theta_f = 80^\circ$.

O estudo de porosidade dos materiais em função da temperatura foi realizado por meio de estudos de adsorção de N_2 e realizado o ajuste matemático BET, sigla que deriva das iniciais dos nomes dos criadores da técnica, Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett e Edward Teller (127). Para a realização de tal experimento foi utilizado um equipamento ASAP 2010 da Micromeritics®. As amostras foram submetidas a gás hélio à temperatura de 100°C e vácuo de aproximadamente 1 mmHg por um período de 60 min para limpeza da superfície. As medidas foram realizadas na temperatura de 77 K, usando o método volumétrico estático, intervalo de pressão relativa entre 0.001 e 0.72, o tamanho dos poros foi calculado pelo método Barrett-Joyner-Halenda (do inglês BJH Method).

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

3.4 Simulação computacional

Segundo protocolo usado pelo grupo de pesquisa (128) para a escolha dos monômeros funcionais foram empregados os seguintes programas para a simulação computacional, a qual foi realizada em vácuo:

- HyperChem® 8.0.5: utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIP.

- Pacote de softwares OpenEye® contendo os programas:

- 1) VIDA 3.0.0: utilizado na visualização das moléculas a serem modeladas para conferir possíveis erros de ligações entre átomos.

- 2) Omega2: para gerar os confôrmeros das moléculas, o que torna possível levar em consideração os impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados dez confôrmeros da molécula molde, sendo escolhidos três aleatórios para realizar os testes simulatórios.

- 3) Szybki 1.2.2: programa que leva a molécula até seu estado de menor energia, ou seja, o mais estável.

- AutoIt 3.3.6.0: aplicativo que utiliza linhas de comandos (scripts) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos.

- Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital PACKage) 2009: utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será empregada como molde, calculando a energia liberada, o que resulta na afinidade entre os mesmos. MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semiempírica para os cálculos de aproximação.

Para a simulação da ciprofloxacina, foram avaliados 20 monômeros funcionais, mostrados na Tabela 2, os quais foram nomeados de MP1 a MP20 com a finalidade de simplificar a análise dos resultados.

Tabela 2 - Monômeros avaliados na simulação computacional para a síntese de MIP.

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

Fonte: (128)

3.5 Síntese do MIP proporção 1:4:32

3.5.1 Síntese

Baseando-se nos dados obtidos pela simulação computacional (item 3.1), juntamente com o trabalho de Marestoni e colaboradores (90), um MIP para a ciprofloxacina foi sintetizado pelo método de precipitação. Para isso, 0,1 mmol de ciprofloxacina (analito) foi diluído em uma solução de acetonitrila/água 70:30 (v/v) em um balão de fundo redondo, juntamente com

0,4 mmol de ácido acrílico (monômero funcional). A mistura foi deixada em repouso por 3 h para favorecer a interação entre o analito e o monômero funcional. Posteriormente, foi adicionado 3,2 mmol de EGDMA (etileno glicol dimetacrilado) à mistura, a qual foi purgada com N₂ para completa desoxigenação por 30 min. Em seguida, foi adicionado 80 mg de 2,2'-azobis (2-metilpropionitrilo) (AIBN), que é utilizado como iniciador radicalar, propiciando assim a reação de polimerização. Finalmente, o balão foi acondicionado em banho maria a uma temperatura de 60 °C por 12 h. Concomitantemente a síntese do MIP, um polímero controle (*non imprinted Polymer* - NIP) foi sintetizado da mesma maneira, exceto pela não adição da ciprofloxacina.

Após formação do polímero, o mesmo foi submetido à filtração a vácuo empregando um filtro de celulose. Em seguida, os polímeros foram secos em dessecador por 12 h e lavados em um sistema de extração Soxhlet por 8 (oito) dias. Nos três primeiros dias a lavagem foi realizada com 100 mL de solução de metanol/ácido acético 70:30 (v/v) e nos cinco dias subsequentes com 100 mL de metanol, para a total remoção do analito das cavidades seletivas do MIP e do excesso de reagentes da síntese. As soluções de lavagem foram trocadas e analisadas empregando-se um espectrômetro Agilent Cary 60, no intervalo de comprimento de onda de 800 a 200 nm a cada 12 h.

Depois de lavados, os polímeros foram secos por 24 h em dessecador sob vácuo, desta forma estando pronto para o uso.

3.5.2 Estudo de religação

O primeiro experimento executado para avaliar o desempenho do MIP foi a variação de massa de polímero. Para isso, foram pesados em diferentes tubos Eppendorf quantidades de MIP/NIP de 1,0; 2,0; 5,0; 10 e 20 mg, dispersos em 1,0 mL de uma solução de ciprofloxacina de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de água/acetonitrila 10:90 (v/v) (padrão). Em seguida, os tubos foram submetidos a agitação, empregando um homogeneizador de amostra por um tempo de interação de 2 h e centrifugados por 30 min a uma velocidade de rotação de 15.000 rpm. O sobrenadante de cada tubo foi filtrado com filtro de seringa de celulose regenerada (RC) de 25 μm de diâmetro de poro e, finalmente, a solução foi analisada em CLAE/UV-Vis.

Para o cálculo da porcentagem de retenção (% Ret), foi empregada a Equação 1; na qual foi calculada a diferença dos valores de área de uma solução padrão (A_{r_p}) de ciprofloxacina na concentração 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e da solução remanescente após a interação com os polímeros (A_{r_s}).

$$\% \text{ Retenção} = \left(\frac{Ar_p - Ar_s}{Ar_p} \right) \times 100 \quad (1)$$

3.5.3 Estudo de cinético

Para o ensaio cinético, foram adicionados em diferentes tubos Eppendorf 10 mg de MIP/NIP, os quais foram dispersos em 1,0 mL de uma solução de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de água/acetonitrila 10:90 (v:v). Em seguida, os tubos foram agitados em um homogeneizador de amostra com diferentes tempos de interação: 2; 5; 10; 15; 30; 60; 90; 120; 180; 240 e 300 min. Posteriormente, os tubos foram submetidos à centrifugação por 30 min a uma velocidade de rotação de 15.000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa de RC (de $25 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro e analisado em um CLAE/UV-Vis.

3.5.4 Efeito do pH do meio

O ensaio consistiu em avaliar o efeito do pH na interação do analito com as cavidades do polímero impresso. Para isso, 10 mg dos polímeros foram dispersos em uma solução aquosa de ciprofloxacina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, cujo o pH foi ajustado para os seguintes valores: 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0, com tempo de interação de 2 h. Em seguida, foram executados os mesmos procedimentos como descrito nos experimentos anteriores: centrifugação, filtragem e análise por CLAE/UV-Vis.

3.5.5 Isotermas de adsorção

As curvas isotermas de adsorção foram realizadas com a finalidade de avaliar o desempenho do MIP em diferentes concentrações do analito. O procedimento dessa etapa foi realizado da mesma maneira que os experimentos descritos anteriormente. No entanto, nesse caso, a massa de polímero foi fixada em 10 mg e a concentração de ciprofloxacina foi variada, sendo avaliados os seguintes valores: 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ preparada em solução aquosa a pH 6,5 com 2 h de interação.

Para construir a curva de isoterma foi realizado o cálculo do valor de Q (Equação 2), o qual relaciona a massa (em mg) de analito que ficou retido a uma determinada massa (em g) de polímero. Concomitantemente, foi avaliado o desempenho de religação do analito às cavidades

seletivas em dois diferentes solventes: água com pH ajustado a 5,0 e água/acetonitrila 10:90 (v/v).

$$Q = \left[\left(\frac{C_i - C_e}{m_{pol}} \right) \times V \right] \quad (2)$$

Onde C_i é a concentração inicial do analito, C_e a concentração remanescente no equilíbrio (ambas as concentrações em mg L^{-1}), V é o volume de solução adicionada (em litro) e m_{pol} representa a quantidade (em grama) de material adsorvente (MIP/NIP)

3.6 Síntese do MIP proporção 1:4:200

3.6.1. Síntese

Foi realizada uma síntese do MIP para ciprofloxacina, com uma maior quantidade monômero estrutural (EGDMA), de forma que o material apresente a seguinte proporção entre molécula molde, monômera funcional e monômera estrutural - 1:4:200. O NIP também foi sintetizado da mesma maneira, exceto pela adição da ciprofloxacina.

Este novo material foi sintetizado da mesma forma como descrito no item (3.3.1), porém foi adicionada uma massa maior de EGDMA, sendo este valor de 20 mmol.

Este polímero necessitou de um tempo maior para a remoção do analito das cavidades do MIP. Em um sistema de extração Soxhlet, nos quatro primeiros dias a lavagem foi realizada com 100 mL de solução de metanol/ácido acético 70:30 (v/v) e nos onze dias subsequentes com 100 mL de metanol, totalizando assim 15 dias o processo de lavagem. Assim como na síntese anterior, as soluções de lavagem foram trocadas e analisadas a cada 12 h.

Depois de lavados, os polímeros foram secos por 24 h em dessecador sob vácuo, desta forma estando pronto para o uso.

3.6.2. Estudo de religação

Inicialmente foi realizado o ensaio da massa, que foi executado nas mesmas condições do ensaio realizado no item 3.3.2. Também foi realizado, a fim de comparação, um segundo ensaio

de massa da mesma forma que o estudo relatado anteriormente, no entanto em meio aquoso a pH 5.

3.6.3. Estudo cinético

Este estudo foi realizado em meio aquoso a pH 5, nas mesmas condições do estudo cinético realizado no item 3.3.3, com o intuito de avaliar o tempo ótimo para uma maior retenção da ciprofloxacina sobre o material proposto.

3.7. Síntese das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas por meio do método da co-precipitação.
(129)

Para isso, foram adicionados a um béquer 1,72 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 4,72 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dissolvidos em 5 mL de HCl concentrado e 80 mL de H_2O deionizada, com agitação mecânica à temperatura de 60 °C e em de atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, foi adicionado, gota a gota, 10 mL de NH_4OH concentrado usando uma pipeta Pasteur. O pH da mistura reacional foi mantido em 9,0 e a reação foi efetuada a 60 °C por 30 minutos. Após a reação ter sido finalizada, a magnetita (Fe_3O_4) foi formada (*core*). Então o precipitado foi separado do sobrenadante utilizando um ímã de neodímio e, finalmente, filtrado e lavado com água até atingir pH 7 e seco em dessecador sob vácuo por 12 h.

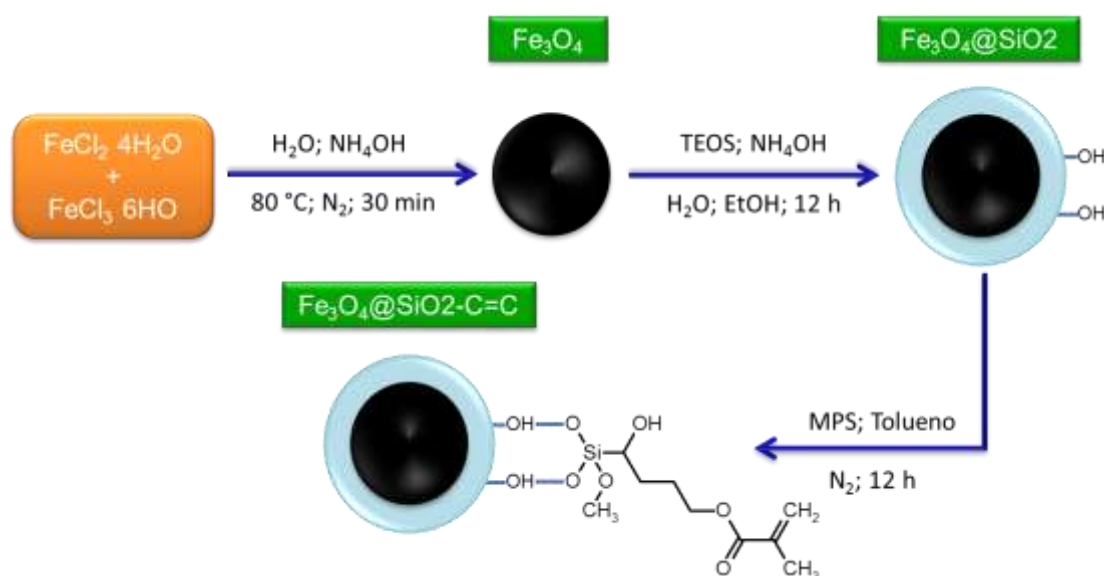
Em seguida, visando preparar o material magnético para a futura modificação com o MIP, as nanopartículas magnéticas foram modificadas por meio do processo sol-gel com TEOS (ortoliscato de tetraetilo). Este procedimento permitiu o recobrimento da nanopartícula magnética com grupos silanos, formando uma superfície vítrea sobre o material magnético para posterior silanização. Para isso, foi pesado 300 mg de Fe_3O_4 , que foi disperso em 4 mL de etanol absoluto e 4 mL de H_2O deionizada, e sonicado por 30 min. Em seguida, 5 mL de NH_4OH concentrado e 2 mL de TEOS foram adicionados a suspensão de magnetita, deixando reagir por 12 h à temperatura ambiente sob agitação mecânica constante, formando assim $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$. Finalmente, o produto obtido foi lavado e filtrado com água ultrapura, e seco em dessecador sob vácuo por 12 h.

Na etapa subsequente, a silanização da magnetita-TEOS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$) foi realizada com material contendo grupo funcional metacrílicos na superfície da magnetita, com a finalidade de

realizar a posterior polimerização do MIP sobre a superfície das nanopartículas modificadas. Neste caso, a porção metacrílica atua como um agente reticulante (co-polímero) para a polimerização do MIP. Para isto, foram pesados 250 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, que foram dispersos em 5 mL de tolueno, seguido da adição de 5 mL de MPS (3-(Trimetoxisil)propil methacrilato). A reação foi executada por 12 h sob agitação mecânica constante e fluxo de N_2 . Por fim, o material silanizado, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$, foi filtrado e lavado com etanol, seco em dessecador sob vácuo por 12 h.

O procedimento de síntese e modificação das nanopartículas magnéticas estão esquematizados na Figura 2.

Figura 2 – Síntese, modificação e sinalização das nanopartículas magnéticas.



Fonte: Próprio autor.

3.8. Síntese do Mag-MIP/ Mag-NIP

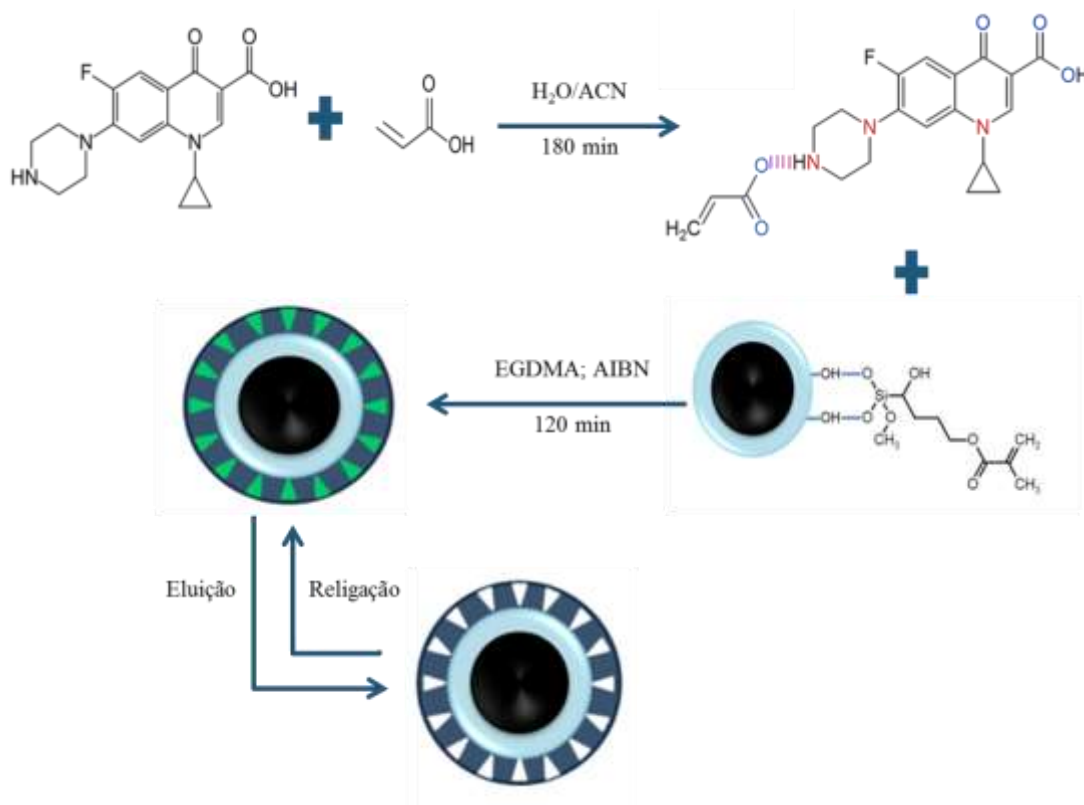
3.8.1 Síntese

Foram realizadas duas diferentes sínteses do Mag-MIP, ambas empregando o método de precipitação.

No primeiro material sintetizado foi utilizado apenas um monômero funcional (Mag-MIP1). Para isto, em um balão de fundo redondo de 150 mL foram adicionados 0,1 mmol de ciprofloxacina e 0,4 mmol de ácido acrílico, os quais foram solubilizados com 100 mL de água/acetonitrila 30:70 (v/v). A solução ficou em repouso por 3 h para interação entre os grupos

funcionais da ciprofloxacina (analito) e do ácido acrílico (monômero funcional). A seguir, foram adicionados 250 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$, sob agitação constante de N_2 por 60 min. Após este tempo, foram adicionados 20 mmol de EGDMA, mantendo assim a proporção 1:4:200, que também servirá como agente reticulante, junto com a porção funcional do silano ligado à magnetita. Em seguida, foram adicionados 80 mg de AIBN usado como iniciador radicalar. A reação foi conduzida por 3 h em meio desareado sob agitação de N_2 em banho maria a $60\text{ }^\circ\text{C}$. Ao final do processo, o material foi filtrado e seco em um dessecador sob vácuo. Um Mag-NIP1 foi sintetizado da mesma maneira, exceto pela adição da ciprofloxacina. O esquema da síntese desse material é apresentado na Figura 3.

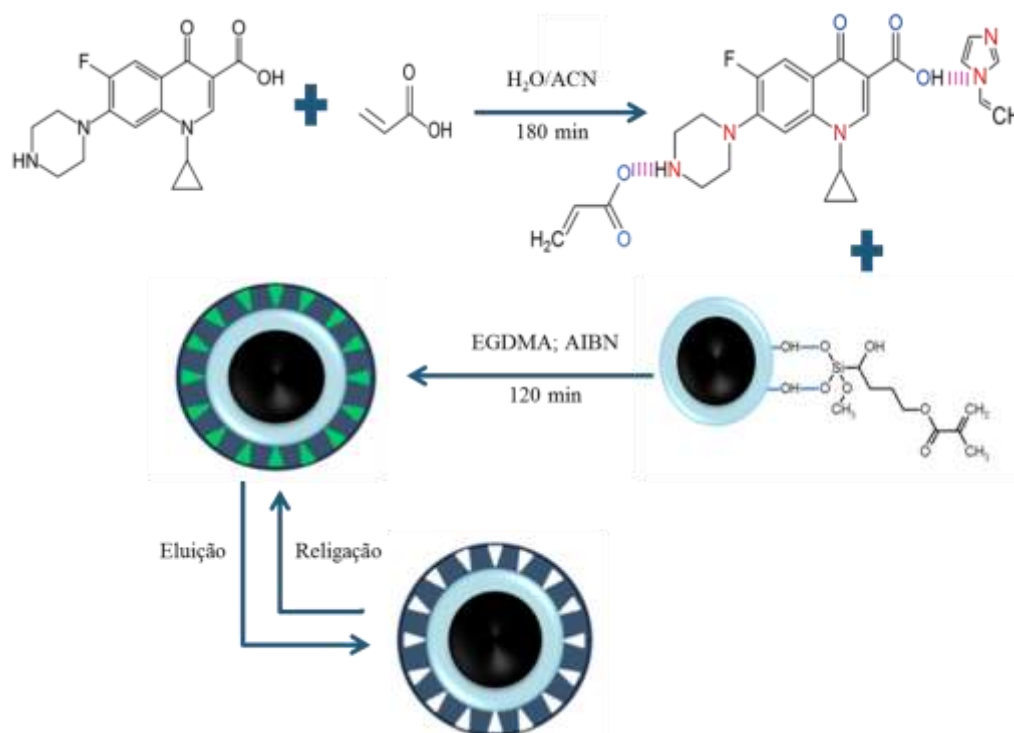
Figura 3 – Síntese do Mag-MIP1, usando um monômero funcional (ácido acrílico).



Fonte: Próprio autor.

O segundo material foi sintetizado utilizando dois monômeros funcionais (Mag-MIP2). Este foi desenvolvido usando o mesmo procedimento do Mag-MIP1, porém foi adicionado 2,00 mmol de ácido acrílico e 2,00 mmol de 1-vinilimidazol como monômeros funcionais. O esquema da síntese desse material é apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Síntese do Mag-MIP2, usando dois monômeros funcionais (ácido acrílico e 1-vinilimidazol)



Fonte: Próprio autor.

O processo de limpeza foi o mesmo tanto para o Mag-MIP1 e quanto para o Mag-MIP2. Eles foram lavados em um sistema de extração Soxhlet, sendo que nos cinco primeiros dias a lavagem foi realizada com 100 mL de solução de metanol/ácido acético 70:30 (v/v) e nos dez dias subsequentes com 100 mL de metanol, totalizando assim 15 dias o processo de lavagem para a total remoção do analito das cavidades seletivas do MIP e do excesso de reagentes da síntese. As soluções de lavagem foram trocadas a cada 12 h e analisadas empregando um espectrômetro UV/VIS.

Depois de lavados, os polímeros foram secos por 24 h em um dessecador sob vácuo, desta forma estando pronto para o uso.

3.8.2 Estudo de religação do Mag-MIP1 e Mag-MIP2

O ensaio da massa para o Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2 foi realizado nas mesmas condições do ensaio realizado no item 3.5.2.

3.8.3 Estudo cinético do Mag-MIP1 e Mag-MIP2

A definição do tempo de interação entre o analito e os polímeros Mag-MIP1/Mag-NIP1 foi realizado em meio aquoso, nas mesmas condições descritas no item 3.5.3.

De maneira semelhante foi realizado o estudo cinético para o Mag-MIP2/Mag-NIP2, porém estes foram dispersos em 1,0 mL de uma solução de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de água/metanol 70:30 (v:v).

3.8.4 Isotermas de adsorção do Mag-MIP1 e Mag-MIP2

As isotermas de adsorção foram construídas da mesma forma que os experimentos descritos no item 3.5.5. No entanto, nesse caso a massa de polímero foi fixada em 5 mg e a concentração de ciprofloxacina foi variada: 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0; 100,0; 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com 120 min de interação para Mag-MIP1/ Mag-NIP1 e 30 min para Mag-MIP2/Mag-NIP2. Foram realizados os cálculos do valor de Q, expresso na Equação 2, para avaliar o desempenho de religação da ciprofloxacina sobre o Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2.

3.8.5 Estudo de seletividade

Para avaliação da seletividade dos polímeros, foi analisada a adsorção de diferentes compostos, como outras fluoroquinolonas (norfloxacina, ofloxacina e levofloxacina) e compostos de classes diferentes: ácido ascórbico e paracetamol.

Para esta etapa, foi pesado em diferentes tubos Eppendorf a quantidade de 5,0 mg de Mag-MIP1/ Mag-NIP1, que foi disperso em 1,0 mL de uma solução aquosa dos compostos listados acima a uma concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os tubos foram agitados com um homogeneizador por um período de 120 min.

De maneira semelhante, foi realizado o estudo de seletividade para o Mag-MIP2/ Mag-NIP2. No entanto, estes foram dispersos em 1,0 mL de uma solução dos compostos listados acima a uma concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de água/metanol 70:30 (v:v), com tempo de interação de 30 min.

Após o tempo de interação, os polímeros foram separados do sobrenadante com aplicação de um campo magnético, por um ímã de neodímio, e as soluções filtradas em filtro de RC 0,45 μm de diâmetro de poro e levadas para análise por CLAE/UV-Vis.

3.9 Aplicação do Mag-MIP1 e Mag-MIP2 em amostras de leite bovino

3.9.1 Preparo e contaminação da amostra para avaliação da adsorção em leite bovino

Foram realizados experimentos utilizando os materiais sintetizados como fase extratora em pelo método de extração dispersiva em fase sólida. Amostras de leite bovino integral e desnatado foram comprados no comércio local. 500 mL de cada leite foi colocado em um béquer de 1000 mL e adicionado 5 mL de MeOH e, então, a mistura foi sonicada por 10 min. Em seguida, 1,5 mL desta mistura foi centrifugada por 30 min a uma velocidade de 15.000 rpm, para a separação dos lipídeos e proteínas presentes no leite, separando assim a fase líquida da fase sólida do leite. (130)

Posteriormente, foram coletados 250 μL do sobrenadante e diluídos com água em um balão de 50 mL, na presença de ciprofloxacina, preparando assim soluções de ciprofloxacina nas concentrações de 5,0; 10,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as análises realizadas com o Mag-MIP1/ Mag-NIP1.

Em seguida, foram pesados 5 mg do Mag-MIP1/Mag-NIP1 em tubos Eppendorf® e dispersos em 1,00 mL das soluções previamente preparadas descritas acima. As amostras foram colocadas em um homogeneizador mecânico, sob um tempo de interação de 120 min. Então, os polímeros foram separados com aplicação de um campo magnético usando um ímã de neodímio, as soluções filtradas em filtro de RC 0,45 μm de diâmetro de poro e levadas para análise por CLAE/UV-Vis.

Para as análises realizadas com o Mag-MIP2/Mag-NIP2, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, porém as soluções utilizadas para o estudo foram diluídas em uma mistura H₂O/MeOH 70:30 (v/v) e deixadas por um tempo de interação de 30 min.

3.9.2 Dessorção em amostras de leite bovino

Após o procedimento descrito no item 3.9.1, os materiais foram secos em estufa a 80 °C por 60 min. Posteriormente, estes foram dispersos em 1,0 mL de H₂O por um tempo de 60 min e

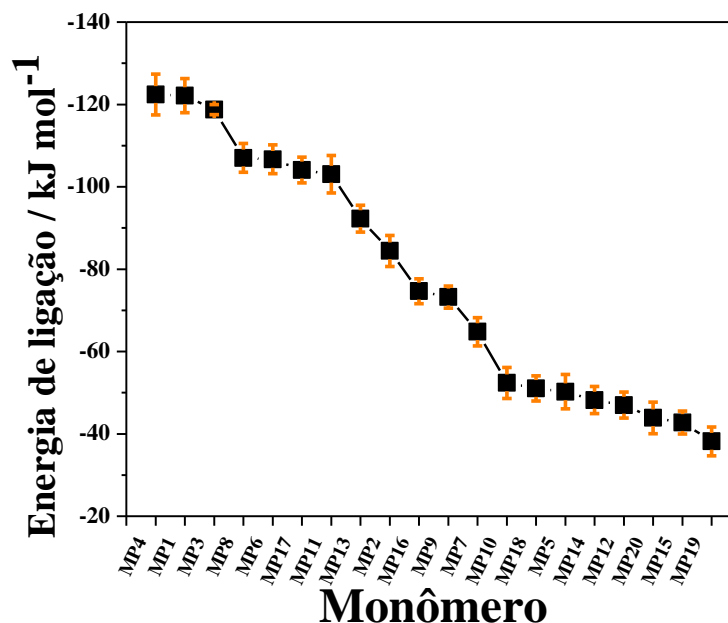
separados com aplicação de um campo magnético, por um ímã de neodímio, foi utilizado água como solvente extrator devido a ciprofloxacina utilizada ser na forma de cloridrato, sendo mais solúvel em água, Este processo foi repetido por uma segunda vez, para a remoção da ciprofloxacina adsorvida das cavidades do Mag-MIP. Ambas as soluções foram misturadas e filtradas em filtro de RC 0,45 μm de diâmetro de poro e levadas para análise por CLAE/UV-Vis

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Simulação Computacional

A simulação computacional (128) foi empregada com o propósito de investigar a variação da energia de ligação da ciprofloxacina com 20 (vinte) diferentes monômeros funcionais (86). A finalidade dessa análise foi avaliar os monômeros que apresentam maior afinidade com a ciprofloxacina e, desta forma, escolher o monômero funcional mais apropriado para a síntese do MIP e do Mag-MIP. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos a partir da simulação computacional.

Figura 5 – Resultado da simulação computacional semi-empírica da energia livre de associação para interação dos vinte monômeros com Ciprofloxacina.



Fonte: Próprio autor.

Os valores de energia podem ser compreendidos como a energia liberada pela aproximação entre a ciprofloxacina e cada um dos monômeros. Desta forma, quanto maior a energia liberada, maior a afinidade entre os dois compostos, indicando, assim, o monômero que poderá conferir maior seletividade ao MIP. (90,128)

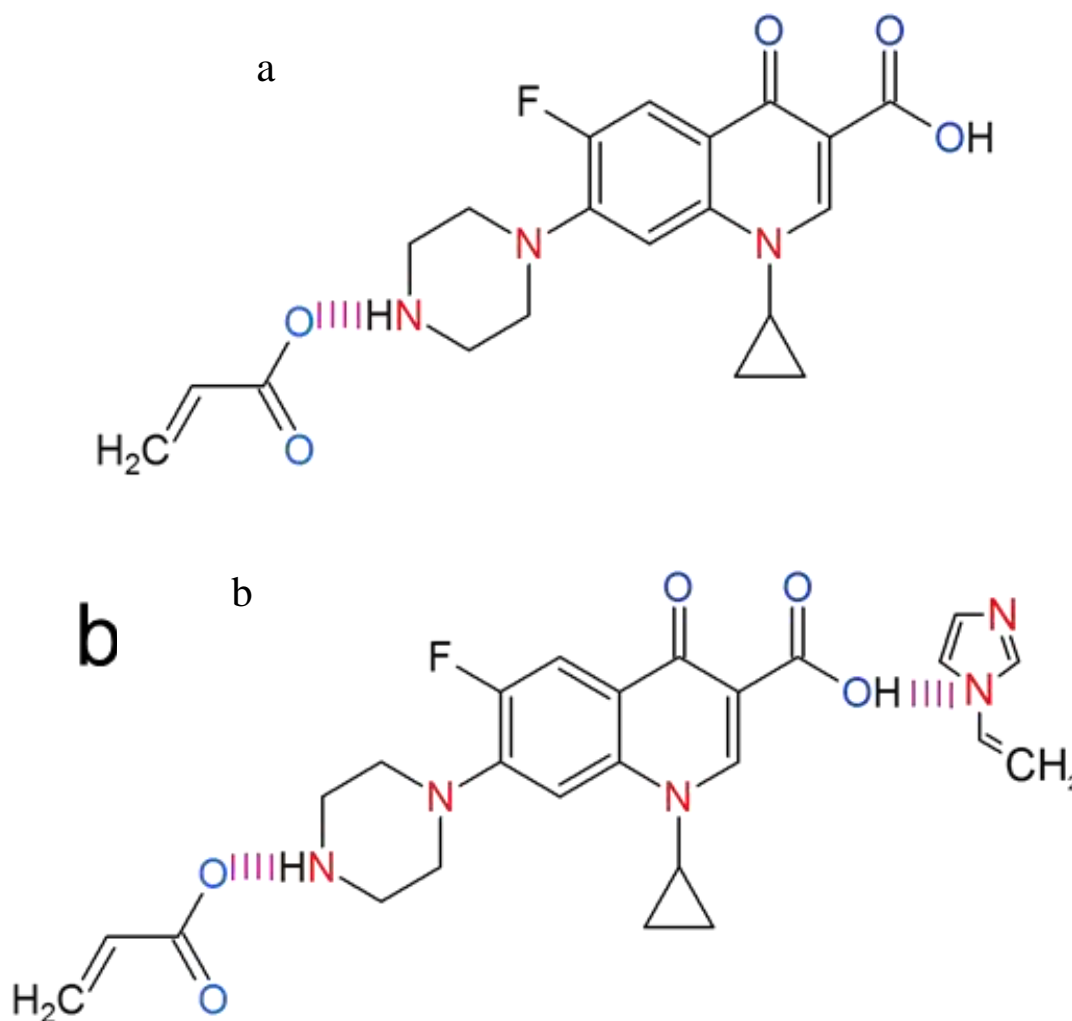
Analisando a Figura 5 foi observado que o ácido acrílico (MP4) foi o monômero que apresentou o maior valor de energia de ligação (-122,43 KJ mol⁻¹). O caráter ácido deste

composto pode propiciar a interação com a extremidade básica da ciprofloxacina, localizada no anel piperizpidico (Figura 6).

Diante disso, este monômero foi escolhido para ser empregado na síntese dos MIP/NIP e do Mag-MIP1/Mag-NIP1.

A fim de avaliar a melhor na seletividade e a retenção do Mag-MIP para a ciprofloxacina, também foi avaliado o emprego de um monômero de caráter básico com o intuito de interagir com o grupo carboxílico do analito. Baseado no resultado obtido pela simulação computacional, observou-se que o monômero 1-vinilimidazol (MP16) apresentou um valor de energia de ligação $-74,65 \text{ KJ mol}^{-1}$. Desta forma, o Mag-MIP2/Mag-NIP 2 foi sintetizado utilizando os monômeros ácido acrílico e 1-vinilimidazol em concentrações equimolares.

Figura 6 – Interação da ciprofloxacina com o ácido acrílico (MP18) (a) e com o ácido acrílico (MP18) e 1-vinilimidazol (MP16) (b).

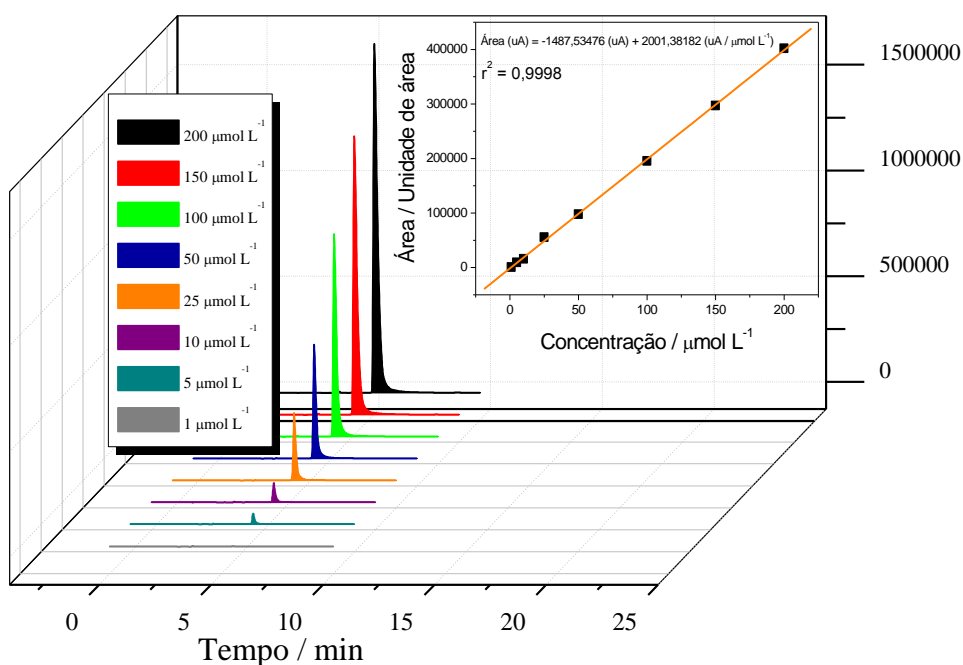


Fonte: Próprio autor.

4.2. Método cromatográfico

Com a finalidade de avaliar a eficiência de adsorção dos diferentes polímeros sintetizados foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector Uv-Vis, para tal foi construída uma curva analítica como descrito no item 3.2, a qual pode ser observada na Figura 7.

Figura 7 – Curva analítica ciprofloxacina em CLAE/UV-Vis, em meio aquoso, comprimento de onda de 280 nm, vazão de 1 mL min⁻¹, fase móvel 83% de uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e 17% de acetonitrila. Insert: curva analítica e equação da reta.



Fonte: Próprio autor.

Foi observado que a ciprofloxacina possui um tempo de retenção de 5,2 min e uma faixa linear de aumento de sinal pela concentração da solução padrão de 1 a 200 µmol L⁻¹. A curva analítica apresentou um valor de coeficiente de correlação de (r^2) de 0,9998 e valor de sensibilidade (s) 2001,38 uA (µmol L⁻¹)⁻¹.

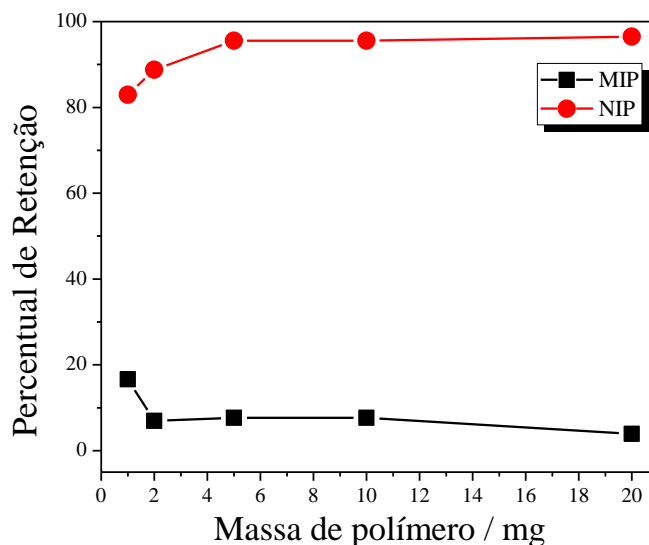
4.3. Avaliação da eficiência do MIP 1:4:32

4.3.1. Estudo de religação

Inicialmente foi realizado um ensaio de religação da ciprofloxacina em função do aumento da massa de MIP e NIP, tendo como propósito a avaliação de qual quantidade de polímero apresentará um maior %RET.

Na Figura 8 pode ser notado que não houve uma retenção satisfatória, pois o MIP apresentou valores de retenção inferiores a 10%, enquanto que no NIP obteve-se valores superiores a 90%. Esse resultado, provavelmente, é devido a uma grande quantidade de ligações inespecíficas, sugerindo que as cavidades do MIP não foram totalmente expostas na superfície do polímero ou ainda foram insuficientes e geradas em pequena quantidade.

Figura 8 – Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em função do aumento da massa polimérica. Tempo de interação de 2h, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg.



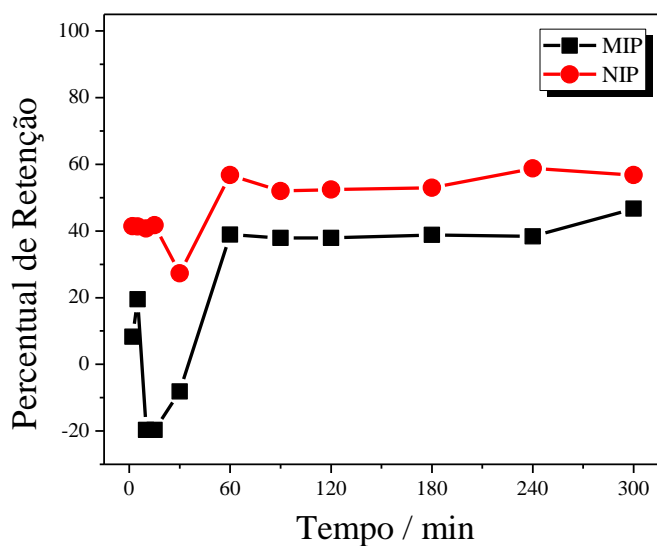
Fonte: Próprio autor.

4.3.2. Estudo cinético

Com o intuito de avaliar qual a melhor condição de trabalho com o MIP e NIP desenvolvidos foi realizado o ensaio cinético no presente material, tendo como finalidade encontrar o melhor tempo para adsorção da ciprofloxacina sobre MIP/NIP e favorecer a interação da ciprofloxacina com o MIP.

Na Figura 9 pode ser observado que, MIP e NIP apresentaram perfis cinéticos semelhantes, mostrando assim que há uma semelhança na estrutura do polímero sintetizado e na disposição dos sítios de ligação expostos pelo material. Entretanto os valores de %Ret de NIP foram superiores aos valores de %Ret de MIP, evidenciando que não está ocorrendo uma interação nas cavidades propostas pelo MIP.

Figura 9 - Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em função do aumento do tempo de interação entre o analito e o polímero. Massa de polímero de 10 mg, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, tempos avaliados 5,0 min; 10,0 min; 15,0 min; 30,0 min; 60,0 min; 90,0 min; 120,0 min; 180,0 min; 240,0 min e 300,0 min.



Fonte: Próprio autor.

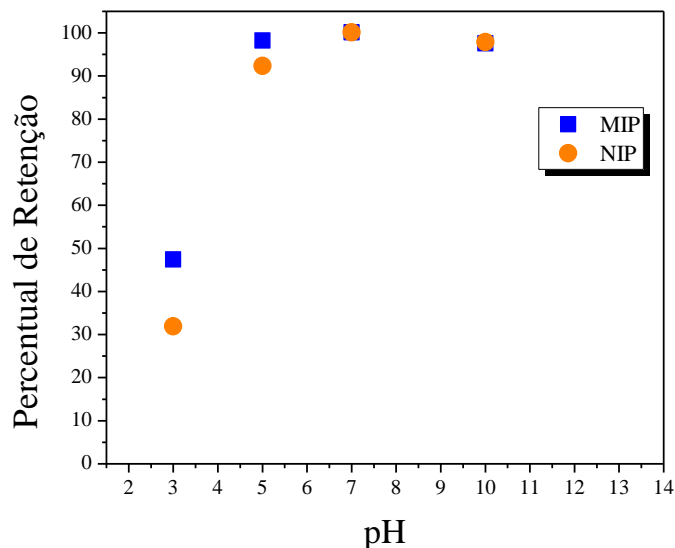
4.3.3. Estudo da influência do pH do meio

Um dos parâmetros que pode favorecer a interação do analito com o monômero funcional que está na estrutura do MIP é o pH do meio de interação, pois a protonação ou a desprotonação do analito e do monômero funcional pode favorecer a interação e, conseqüentemente, a retenção da ciprofloxacina pelo MIP.

Desta maneira, os valores de pH escolhidos para este experimento foram valores que proporcionaram a avaliação de diferentes estados de protonação tanto da ciprofloxacina como do ácido acrílico. Os valores de pH foram escolhidos a partir dos seguintes critérios: no pH 3 o valor está abaixo do pK_{a1} da ciprofloxacina (6,3) e abaixo do pK_a do ácido acrílico (4,7), dessa maneira o analito está completamente protonado, assim como o monômero funcional. No pH 5, o valor está abaixo do primeiro pK_{a1} da ciprofloxacina e acima do pK_a do ácido acrílico, nesse valor há a desprotonação do grupo carboxil do ácido acrílico, concedendo-o uma carga

negativa, porém a ciprofloxacina não atingiu o pK_{a1} , responsável pela desprotonação do grupamento carboxil da molécula, desta maneira o ácido acrílico exibe uma carga negativa, enquanto, a ciprofloxacina contém ainda um hidrogênio passível de formação de ligação de hidrogênio e um grupo piperizídico com carga positiva onde é possível a existência de uma interação eletrostática ou a formação de uma ligação de hidrogênio. Foi escolhido o pH 7, valor que está acima do primeiro pK_{a1} da ciprofloxacina e também do ácido acrílico, neste valor o ácido acrílico exibe uma carga negativa, enquanto a ciprofloxacina contém uma carga líquida nula, pois há a presença de um grupamento carboxil com carga negativa, no qual haverá uma repulsão com o ácido acrílico, porém contém o grupamento piperizídico que apresenta um átomo de hidrogênio passível de formação de ligação de hidrogênio. Já no pH 9, a solução está acima do segundo pK_{a2} da ciprofloxacina (8,74) e acima do pK_a do ácido acrílico desta forma, há a possibilidade de uma interação eletrostática entre o grupamento piperizídico da ciprofloxacina e do ácido acrílico.

Figura 10 - Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em diferentes valores de pH. Massa de polímero de 10 mg, tempo de interação de 2 h, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pH avaliado nos valores de 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0.



Fonte: Próprio autor.

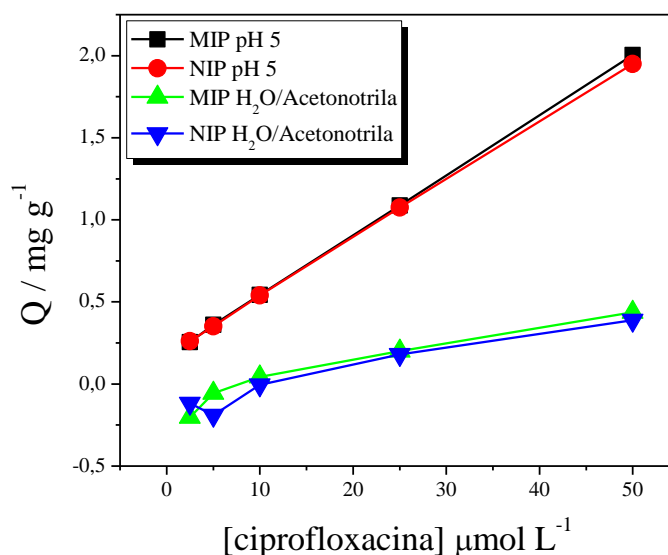
Foi observado na Figura 10 que, à medida que o valor de pH foi aumentado, o MIP apresentou maiores percentuais de retenção. Entretanto, não houve separação entre MIP e NIP. Desta maneira, foi selecionado o pH 5 nas etapas subsequentes, pois foi o que apresentou uma ligeira diferenciação entre MIP e NIP e com uma boa porcentagem de retenção.

4.3.4. Isoterma de adsorção

Para a construção das curvas de isoterma foi realizado o cálculo do valor de Q , o qual relacionada a massa (em mg) de analito com a massa (em g) de polímero, cujo resultado é apresentado na Figura 11.

Concomitantemente, foi avaliado o desempenho de religação do analito as cavidades seletivas em dois diferentes solventes: água com pH ajustado a 5,0 e água/acetonitrila 10:90 (v/v), no intervalo de concentração de ciprofloxacina de 1,0 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 11 - Isoterma de adsorção da ciprofloxacina aos polímeros em meio aquoso a pH 5, e meio orgânico 10:90 água:acetonitrila (v/v), massa de polímero de 10 mg e tempo de interação de 2 h, no intervalo de concentração de ciprofloxacina de 1,0 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

Observando a Figura 11, foi notado que não houve uma diferenciação entre MIP e NIP, tanto para a solução aquosa de ciprofloxacina em pH 5, assim como para a análise em meio orgânico 10:90 água/acetonitrila (v/v).

Os resultados insatisfatórios obtidos até então podem estar relacionados com a não formação das cavidades específicas para a ciprofloxacina no MIP, desta maneira expondo na superfície do polímero os sítios de interação do ácido acrílico (monômero funcional) favorecendo a formação de interações não específicas. Foi observado que não houve o surgimento de um platô no valor de Q a partir de valores superiores a uma determinada concentração de ciprofloxacina, indicando assim que houve uma total saturação dos sítios do material. Portanto podemos sugerir que o polímero proposto não apresentou em sua estrutura

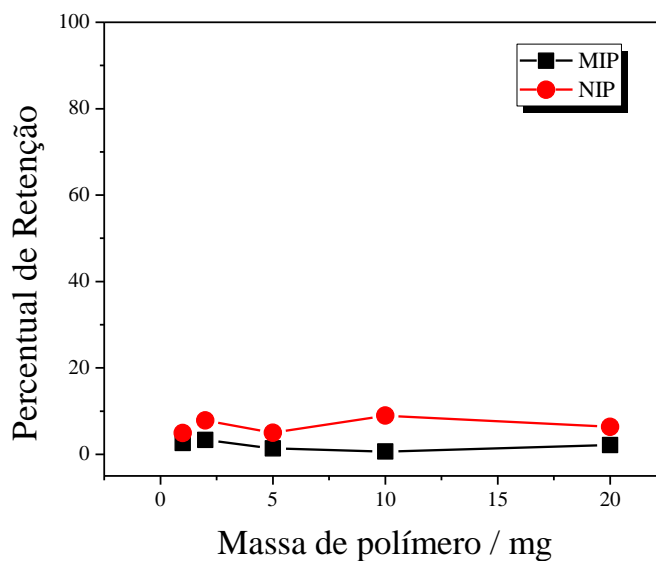
cavidades seletivas para a ciprofloxacina. Diante dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a síntese do polímero na proporção 1:4:32 não foi satisfatória para a pré-concentração da ciprofloxacina.

4.4. Avaliação da eficiência do MIP 1:4:200

4.4.1. Estudo de religação

Como os resultados dispostos no item 4.3 não foram satisfatórios, foi sintetizado um novo material, conforme descrito no item 3.4.1. O primeiro estudo realizado com esse novo polímero foi o percentual de retenção da ciprofloxacina em função da massa de adsorvente (MIP/NIP).

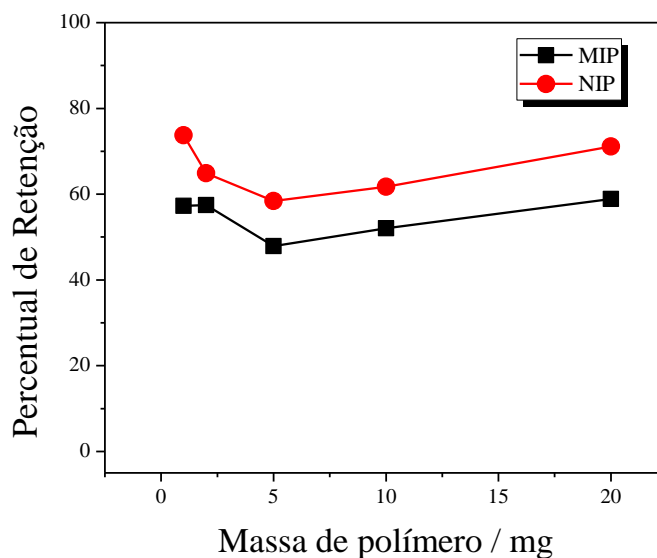
Figura 12- Percentual de retenção da ciprofloxacina aos polímeros em função da massa polimérica. Tempo de interação de 2 h, 1,0 mL de solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg.



Fonte: Próprio autor.

Como observado na Figura 12, o MIP e NIP apresentaram porcentagem de retenção semelhante, contudo os valores de retenção para MIP estão muito abaixo do esperado, pressupondo que há alguma forma de impedimento na cavidade seletiva do MIP dificultando assim a interação da ciprofloxacina na cavidade formada. Sendo assim, foi realizado esse mesmo estudo, porém a solução aquosa de ciprofloxacina foi ajustada para pH 5 com a intenção de favorecer a desprotonação do ácido acrílico.

Figura 13 - Percentual de retenção em função do aumento da massa polimérica. Tempo de interação de 2 h, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina em pH 5 na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg.



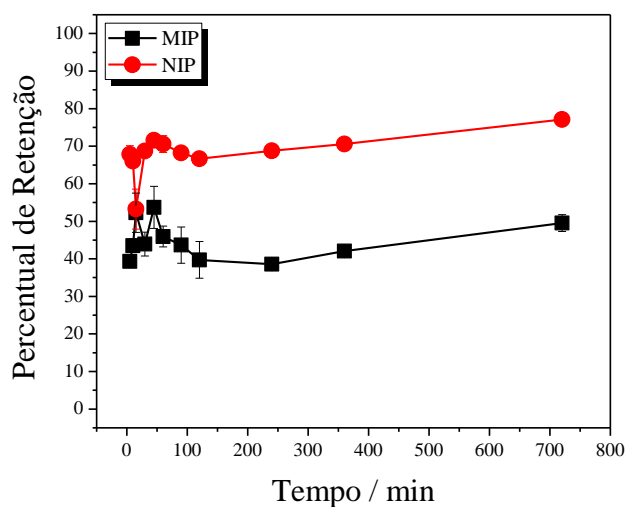
Fonte: Próprio autor

Na Figura 13 pode-se perceber que, com a mudança do meio, houve um aumento no percentual de retenção. No entanto, não houve uma diferenciação significativa entre os valores de NIP e MIP. Além disso, o valor de retenção para NIP foi maior que os obtidos para MIP, mostrando a presença de ligações inespecíficas no material sintetizado. Existem algumas maneiras de reduzir estas interações inespecíficas, dentre elas, a mudança do meio de trabalho ou pela avaliação do tempo de contato entre o analito e o MIP e NIP.

4.4.2. Estudo cinético

A fim de tentar favorecer a retenção da ciprofloxacina sobre o MIP e minorar as ligações inespecíficas do NIP, foi realizado o estudo cinético para este material.

Figura 14 - Percentual de retenção em função do aumento do tempo de interação entre o analito e o polímero. Massa de polímero de 10 mg, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, tempos avaliados 5,0 min; 10,0 min; 15,0 min; 30,0 min; 60,0 min; 90,0 min; 120,0 min; 180,0 min; 240,0 min e 300,0 min.



Fonte: Próprio autor.

Pode ser observado na Figura 14 que com o aumento do tempo de interação da ciprofloxacina com os polímeros, ocorreu um aumento significativo entre o percentual de retenção, porém os valores de NIP foram superiores aos de MIP. Avaliando os polímeros sintetizados até o presente momento do trabalho, pode-se notar a intensa formação de ligações inespecíficas entre a ciprofloxacina e os materiais propostos.

4.5. Mag-MIP1 e Mag-MIP2

Uma alternativa para melhorar o desempenho do MIP para a adsorção da ciprofloxacina e minimizar as ligações inespecíficas que estavam ocorrendo entre o analito e o NIP foi a realização da síntese do polímero impressos na superfície de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, formando um core-shell, favorecendo a exposição das cavidades seletivas presentes no MIP, pois estas estarão presentes somente na superfície da partícula.

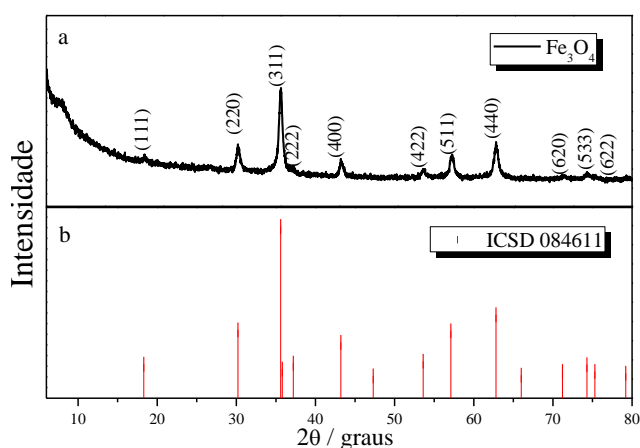
Uma vez sintetizadas, as nanopartículas magnéticas descritas no item 3.4 e os Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2 foram realizadas diferentes caracterizações com o intuito de avaliar as características físicas dos materiais desenvolvidos.

4.5.1. Difractometria de raios x

Com a finalidade de confirmar que as nanopartículas sintetizadas são formadas por magnetita, e que houve um recobrimento (shell) em torno das mesmas, evidenciando que não houve alteração da constituição química do material, foram realizadas medidas de difratometria de raios X (DRX).

Na Figura 15a, está disposto o espectro de difração de raios X das Fe_3O_4 sintetizadas. É possível observar diversos picos em diferentes ângulos de difração, os quais podem ser comparados com os dados disponíveis na base de dados *Inorganic Crystal Structure Database* (Figura 15b), com ICSD Number 082432. Desta forma podemos observar que as nanopartículas sintetizadas de Fe_3O_4 são formadas por magnetita.

Figura 15 – DRX das Fe_3O_4 (a). Picos de DRX disponíveis na base de dados *Inorganic Crystal Structure Database* ICSD Number 082432 (b).



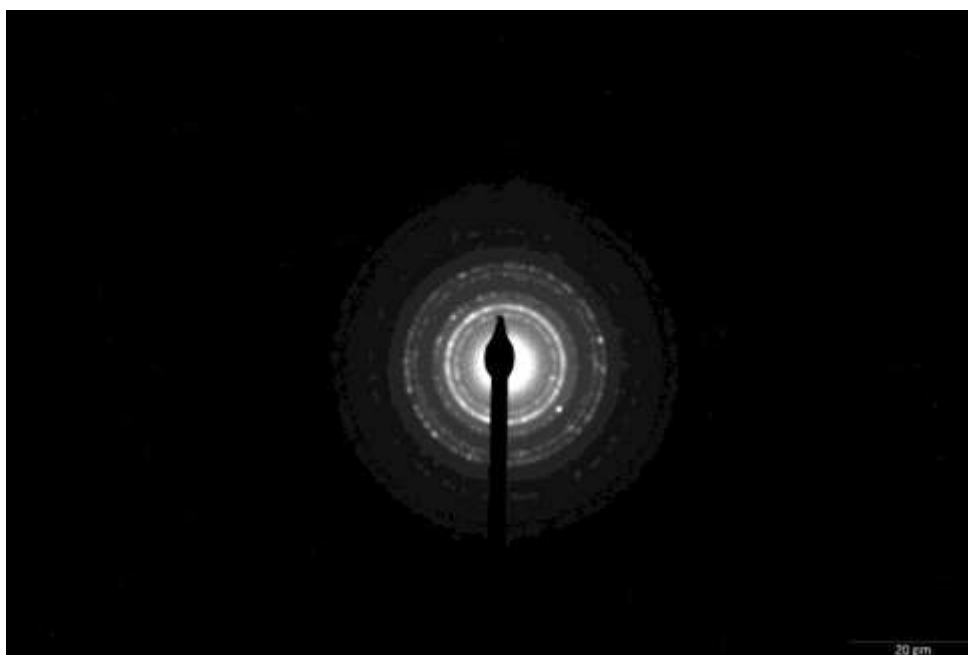
Fonte: Próprio autor.

Por meio do uso do software *Crystallography Search Match* foi possível aferir a distância dos planos cristalinos de Fe_3O_4 , cujos valores que estão dispostos na Tabela 3. Utilizando a Equação 13, foi possível calcular a distância interplanar por meio dos halos de difração de elétrons obtidos pelo MET, Figura 15.

$$\lambda^2 L = 2Rd \quad (13)$$

Onde $\lambda^2 L$ é a constante de câmera e apresenta um valor fixo de 1210,00 pixels \AA^{-1} ; $2R$ é o diâmetro dos halos dado em pixels e d o valor das distâncias interplanares em \AA .

Figura 16 – Halos obtidos por meio da difração de elétrons de Fe_3O_4 em MET.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 3 – Comparação entre as distâncias interplanares obtidas pela DRX e MET.

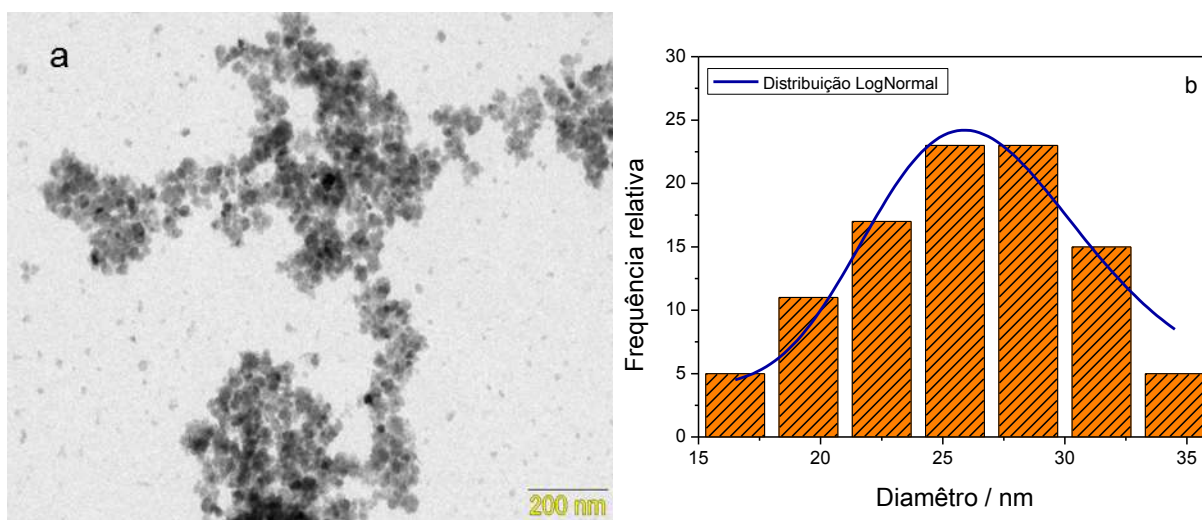
Plano cristalino	Ângulo 2θ	Distancia encontrada (\AA)	Distancia calculada (\AA)
111	18,30	4,83	
220	30,12	3,98	3,85
311	35,50	2,51	2,55
222	37,15	2,09	2,10
400	43,15	1,70	
422	53,50	1,60	1,63
511	57,15	1,47	1,48
440	62,65	1,32	
620	71,28	1,28	
533	74,31	1,25	1,22
622	79,12	1,21	1,21

Fonte: Próprio autor.

Como podem ser observados na Tabela 2, os dados obtidos pelo DRX corroboram com os valores encontrados pela aplicação da Equação 17, assim constatam que as nanopartículas de Fe_3O_4 apresentam fase cristalina como magnetita.

As nanopartículas de Fe_3O_4 foram analisadas por meio da MET com a finalidade de observar sua morfologia e características superficiais (Figura 17).

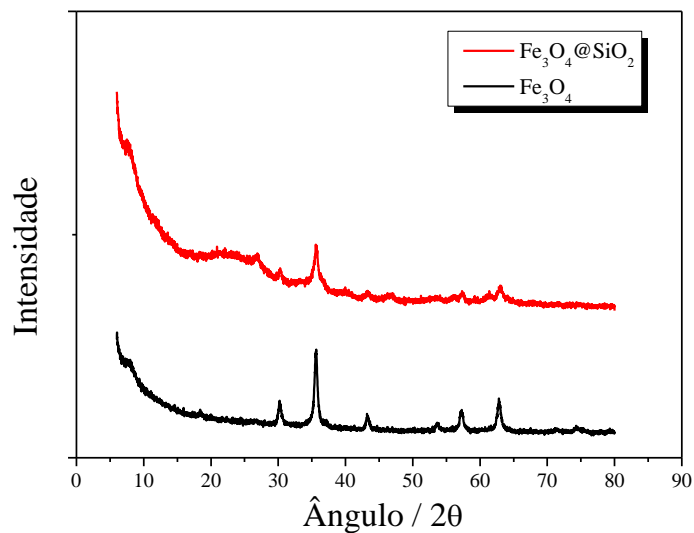
Figura 17 – Imagem de MET com ampliação de 200.000X da magnetita (a) e histograma de distribuição de tamanho da magnetita (b).



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 17a podem ser observadas as imagens das nanopartículas de Fe_3O_4 , as quais apresentam a formação de pequenos aglomerados devido a atração magnética das nanopartículas e uma uniformidade em relação ao tamanho delas, o que podem ser constatado na Figura 17b, que descreve o histograma de distribuição de tamanho de nanopartícula e a curva de distribuição LogNormal. Foi possível encontrar o valor de diâmetro médio (d_{med}) das nanopartículas magnéticas, as quais apresentaram um valor de 26,60 nm ($\pm 0,62$).

Após a formação das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, estas foram analisadas por DRX para a avaliação da efetividade do recobrimento e constatar que não houve mudança na fase cristalina das nanopartículas de Fe_3O_4 .

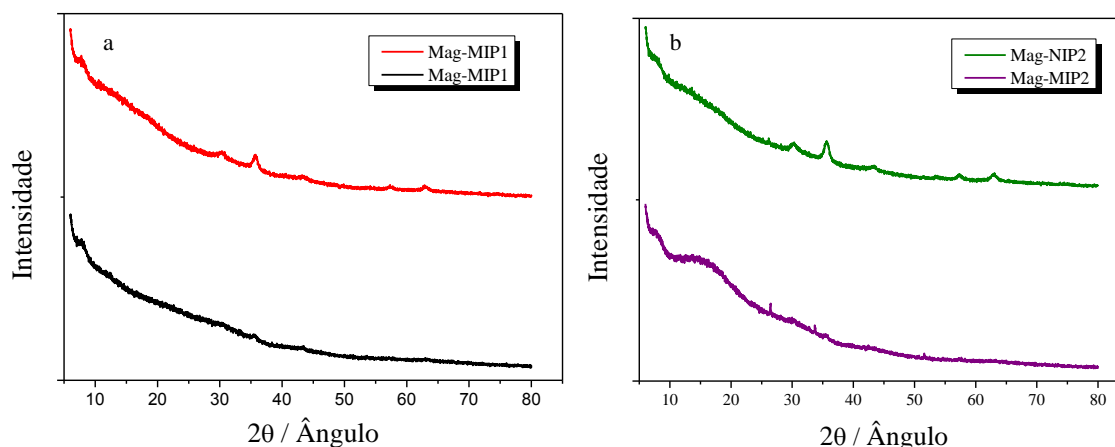
Figura 18 - DRX das Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

Fonte: Próprio autor

A Figura 18 mostra que há uma diminuição significativa da intensidade de pico de todos os planos cristalinos presentes na Fe_3O_4 e, inclusive, alguns picos não foram mais observados, certificando que houve a realização da formação de uma camada vítrea sobre as nanopartículas de Fe_3O_4 .

Posteriormente, também foi realizada análises de DRX dos polímeros impressos sobre as nanopartículas. Os difratogramas dos Mag-MIP1/Mag-NIP1 é mostrado na Figura 19a e dos Mag-MIP2/Mag-NIP2 na Figura 19b.

Figura 19 - Difratogramas de raios x de Mag-MIP1 e Mag-NIP1 (a) e Mag-MIP2 e Mag-NIP2 (b).



Fonte: Próprio autor.

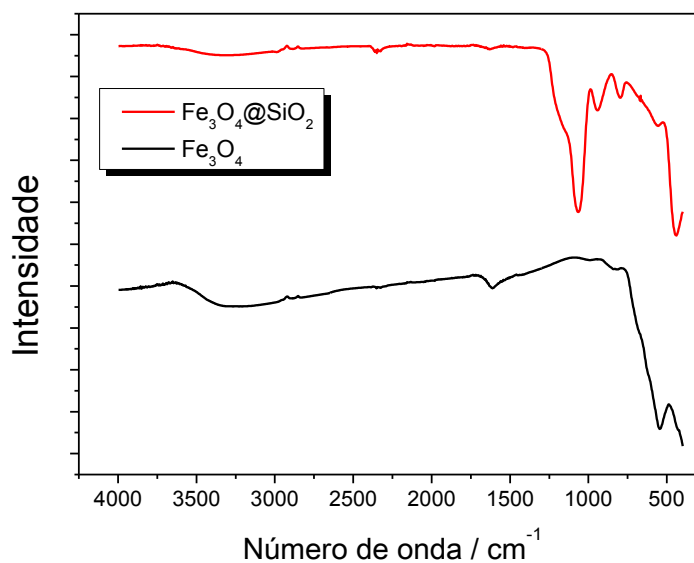
Pode-se concluir que o recobrimento das nanopartículas de Fe_3O_4 foi realizado com alta eficiência devido a supressão de todos os picos de difração da magnetita em Mag-MIP1 e Mag-MIP2. Nos difratogramas dos Mag-NIP1 e Mag-NIP2 ainda há a presença de picos pouco intensos, porém nos mesmos planos cristalinos, assim mostrando que o recobrimento ocorreu de forma igualitária sobre a magnetita nos dois materiais sintetizados.

4.5.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Com o propósito de caracterizar a estrutura das nanopartículas magnéticas e do Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2 foram realizadas medidas de espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier

O FTIR tem como finalidade realizar a atribuição de bandas provenientes do deslocamento axial, representadas por ν ; ou por deformações angulares representadas por δ . Na Figura 20, estão dispostos os espectros de transmitância na região do infravermelho das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4 - magnetita) e das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

Figura 20 – Espectro de FTIR das Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$.

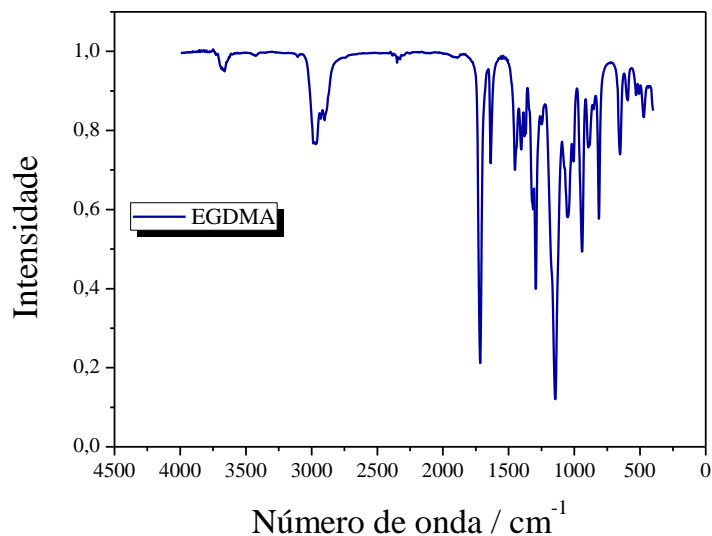


Fonte: Próprio autor.

A partir dos espectros, é possível verificar a presença de uma banda na região de 550 cm^{-1} atribuída à vibração da ligação presente entre Fe-O, também é notado que nas nanopartículas de Fe_3O_4 recobertas com TEOS, é observado uma supressão desta banda em 550 cm^{-1} e o surgimento de uma banda intensa em 1063 cm^{-1} , a qual é atribuída à vibração da ligação Si-O, mostrando que houve a formação da camada vítrea na superfície das nanopartículas magnéticas de oxido de ferro.

Na Figura 21 estão exibidos os espectros de transmitância na região do infravermelho do monômero estrutural (EGDMA) utilizado para a síntese de ambos os materiais. O EGDMA tem como função conferir aos polímeros sintetizados estrutura física e conferir suporte físico na adsorção da ciprofloxacina nas cavidade seletivas do Mag-MIP1 e Mag-MIP2

Figura 21 - Espectro de FTIR do EGDMA.



Fonte: Próprio autor.

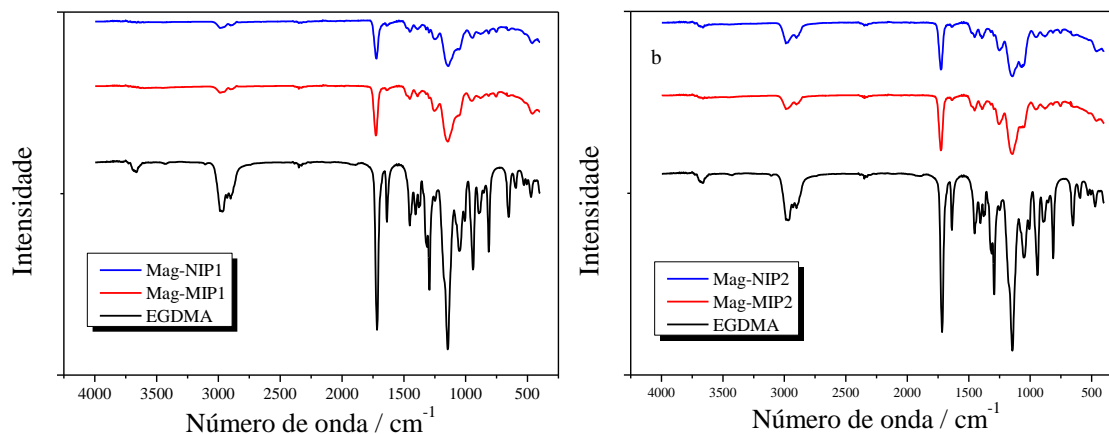
Podemos ressaltar a presença de duas principais bandas características; a primeira em 1715 cm^{-1} devido ao deslocamento axial entre a ligação C=O e a segunda em 1640 cm^{-1} referente ao deslocamento axial entre a ligação C=C. Na Tabela 4 é apresentado as demais bandas referentes aos deslocamentos axiais e deformações angulares característicos do grupo éster, além dos dobramentos angulares das ligações duplas entre os carbonos da extremidade.

Tabela 4 – Bandas de FTIR referentes ao EGDMA.

Principais bandas (cm^{-1})	2975-2900	1715	1640	1460	1320	1290	1145	1010	940	810
Atribuições	$\nu\text{ C-H}$ sp^3	$\nu\text{ C=O}$	$\nu\text{ C=C}$	$\delta\text{ =CH}_2$		$\nu\text{ C-O}$			$\delta\text{ =C-H}$ para fora do plano	

Fonte: Próprio autor.

Figura 22 - Espectro de FTIR da comparação entre a estrutura do EGDMA e do Mag-MIP1/Mag-NIP1 (a), e comparação entre a estrutura do EGDMA e do Mag-MIP2/Mag-NIP2 em (b).



Fonte: Próprio autor.

Assim, após analisar os materiais que compõem a estrutura do Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2, foi realizada uma comparação entre os espectros do (Figura 22). Pode ser observado que a estrutura polimérica dos materiais sintetizados é constituída basicamente somente de EGDMA, devido a presença das bandas em 1715 cm^{-1} e 1290 cm^{-1} características do éster. Adicionalmente, pode-se confirmar que a reação de polimerização acontece de forma radicalar pela quebra das duplas ligações entre os carbonos dos monômeros, pois a banda em 1640 cm^{-1} , referente ao deslocamento axial entre $\text{C}=\text{C}$, presente no espectro do EGDMA não foi mais observada após a formação dos polímeros. Na Tabela 5 é exibido as principais bandas referentes deslocamentos axiais e deformações angulares característicos do EGDMA e do Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2.

Tabela 5 – Bandas de FTIR referentes ao EGDMA em comparação com Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2.

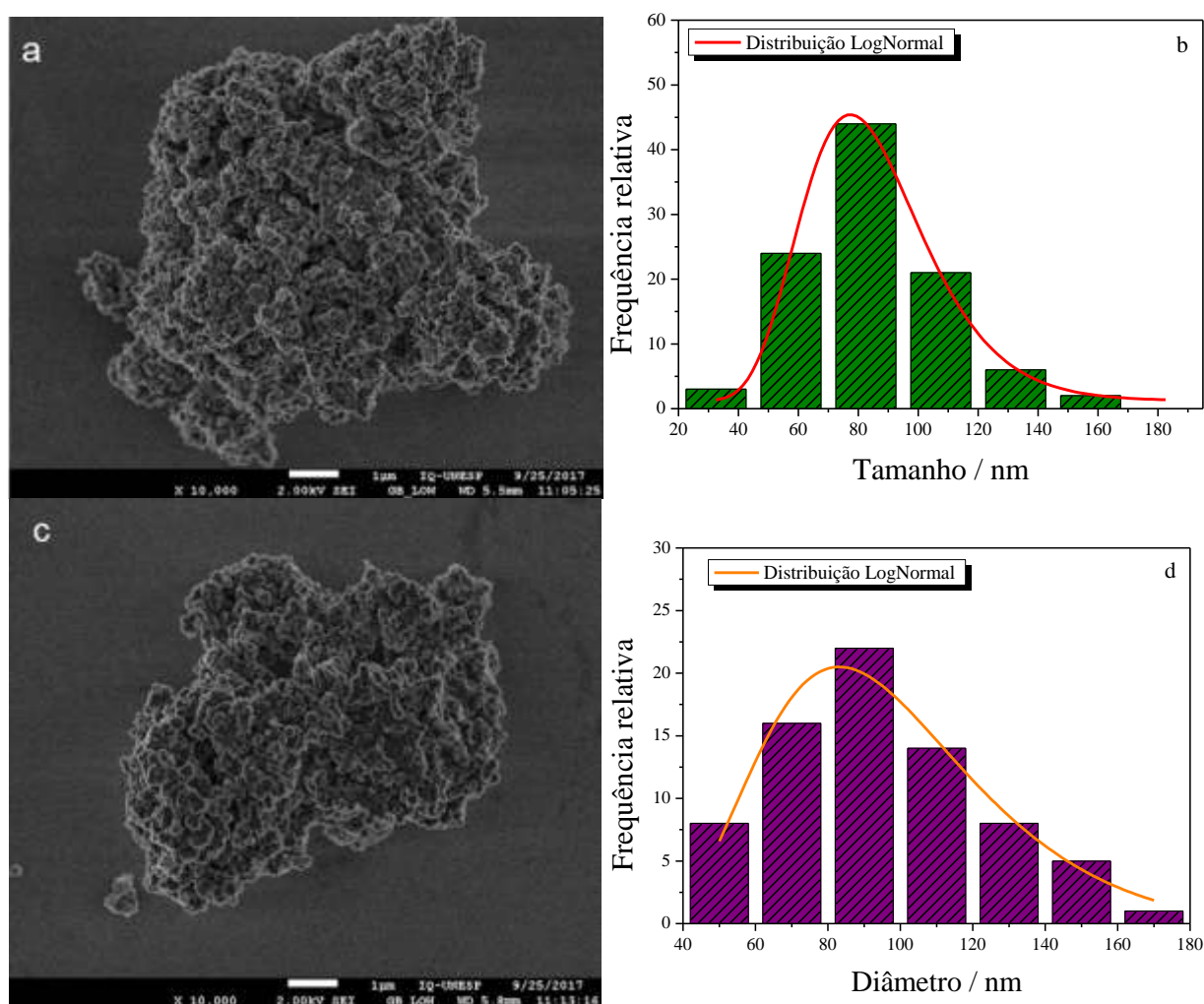
Principais bandas (cm^{-1})	2975-2900	1715	1460	1320	1290	1145	1010	940	810
Atribuições	$\nu\text{ C-H}$ sp^3	$\nu\text{ C=O}$	$\delta\text{ =CH}_2$		$\nu\text{ C-O}$			$\delta\text{ =C-H}$ para fora do plano	

Fonte: Próprio autor.

4.5.3. Caracterizações morfológicas

A modificação da magnetita, a funcionalização com grupamentos metacrilato e o recobrimento com o MIP aumentam o diâmetro das partículas, dificultando assim com que o feixe de elétrons disparado pelo microscópio eletrônico de transmitância incida sobre a amostra. Por essa razão, os demais materiais: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$; $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$; Mag-MIP1, Mag-NIP1; e Mag-MIP2, Mag-NIP2 analisados por MEV-FEG para avaliar sua morfologia, distribuição e características superficiais.

Figura 23 - Imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (a), histograma de distribuição de tamanho da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (b), imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ (c), histograma de distribuição de tamanho da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ (d).

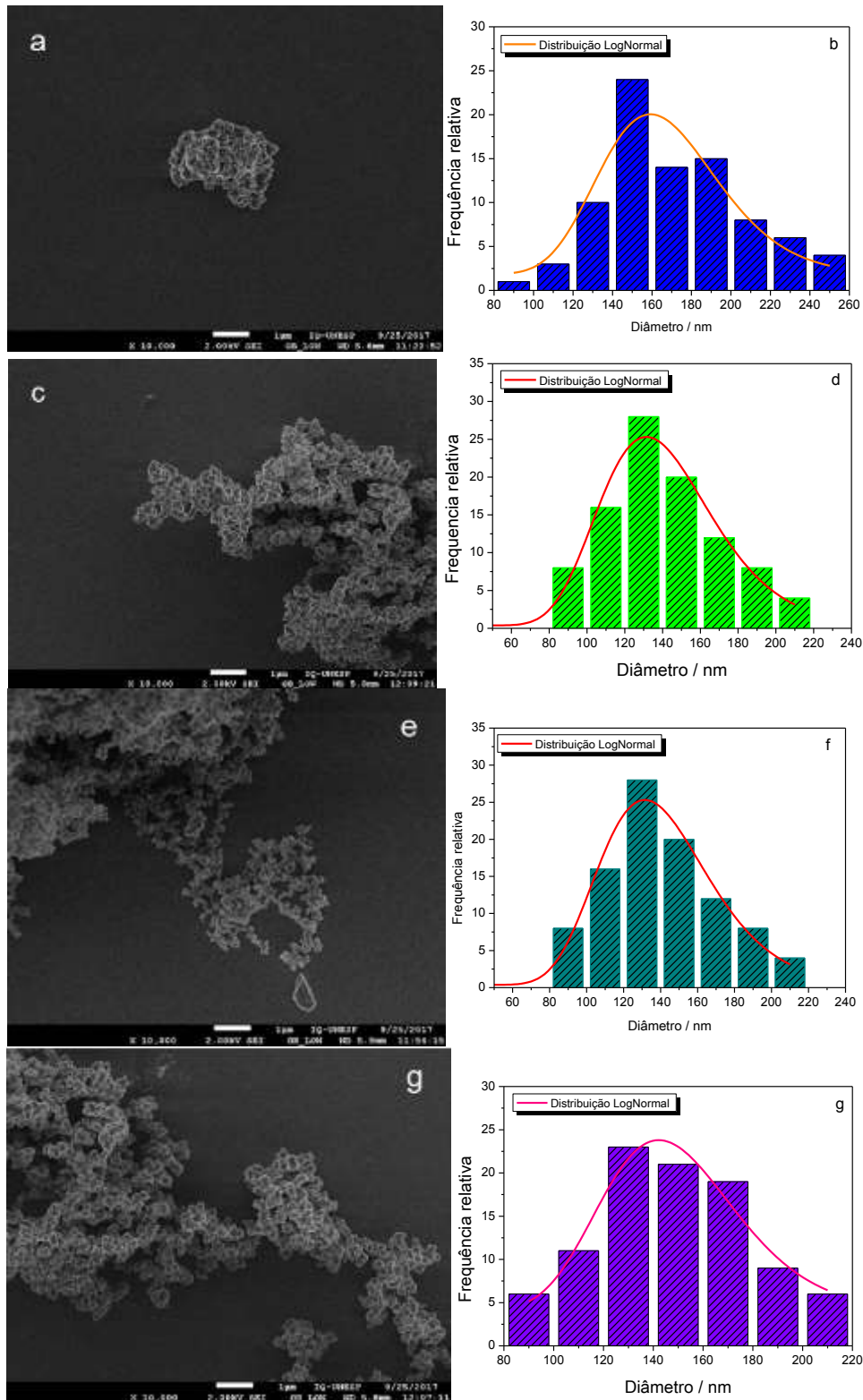


Fonte: Próprio autor.

Na Figura 23a pode-se observar as imagens das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ mostrando que estas estão aglomeradas devido a atração magnéticas que elas apresentam, no entanto apresentam uma aumento uniforme no seu tamanho, que pode ser avaliado por meio da Figura 23b, que demonstra o histograma de distribuição de tamanho das partículas e o ajuste realizado com o uso Equação LogNormal, desta maneira as $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ apresentam o valor de $d_{\text{med}} = 82,69 \text{ nm } (\pm 0,83)$. A Figura 23c dispõe a imagem das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ que pode-se notar que há um aglomerado de material porem uma uniformidade em sua superfície, avaliando o histograma de distribuição de tamanho da $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ disposto na Figura 23d, foi realizado o ajuste da Equação LogNormal, podendo assim determinar o valor do d_{med} das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$ sendo este igual $93,83 \text{ nm } (\pm 6,31)$, este pequeno aumento observado é corresponde a incorporação dos grupos metacrilatos na superfície das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para a formação das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C=C}$.

As imagens de MEV-FEG dos materiais Mag-MIP1, Mag-NIP1; e Mag-MIP2, Mag-NIP2, estão apresentadas na Figura 24.

Figura 24 - Imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-MIP1 (a), histograma de distribuição de tamanho da Mag-MIP1 (b), imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-NIP1 (c), histograma de distribuição de tamanho da Mag-NIP1(d), Imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-MIP2 (e), histograma de distribuição de tamanho da Mag-MIP2 (f), imagem de MEV-FEG com ampliação de 10.000X de Mag-NIP2 (g), histograma de distribuição de tamanho da Mag-NIP1(h).



Fonte: Próprio autor.

Por meio das figuras 24a, 24c, 24e e 24g pode-se observar que o Mag-MIP1, Mag-MIP2, Mag-NIP1 e Mag-NIP2 respectivamente, evidenciaram morfologias semelhantes dispostas na forma de partículas esféricas, apresentaram a formação de aglomerados devido as características magnéticas do corre em seu núcleo.

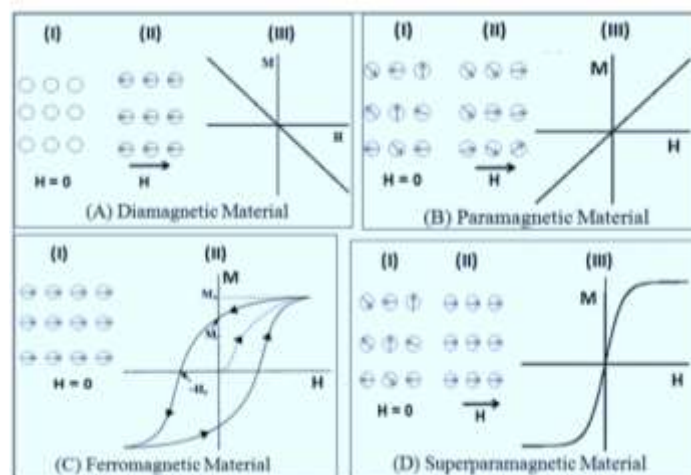
Por meio do ajuste realizado com o uso Equação LogNormal dispostos nos histogramas apresentados na Figura 24b, 24d, 24f e 24h, pertencentes a Mag-MIP1, Mag-MIP2, Mag-NIP1 e Mag-NIP2 respectivamente, pode-se estipular o d_{med} dos materiais denotados, desta maneira estes apresentaram os seguintes valores. O Mag-MIP1 apresentou um $d_{med} = 164,92 \text{ nm} (\pm 5,73)$, Mag-MIP2 exibiu um valor de $d_{med} = 145,55 \text{ nm} (\pm 0,77)$, Mag-NIP1 um $d_{med} = 138,19 \text{ nm} (\pm 2,31)$. e o Mag-NIP2 um $d_{med} = 147,37 (\pm 3,35)$. Assim, pode-se concluir que há uma homogeneidade no tamanho das partículas de polímeros magnéticos sintetizadas sobre as nanopartículas magnéticas de oxido de ferro, evidenciando assim o core-shell desenvolvido no presente trabalho dispõe de características de nanomateriarais.

4.5.4. Magnetometria de amostra vibrante (VSM)

A VSM é uma técnica que tem como finalidade determinar a resposta magnética do material quando este é submetido à aplicação de um campo magnético fixo por um determinado tempo. Este material pode ser classificado de quatro formas acordo com o comportamento do material quando submetido a um campo magnético externo: diamagnéticos, paramagnético, ferromagnéticos e paramagnéticos, exibido na Figura 25. (131)

Figura 25- Ilustração do momento magnético (M) de diferentes tipos de materiais sob aplicação de um campo magnético (H).

(132)

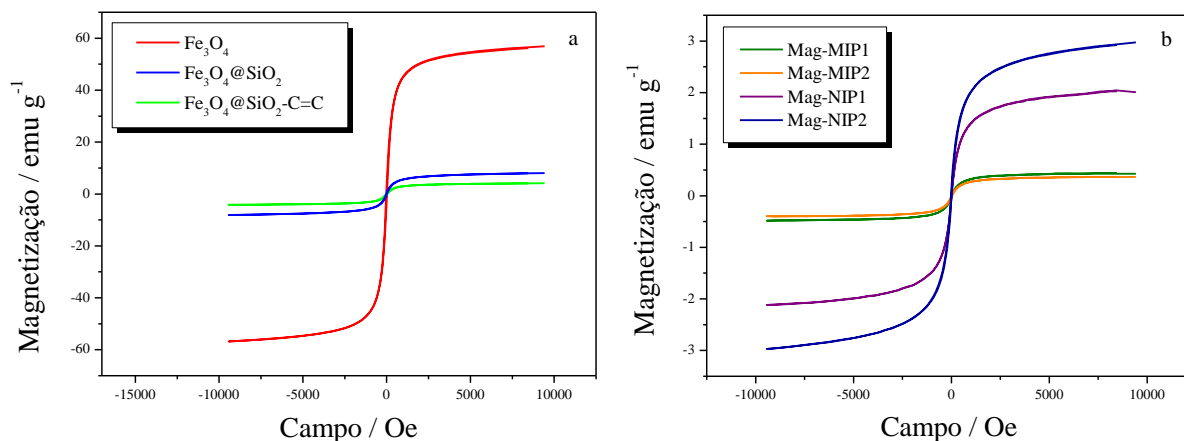


Fonte: (132).

Para a análise de magnometria, o material é colocado sob efeito de um campo magnético até atingir uma magnetização de saturação (M_s); que é gerada pelo alinhamento máximo de todos os momentos magnéticos do material. Com a diminuição do campo, o valor de magnetização decresce para o valor de magnetização remanescente (M_R). O campo necessário para remover a magnetização de um material depois de ser submetido ao campo magnético externo é chamado de campo coercitivo ($-H_c$) que vai aumentando continuamente até atingir um valor oposto ao da magnetização de saturação, completando o ciclo que representa a histerese do material. Para os materiais superparamagnéticos, devido aos monodomínios, apresenta-se uma curva de histerese de alta magnetização de saturação e zero de remanência. (132)

Em razão das nanopartículas utilizadas no presente trabalho serem magnetita, esperou-se um comportamento superparamagnético dos materiais desenvolvidos. Portanto todas as etapas foram caracterizadas por VSM para conferir as propriedades magnéticas no decorrer do processo de modificação.

Figura 26 - Curvas de histerese magnética para Fe_3O_4 ; $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$ (a); e curvas de histerese magnética para Mag-MIP1; Mag-MIP2; Mag-NIP1 e Mag-NIP2 (b).



Fonte: próprio autor.

Por meio da Figura 26a é possível observar que a Fe_3O_4 possui um valor de M_s igual a 65,78 em g^{-1} . Após o recobrimento com TEOS o valor diminui para 8,18 em g^{-1} . Para $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$ há um pequeno decaimento (3,94 em g^{-1}). Na Figura 26b, é possível observar que o recobrimento do polímero sobre a nanopartícula magnética funcionalizada diminui ainda mais os valores de M_s , apresentando valores próximos a 0,42 em g^{-1} para Mag-MIP1 e Mag-MIP2; e 2,02 em g^{-1} para Mag-NIP1 e Mag-NIP2.

Por via deste experimento pode-se concluir que os valores de M_s descresem a medida que se aumenta as camadas de recobrimento do material. Contudo, ainda assim, é observado que não houve magnetização remanescente, nem coercitividade ou histerese como esperado de materiais superparamagnéticos.

4.5.5. Fisissorção de N_2 e análise com ajuste BET

A diferença marcante entre Mag-MIP e Mag-NIP é a presença de poros nos materiais, uma vez que o MIP apresenta as cavidades seletivas para o analito. Para aferir a porosidade, foi utilizada a técnica de fisissorção de nitrogênio, juntamente com o método de análise de dados BET. O objetivo desse estudo foi verificar a formação das cavidades na estrutura do MIP e o tamanho dos poros dos polímeros, permitindo assim diferenciar Mag-MIP e Mag-NIP, pela medida do diâmetro interno de poro, área superficial e volume de poro.

Na Tabela 6 estão dispostos os valores de diâmetro médio de poro (ϕ), área superficial (A_s) e volume médio de poro (V_{med}). Por meio destes valores pode-se concluir que houve a formação de cavidades no Mag-MIP1 e Mag-MIP2, uma vez que apresentaram valores

superiores em todos os parâmetros aferidos. Já o Mag-NIP1 e o Mag-NIP2 apresentam uma forma mais compactada, possivelmente por não possuírem as cavidades seletivas a ciprofloxacina. Podemos observar que houve um aumento de aproximadamente 4,5 e 13,3 vezes entre o ϕ e A_s de Mag-MIP1 e Mag-NIP1 respectivamente; e entre Mag-MIP2 e Mag-NIP2 o valor de ϕ aumentou aproximadamente 4,6 e de A_s 1,6 vezes.

Tabela 6 - Resultados de porosidade obtidos pelas isotermas de fisissorção com ajuste BET para as amostras de Mag-MIP1; Mag-NIP1; Mag-MIP2 e Mag-NIP2.

Material	ϕ_{med} (nm)	A_s (m² g⁻¹)	V_{med} (cm³ g⁻¹)
Mag-MIP1	23,6	172,2	0,222
Mag-NIP1	5,18	12,97	0,0807
Mag-MIP2	40,4	160,2	0,246
Mag-NIP2	8,82	99,86	0,221

Fonte: Próprio autor.

De acordo com Gregg e Sing (133), materiais porosos podem ser classificados em função do diâmetro conforme apresentado na Tabela 7. Diante do diâmetro do poro obtido pelo método BET, aproximadamente 23 Å e 40 Å, para Mag-MIP1 e Mag-MIP2 respectivamente, podendo assim classificar os polímeros como mesoporosos.

Tabela 7 - Classificação dos poros segundo seu diâmetro.

Classificação	ϕ (Å)
Microporo	$\phi < 20$
Mesoporo	$20 < \phi < 500$
Macroporo	$\phi > 500$

Fonte: (133)

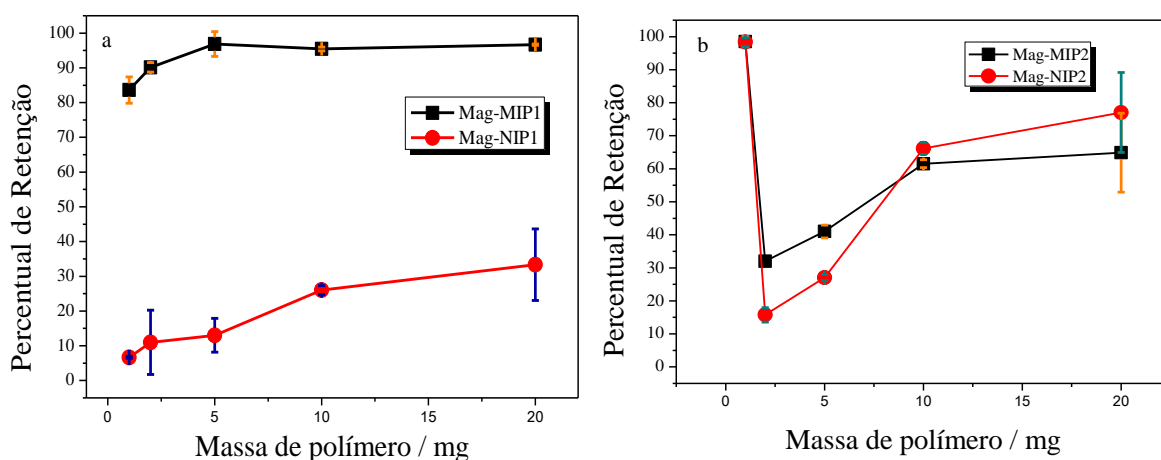
4.6. Avaliação da eficiência do Mag-MIP1 e Mag-MIP2

Por meio das técnicas de caracterização do Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2 foi observado que estes materiais não apresentam diferenças significativas na composição e estrutura. Então, foi realizada uma série de experimentos com o intuito de avaliar a eficiência de adsorção da ciprofloxacina sobre o Mag-MIP1 e Mag-MIP2.

4.6.1. Estudo de religação

Como experimento inicial, foi realizado um ensaio de religação da ciprofloxacina a ambos materiais. A Figura 26 apresenta os valores de percentual de retenção do analito em função do aumento da massa de polímero, em um solução de ciprofloxacina $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, por um período de 120 min.

Figura 27 – Percentual de retenção em função do aumento da massa polimérica. Tempo de interação de 120 min, 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, massas poliméricas avaliadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg; Mag-MIP1/Mag-NIP1 (a) e Mag-MIP2/Mag-NIP2 (b).



Fonte: Próprio autor

A Figura 27a apresenta o resultado para o Mag-MIP1/Mag-NIP1. O Mag-MIP1 apresentou valores de retenção superiores a 80%, enquanto que o Mag-NIP1 teve porcentagens de retenção inferiores a 40%.

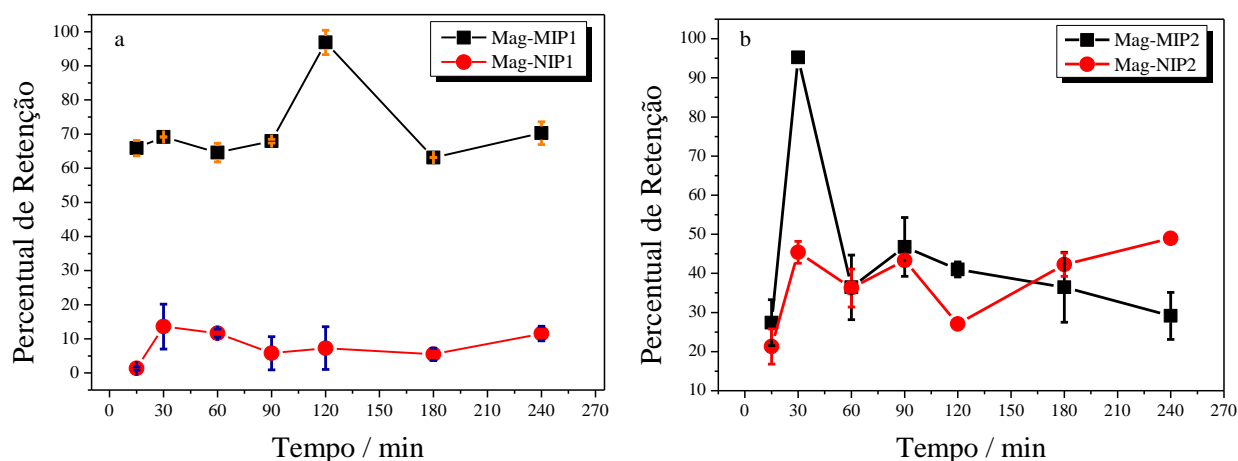
Já o resultado obtido para o Mag-MIP2/Mag-NIP2 (Fig. 27b) não se mostrou satisfatório, pois não houve diferença significativa entre o polímero impresso e o não impresso. Adicionalmente, a porcentagem de retenção variou entre 10% e 70%, valores inferiores aos obtidos para o polímero sintetizado com apenas um monômero funcional.

Para os experimentos posteriores, foi adotado a massa de 5 mg para ambos materiais.

4.6.2. Estudo cinético

Haja vista os resultados obtidos no item anterior, foi realizado um estudo cinético, com a finalidade de determinar o melhor tempo de interação entre a ciprofloxacina e os materiais desenvolvidos. Na Figura 28a, estão dispostos os resultados obtidos para o Mag-MIP1/Mag-NIP1, que foi disperso em em 1,0 mL de uma solução aquosa de ciprofloxacina $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Enquanto que o Mag-MIP2/Mag-NIP2 (Fig. 28b) foi disperso em uma solução de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (70:30) v/v (proporção de solvente otimizada; resultado não apresentado).

Figura 28 - Percentual de retenção em função do aumento do tempo de interação entre o analito e o polímero, Mag-MIP1/Mag-NIP1 (a) e Mag-MIP2/Mag-NIP2 (b). Foram pesados 10 mg dos polímeros, tempos avaliados 5,0 min; 10,0 min; 15,0 min; 30,0 min; 60,0 min; 90,0 min; 120,0 min; 180,0 min; 240,0 min e 300,0 min. Mag-MIP1/Mag-NIP1 foram dispersos em 1 mL solução aquosa de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que Mag-MIP2/Mag-NIP2, estes foram 1 mL solução em uma solução de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (70:30) v/v de ciprofloxacina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor

Por meio dos resultados expostos na Figura 28, foi estabelecido que o tempo ótimo de análises para o Mag-MIP1/Mag-NIP1 foi de 120 min, pois a porcentagem de retenção do Mag-MIP1 foi de 95 % e o de Mag-NIP de 9 % diferenciando um largo intervalo entre MIP e NIP. No entanto, para o Mag-MIP2/Mag-NIP2 foi de 30 min, que foi o tempo que apresentou maior diferença entre os valores de retenção entre Mag-MIP2 e Mag-NIP2, sendo que 93% e 45% respectivamente. Quanto ao comportamento cinético dos polímeros sintetizados pode-se observar que estes não apresentaram comportamentos análogos, proveniente da presença de um segundo monômero estrutural (1-vinilimidazol) no Mag-MIP2/Mag-NIP2, promovendo uma mudança no equilíbrio de adsorção entre a ciprofloxacina e os polímeros impressos e assim

alterando o comportamento cinético do Mag-MIP2/Mag-NIP2 em relação o Mag-MIP1/Mag-NIP1.

4.6.3. *Isotermas de adsorção*

Este experimento foi realizado para avaliar a eficiência de adsorção (Q) dos polímeros em diferentes concentrações de analito. A adsorção pode ocorrer de três maneiras, sendo elas; monocamada, multicamadas ou uma superfície mista entre monocamada e multicamada. Os experimentos desta etapa têm como finalidade entender como se comporta a adsorção da molécula molde no polímero, além de informar a capacidade máxima de adsorção (Q_{\max}) e a constante de adsorção (K).

Existem equações as quais são denominadas isotermas de adsorção e são curvas obtidas a partir da quantidade de soluto adsorvido em função da concentração deste soluto; para estes estudos é importante que a concentração livre de analito esteja em equilíbrio com a concentração adsorvida sobre o material. Desta maneira, foram utilizados os seguintes modelos matemáticos para realizar essas análises e determinar os valores de Q_{\max} e K .

A isoterma mais conhecida e utilizada segue o modelo matemático desenvolvido por Langmuir, Equação 3, o qual leva em consideração que a adsorção só ocorre em uma única camada (monocamada); que a espessura da camada adsorvida é igual a espessura do adsorbato; e que o número de sítios de ligação são bem definidos; todos são idênticos, possuindo assim a mesma afinidade para com o analito e não há nenhum tipo de interação lateral e impedimento estérico entre as moléculas mesmo em locais adjacentes.

$$Q = \frac{M.K.C}{1+K.C} \quad (3)$$

Onde M carga máxima de polímero; K é a constante de afinidade e C é a concentração de analito não ligada.

A isoterma de Freundlich, Equação 4, foi o a primeira equação que relaciona uma adsorção ideal e reversível. O tipo de adsorção que este modelo descreve não é restrito apenas a uma monocamada, mas sim por multicamadas em que a energia de adsorção decresce exponencialmente até a conclusão do processo de adsorção, sendo que β é a inclinação da função, o qual pode variar de 0,0 a 1,0 e mede heterogeneidade da superfície.

$$Q = K.C^\beta \quad (4)$$

Há uma combinação entre as expressões descritas por Langmuir e Freundlich, a qual foi deduzida para prever sistemas de adsorção heterogênea e controlar a limitação da concentração de analito crescente. Apresentada na Equação 5, esta evidencia que quando o valor de C tende a 0, o sistema se ajusta como descrito pelo modelo de Freundlich; porém quando o valor de C tende a concentrações altas, o sistema se configura como o descrito por Langmuir.

$$Q = \frac{K.M.C^\beta}{1+K.C^\beta} \quad (5)$$

A isoterma de Redlich-Peterson também é um modelo matemático híbrido dos modelos de Langmuir e de Freundlich, apresentado na Equação 6. Ela pode ser aplicada tanto a sistemas homogêneos, quanto heterogêneos. Quando em altas concentrações, o valor de β tende a 0, se aproximando do modelo de Freundlich; em concentrações baixas, o valor de β tende a 1, ajustando assim no modelo de Langmuir.

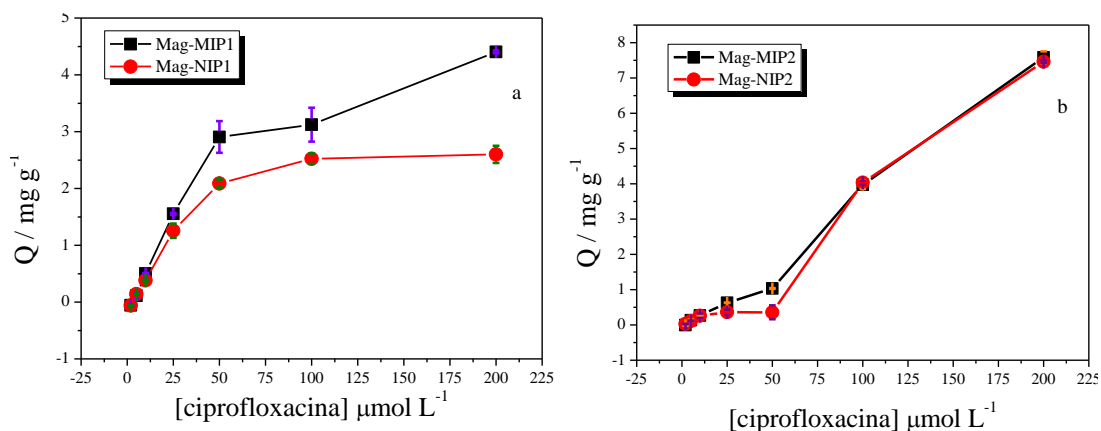
$$Q = \frac{K.M.C}{1+M.C^\beta} \quad (6)$$

O modelo de Toth, disposto na Equação 7 é um modelo empírico, aplicado a sistemas heterogêneos que satisfaz tanto quanto valores altos como baixos de concentração.

$$Q = \frac{K.M.C}{(1+K.M^\beta)^{\beta-1}} \quad (7)$$

A Figura 28 apresenta o desempenho de adsorção do analito nas cavidades do material, cujos resultados foram utilizados para o ajuste dos dados em diferentes modelos matemáticos, assim sendo possível encontrar o valor de Q_{\max} ; K e β . Para Mag-MIP1/Mag-NIP1 a solução de dispersão foi preparada em meio aquoso, enquanto que para o Mag-MIP2/Mag-NIP2 foi uma mistura H₂O:MeOH 70:30 (v/v).

Figura 29 - Isoterma de adsorção de ciprofloxacina em (a) Mag-MIP1/Mag-NIP1 em meio aquoso; (a) Mag-MIP2/Mag-NIP2 em meio 70:30 H₂O/MeOH (v/v), massa de polímero de 5 mg e tempo de interação de 120 min (a) e 30 min (b).



Fonte: Próprio autor.

Observando os perfis apresentados pelas curvas de isoterma de adsorção, Figura 29, pode-se perceber que estas exibem certa semelhança entre seus comportamentos. Na figura 29a é notado que esta apresenta um perfil hiperbólico apresentando um platô no valor de Q em concentrações de ciprofloxacina superiores a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, o mesmo pode ser percebido na Figura 29b, contudo o Mag-MIP2/Mag-NIP2 apresentou em concentrações superiores a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ um aumento intenso no valor de Q e igualdade entre as respostas de Mag-MIP2 e Mag-NIP2, proveniente da saturação superficial dos polímeros.

Avaliando os valores exibidos na Tabela 8, pode-se concluir que o modelo matemático no qual os dados se ajustam é o modelo de Langmuir-Freundlich (Equação 5), pois é o que apresenta maior valor de r^2 : 0,9675/0,9837 e 0,9941/0,9955 para Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2, respectivamente. Assim podemos constatar que o processo de quimissorção entre a ciprofloxacina e os polímeros impressos desenvolvidos ocorreu de forma heterogenea, e aconteceu por duas formas, em um primeiro momento a adsorção da ciprofloxacina no Mag-MIP se deu pela formação de uma monocamada e a medida que a concentração de analito no meio aumentou houve uma mudança no processo de adsorção, passando a acontecer em forma de multicamadas adsorvidas.

Tabela 8 – Resultados dos parâmetros dos ajustes dos dados experimentais de adsorção de Ciprofloxacina com Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2.

Modelo	Parâmetro	Mag-MIP1	Mag-NIP1	Mag-MIP2	Mag-NIP2
Lamguir	Q_{\max} ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	$5,85 \pm (0,78)$	$0,41 \pm (0,39)$	$3,58 \pm (1,12)$	$0,47 \pm (0,08)$
	K ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)	$0,014 \pm (0,01)$	$0,023 \pm (0,01)$	$0,008 \pm (0,003)$	$0,08 \pm (0,04)$
	r^2	0,9665	0,9564	0,9919	0,9013
Freundlich	K ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)	$4,34 \pm (0,78)$	$4,54 \pm (0,13)$	$27,77 \pm (0,01)$	$14,28 \pm (0,03)$
	β	$0,56 \pm (0,09)$	$0,47 \pm (0,11)$	$0,86 \pm (0,07)$	$0,44 \pm (0,15)$
	r^2	0,9197	0,844	0,9853	0,7573
Lamguir-Freundlich	Q_{\max} ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	$4,65 \pm (0,67)$	$2,68 \pm (0,05)$	$1,83 \pm (0,52)$	$0,36 \pm (0,008)$
	K ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)	$0,05 \pm (0,006)$	$0,02 \pm (0,008)$	$0,08 \pm (0,002)$	$0,06 \pm (0,004)$
	β	$1,38 \pm (0,37)$	$1,91 \pm (0,12)$	$1,27 \pm (0,21)$	$2,43 \pm (0,25)$
	r^2	0,9675	0,9837	0,9941	0,9955
Redlich-Petreson	Q_{\max} ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	$1,54 \pm (8,01)$	$6,83 \pm (0,001)$	$0,13 \pm (0,003)$	$0,36 \pm (0,006)$
	K ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)	$0,23 \pm (0,13)$	$0,78 \pm (0,17)$	$0,15 \pm (0,31)$	$0,89 \pm (0,16)$
	B	$0,441 \pm (0,14)$	$1,59 \pm (0,28)$	$445,44 \pm (0,19)$	$1,74 \pm (0,15)$
	r^2	0,8999	0,9837	0,9566	0,9551
Toth	Q_{\max} ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	$0,22 \pm (0,02)$	$0,19 \pm (0,04)$	$0,20 \pm (0,007)$	$0,15 \pm (0,009)$
	K ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)	$0,22 \pm (0,06)$	$0,19 \pm (0,02)$	$0,21 \pm (0,21)$	$0,15 \pm (0,17)$
	β	$1,95 \pm (0,24)$	$2,16 \pm (0,39)$	$2,04 \pm (0,15)$	$2,52 \pm (0,12)$
	r^2	0,6315	0,3123	0,9566	-0,3585

Fonte: Próprio autor.

Também foi possível encontrar o valor de K : $0,05 \pm (0,006)$ / $0,02 \pm (0,008)$ $\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$ para Mag-MIP1 / Mag-NIP1; e $0,08 \pm (0,002)$ / $0,06 \pm (0,004)$ $\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$, para Mag-MIP2 / Mag-NIP2. Por meio da comparação entre os valores de K de Mag-MIP1 e Mag-NIP1, e de Mag-MIP2 e Mag-NIP2 pode-se concluir que a ciprofloxacina apresenta maior afinidade de adsorção pelos Mag-MIP1 e Mag-MIP2 em relação os valores dispostos por Mag-NIP1 e Mag-NIP2, evidenciando assim a existência de cavidades restritas a ciprofloxacina.

4.6.4. Seletividade

Em seguida foi realizado o estudo de seletividade (Fig. 30), cujo objetivo foi avaliar o grau de retenção de compostos com estruturas moleculares semelhantes a ciprofloxacina, bem como moléculas que apresentam estruturas distintas. Os compostos com estrutura análoga utilizados nesse estudo foram norfloxacina, levofloxacina e ofloxacina, que pertencem a classe das fluoroquinolonas, os compostos com estruturas distintas foram, paracetamol e ácido ascórbico.

Com os dados obtidos neste estudo, foram efetuados os cálculos matemáticos descritos no item 3.5.6 com a finalidade de avaliar em termos numéricos qual polímero impresso expõe melhor desempenho neste item. Os valores estão dispostos na Tabela 9 para Mag-MIP1/Mag-NIP1 e na Tabela 10 para Mag-MIP2/Mag-NIP2.

O teste de seletividade é essencial para avaliação da funcionalidade do Mag-MIP. Este experimento avalia a criação dos sítios seletivos, pois, ao expor o Mag-MIP e o Mag-NIP em contato com um analito e com compostos de estrutura similar, deve haver uma maior %Ret da ciprofloxacina pelo Mag-MIP, devido este apresentar cavidades específicas para a ciprofloxacina, enquanto que para os demais compostos analisados deverão exibir uma baixo %Ret no Mag-MIP. No entanto para o Mag-NIP não necessariamente deverá haver uma ligação específica entre a ciprofloxacina e o polímero, devido ao NIP não apresentar cavidades seletivas em sua estrutura, bem como dos demais compostos analisados.

A adsorção de uma molécula por um substrato é definida como uma função da tensão superficial (σ) de uma molécula por um substrato. Desta maneira, a seletividade de um Mag-MIP surge da variação entre a energia livre de adsorção de um substrato comparado com outro. Esta variação de energia livre de ligação de uma molécula, sendo ela o analito de interesse ou uma molécula interferente distinta, pode ser determinado pela Equação de energia livre de Gibbs, Equação 8.

$$\Delta G = -R. T. \ln K_p \quad (8)$$

Sendo que K_p é denominado de coeficiente de partição da molécula no polímero, definido como a razão entre número médio de moléculas ligadas ao polímero, e a concentração da molécula na solução. Equação 9.

$$K_p = \frac{Q}{C} \quad (9)$$

A partir do valor encontrado na Equação 10, pode-se chegar ao valor do fator de separação (α), o qual é definido pela razão entre os dois coeficientes de partição para a molécula 1, analito (K_{p1}), e para a molécula 2, interferente (K_{p2}), conforme exibido na Equação 10.

$$\alpha = \frac{K_{p1}}{K_{p2}} \quad (10)$$

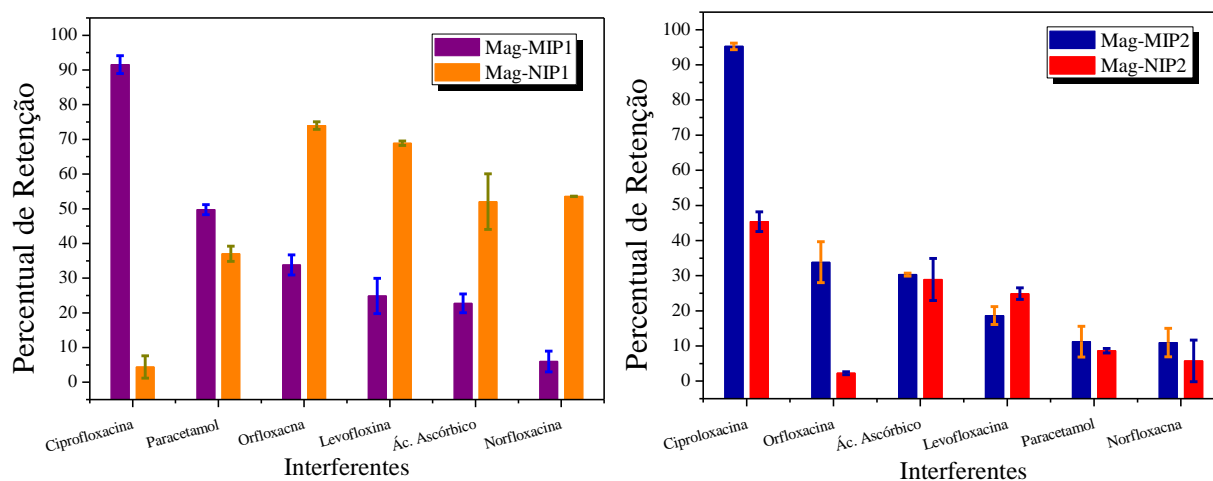
Entretanto, a característica que proporciona a paridade entre o Mag-MIP e Mag-NIP é o fator de impressão (I), expresso na Equação 11. O valor de I é obtido pela razão entre coeficiente de partição de uma molécula em um polímero impresso, K_p Mag-MIP, e o coeficiente de partição em um polímero não impresso, K_p Mag-NIP, ambos definidos pela Equação 11.

$$I = \frac{K_p \text{Mag-MIP}}{K_p \text{Mag-NIP}} \quad (11)$$

O valor de I obtido para o analito utilizado na síntese do Mag-MIP dever ser superior ao obtido para os interferentes. É esta relação do fator de impressão da molécula molde em relação ao interferente que determina o fator de seletividade (S) de um polímero, ou seja, toma-se a razão do fator de impressão para as duas substâncias diferentes, I_1 para a molécula molde (ciprofloxacina) e I_2 para um interferente, conforme definido pela Equação 12.

$$S = \frac{I_1}{I_2} \quad (12)$$

Figura 30 – Percentual de retenção de diferentes interferentes para avaliação dos parâmetros de seletividade. Em (a) Mag-MIP1/Mag-NIP1; massa de polímero de 5 mg; dispersos em solução aquosa de ciprofloxacina, norfloxacina, orfloxacina, levofloxacina, ácido ascórbico e paracetamol na concentração de de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por um tempo de interação de 120 min. (b) Mag-MIP2/Mag-NIP2; massa de polímero de 5 mg; dispersos em meio 70:30 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (v/v) de ciprofloxacina, norfloxacina, orfloxacina, levofloxacina, ácido ascórbico e paracetamol na concentração de de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por um tempo de interação de 30 min.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 – Parâmetros relacionados ao efeito de impressão do Mag-MIP1/Mag-NIP1.

Interferentes	Q-Mag-MIP1 (mg g^{-1})	Q-Mag-NIP1 (mg g^{-1})	Kp-Mag-MIP1 (mL g^{-1})	Kp-Mag-NIP1 (mL g^{-1})	α -Mag-MIP1	α -Mag-NIP1	I-Mag1	S-Mag1
Ciprofloxacina	2,91	2,10	1,59	1,13	-	-	1,39	-
Norfloxacina	29,75	29,74	18,64	18,62	0,085	0,06	1,00	1,39
Orfloxacina	3,17	3,63	1,74	2,02	0,90	0,57	0,86	1,61
Levofloxacina	3,14	3,65	1,73	2,02	0,92	0,56	0,85	1,62
Ácido ascórbico	2,83	2,83	3,23	3,22	0,49	0,35	1,00	1,39
Paracetamol	1,69	1,33	2,22	1,75	0,72	0,65	1,27	1,09

Fonte: Próprio autor.

Tabela 10 – Parâmetros relacionados ao efeito de impressão do Mag-MIP2/Mag-NIP2.

Interferentes	Q-Mag-MIP2 (mg g^{-1})	Q-Mag-NIP2 (mg g^{-1})	Kp-Mag-MIP2 (mL g^{-1})	Kp-Mag-NIP2 (mL g^{-1})	α -Mag-MIP2	α -Mag-NIP2	I-Mag2	S-Mag2
Ciprofloxacina	1,03	0,35	0,56	0,19			2,88	
Norfloxacina	0,15	0,14	0,09	0,09	5,75	2,07	1,03	2,77
Orfloxacina	3,05	2,65	1,69	1,4	0,33	0,13	1,15	2,50
Levofloxacina	2,32	2,40	1,28	1,33	0,43	0,14	0,96	2,98
Ácido ascórbico	0,56	0,50	0,64	0,57	0,87	0,33	1,11	2,60
Paracetamol	0,82	0,89	1,09	1,18	0,51	0,16	0,92	3,12

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 30a, pode-se observar que os valores de percentual de retenção de todos os interferentes foram superiores para o Mag-NIP1 em relação ao exibido pela ciprofloxacina. Os valores apresentados podem ser explicados pela presença de grupos hidroxílica (OH) na estrutura molecular de todos os interferentes analisados, os quais são passíveis de realizarem ligações de hidrogênio com o ácido acrílico contido na estrutura do polímero, que está desprotonado no pH em que solução de dispersão se encontra, pH 6,7.

No entanto os valores de percentual de retenção dos interferentes para Mag-MIP1 foram inferiores, como era esperado, devido a estrutura molecular dos interferentes que são análogas a ciprofloxacina conterem substituintes na posição C6 e N1 diferentes dos contidos na ciprofloxacina, dificultando assim a entrada na cavidade seletiva formada no Mag-MIP1.

Na figura 30b, é observado que os valores de percentual de retenção exibidos por todos os interferentes para o Mag-MIP2 foram inferiores aos valores exibidos pela ciprofloxacina. Esses valores podem ser explicados pela presença dos dois monômeros funcionais contidos no polímero impresso, o ácido acrílico e o 1-vinilimidazol, proporcionando assim uma maior especificidade da cavidade formada, e dificultando a formação de ligações inespecíficas entre os interferentes e o polímero impresso. Em relação ao Mag-NIP2, a exibição de valores inferiores do percentual de retenção pode ser explicada por uma possível ligação entre o ácido acrílico e do 1-vinilimidazol, assim expondo em menor número os radicais passíveis de realizarem ligações com os interferentes analisados.

Pode-se observar na tabela 5 que o valor encontrado para S utilizando Mag-MIP1/Mag-NIP1 para todos os interferentes analisados foi superior a 1,00. Na tabela 6 é notório também que os valores de S empregando o Mag-MIP2/Mag-NIP2 para todos os interferentes foi superior 2,00, evidenciando assim que o uso de dois monômeros funcionais favorece a seletividade dos polímeros impressos. Esses valores corroboram com a hipótese de como se dá a formação das ligações entre os interferentes analisados nesta etapa e os polímeros impressos desenvolvidas no presente trabalho.

4.6.5. Aplicação em amostras de leite bovino

Após todas as etapas de síntese, caracterização e avaliação da eficiência dos Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2, foram realizados experimentos de adsorção e dessorção em amostras comerciais de leite integral e desnatado com o intuito de avaliarmos a viabilidade de aplicação dos materiais desenvolvidos.

A etapa de adsorção tem como finalidade aferir a porcentagem de retenção da ciprofloxacina em amostras de leite previamente tratadas descritas no item 3.6.1. A Tabela 11 exibe os valores de %Ret de Mag-MIP1/Mag-NIP1 e Mag-MIP2/Mag-NIP2 para as amostras de leite integral e desnatado.

Tabela 11 – Aplicação dos polímeros sintetizados em amostras de leite diluídas 200 vezes. Massa de polímero 5 mg; dispersos por 120 min em 1,0 mL de solução aquosa de ciprofloxacina preparada na amostra de leite integral e desnatado nas concentrações de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Mag-MIP1/Mag-NIP1, e por 30 min em 1,0 mL de uma solução 70:30 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (v/v) de ciprofloxacina preparada na amostra de leite integral e desnatado nas concentrações de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Mag-MIP2/Mag-NIP2.

Adsorção								
	Integral				Desnatado			
	Mag-MIP1	Mag-NIP1	Mag-MIP2	Mag-NIP2	Mag-MIP1	Mag-NIP1	Mag-MIP2	Mag-NIP2
5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	92,83	58,52	68,07	32,58	76,52	69,14	63,65	32,61
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	71,99	53,69	71,162	59,98	79,74	64,58	65,55	52,35
50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	64,17	48,01	59,46	45,67	72,73	47,08	56,71	38,69

Fonte: Próprio autor.

Pode-se observar que os valores de porcentagem de adsorção para Mag-MIP1 e Mag-MIP2 foram praticamente constantes apresentando valores médios de porcentagem de adsorção aproximadamente 75,00%. Evidenciando que os dois polímeros impressos desenvolvidos não apresentaram efeito de matriz significativos, pois os resultados obtidos no decorrer da otimização da metodologia de análise para Mag-MIP1 e Mag-MIP2 foram aproximadamente de 95%.

Em seguida foi realizado o experimento de dessorção, item 3.6.2, o qual teve como intuito avaliar a capacidade de extração da ciprofloxacina das cavidades dos materiais desenvolvidos. O objetivo central deste procedimento é constatar que os polímeros impressos sintetizados podem ser empregados em uma situação real de laboratório ou setor de controle de qualidade, pois o Mag-MIP irá atuar como uma fase extratora na amostra de leite e o processo de dessorção possibilita aferir o qual a concentração de ciprofloxacina está na presente na amostra. Os valores de porcentagem recuperação estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Percentual de recuperação das concentrações de concentrações de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, massa polimérica de 5 mg, tempo total de dessorção de 120 min para Mag-MIP1/Mag-NIP1 Mag-MIP2/Mag-NIP2 em amostras de leite integral desnatado.

Dessorção								
	Integral				Desnatado			
	Mag-MIP1	Mag-NIP1	Mag-MIP2	Mag-NIP2	Mag-MIP1	Mag-NIP1	Mag-MIP2	Mag-NIP2
5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	98,27	93,32	73,25	22,41	98,27	93,32	43,19	25,15
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	92,43	75,16	72,54	34,22	93,11	75,06	30,34	18,84
50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	76,82	79,31	48,01	24,44	86,37	79,31	62,47	21,15

Fonte: Próprio autor.

Observando os resultados apresentados na Tabela 12 pode-se concluir que em termos de %Recuperação de analito do polímero impresso o Mag-MIP1/Mag-NIP1 apresentou valores médios de aproximadamente 89,1% para Mag-MIP1 e 82,6% para Mag-NIP1, para as amostras de leite integral e; para as de leite desnatado sendo de 92,6% para o MIP1 e 82,5% para o NIP1. Quando calculados os valores da %Recuperação com o Mag-MIP2/Mag-NIP2 os valores médio foram para o leite integral de aproximadamente 65% e 27% respectivamente; e para as amostras de leite desnatado de 45,3% e 21,7% nessa ordem. Em todos os casos pode-se observar a eficiência superior dos MIP em comparação aos seus correspondentes NIP.

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que o emprego do Mag-MIP1 como fase extratora em amostras de leite integral e desnatado é extremamente eficiente, pois este demonstrou valores de percentual de retenção e de recuperação superiores aos exibidos pelo Mag-MIP2. Essa menor eficiência apresentada pelo Mag-MIP2 conclui que o uso de dois monômeros funcionais para a síntese de polímero molecularmente impresso sobre nanopartículas magnéticas para ciprofloxacina não causam aprimoramento da eficiência de retenção nos experimentos que foram utilizados amostras comerciais de leite.

5 Conclusões

Foi possível realizar a síntese do MIP para a ciprofloxacina pelo método de precipitação através do método convencional, tendo como parâmetros de partida dados presentes na literatura. No entanto, após otimização da síntese foi necessário o aumento da quantidade de monômero estrutural para a realização da síntese do material.

Também neste trabalho foi possível concluir que a síntese das nanopartículas magnéticas, sua modificação com TEOS e silanização com MPS, bem como seu recobrimento com o MIP foram efetivas. Mostrando que a síntese dos MIP sobre a superfície das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro expõe de maneira mais eficiente às cavidades seletivas formadas no MIP, desta maneira favorecendo a interação que ocorre entre a ciprofloxacina e o MIP explicando o melhor desempenho quando comparado pelo MIP convencional sintetizado inicialmente.

Em relação às características físicas apresentadas por Mag-MIP1 e Mag-MIP2, foi observado que o uso de dois monômeros funcionais não altera de forma relevante na estrutura do material. Porém, o Mag-MIP2 apresentou algumas características diferenciadas em relação ao polímero sintetizado com apenas um monômero como seletividade e rapidez na interação com seu analito. Adicionalmente, o Mag-MIP1 e o Mag-MIP2 apresentaram percentuais de retenção na adsorção da ciprofloxacina nos estudos de otimização e aplicação próximos a 90%. Desta maneira inovando no presente grupo de pesquisa e contribuindo com a área de polímeros molecularmente impressos no mundo.

No que se refere as aplicações em amostras de leite bovino utilizando o procedimento de extração em fase sólida dispersiva (DSE), os Mag-MIP1 e o Mag-MIP2 apresentaram valores similares de retenção (aproximadamente 90%). Já avaliando os dados obtidos após a dessorção do analito, o Mag-MIP1 exibiu valores de percentual de recuperação superiores ao Mag-MIP2 nas condições avaliadas. Entretanto, neste estágio da pesquisa a aplicação dos Mag-MIP2 não foi bem-sucedida para as análises em leite, pois a presença de dois monômeros funcionais favoreceu aumento da força de interação existente entre a cavidade específica formada no Mag-MIP2 dificultando assim a saída da ciprofloxacina. Dessa maneira um aumento do tempo de dessorção e/ou maiores quantidades de solvente poderão favorecer a saída da ciprofloxacina da cavidade. Estudos adicionais deverão ser realizados para otimizar esse procedimento e obter resultados satisfatórios e mostrar a eficiência e potencialidade do Mag-MIP2 neste tipo de amostras.

6 Referências

- 1 Connor, W.R. **Thucydides**. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 1984.
- 2 Darling, R.G.; Catlett, C.L.; et al. Threats in bioterrorism I: CDC category a agents. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 20, n. 2, p. 273–309, 2002.
- 3 Martin, S. **A Short History of Disease: plagues, poxes and civilisations**. London: 2015.
- 4 Farhi, D.; Dupin, N. Origins of syphilis and management in the immunocompetent patient: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 5, p. 533–538, 2010.
- 5 Tortora, G.J.; Funke, B.R.; et al. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed Editora SA, 2012.
- 6 Dobell, C.; Leeuwenhoek, A. van **Antony van Leeuwenhoek and his “Little animals”; being some account of the father of protozoology and bacteriology and his multifarious discoveries in these disciplines**. New York: Harcourt, Brace and Company, 1932.
- 7 Boone, D.R.; Castenholz, R.W.; et al. **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria**. New York, NY: Springer New York, 2001.
- 8 Dictionary, O.E. (2006). Etymology of the word bacteria.
- 9 Parke, E.C. Flies from meat and wasps from trees: Reevaluating Francesco Redi’s spontaneous generation experiments. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 45, p. 34–42, 2014.
- 10 Ross, L.N.; Woodward, J.F. Koch’s postulates: An interventionist perspective. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 59, p. 35–46, 2016.
- 11 Singh, V.P.; Proctor, S.D.; et al. Koch’s postulates, microbial dysbiosis and inflammatory bowel disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 7, p. 594–599, 2016.
- 12 Aminov, R.I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. DEC, p. 1–7, 2010.
- 13 Frith, J. Arsenic – the “Poison of Kings” and the “Saviour of Syphilis”. **Journal of Military and Veteran’s Health**, v. 21, n. 4, p. 11–18, 2013.
- 14 Rang, H.P.; Dale, M.M.; et al. **Rang and Dale’s pharmacology**. London: 2016.
- 15 Williams, K. The introduction of ‘chemotherapy’ using arsphenamine – the first magic bullet. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 102, n. 8, p. 343–348, 2009.
- 16 Sykes, R. Penicillin: From discovery to product. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 778–779, 2001.
- 17 Tan, S.Y.; Tatsumura, Y. Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin.

Singapore Medical Journal, v. 56, n. 7, p. 366–367, 2015.

18 Wong, W.R.; Oliver, A.G.; et al. Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 11, p. 1483–1495, 2012.

19 Bisacchi, G.S. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story”. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 4874–4882, 2015.

20 Leshner, G.Y.; Froelich, E.J.; et al. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1063–1065, 1962.

21 Aminov, R. History of antimicrobial drug discovery-major classes and health impact. v. 133, p. 4–19, 2017.

22 Appelbaum, P.C.; Hunter, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 1, p. 5–15, 2000.

23 Irikura, T. Piperazinyl Derivatives of Quinoline Carboxylic Acids. p. 1–10, 1979.

24 Koga, H.; Itoh, A.; et al. Structure-Activity Relationships of Antibacterial 6,7- and 7,8-Disubstituted 1-Alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acids. **J. Med. Chem.**, v. 9, n. 2, p. 1358–1363, 1980.

25 Shah, P.M. Ciprofloxacin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 1, p. 75–96, 1991.

26 Bambeke, F. Van; Michot, J.M.; et al. Quinolones in 2005: An update. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 4, p. 256–280, 2005.

27 Pubchem - open chemistry database. Bethesda. National Center for Biotechnology Information, U.. (2015). Ciprofloxacin. *National Library of Medicine, 2015. Ciprofloxacin.*

28 Aldred, K.J.; Kerns, R.J.; et al. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565–1574, 2014.

29 Champoux, J.J. DNA TOPOISOMERASES : Structure , Function , and Mechanism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 369–413, 2001.

30 Levine, C.; Hiasa, H.; et al. DNA gyrase and topoisomerase IV: Biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1400, n. 1–3, p. 29–43, 1998.

31 Devreese, M.; Antonissen, G.; et al. Effect of administration route and dose escalation on plasma and intestinal concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin in broiler chickens. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 289, 2014.

32 Jinqing, J.; Haitang, Z.; et al. Development of an Heterologous Immunoassay for Ciprofloxacin Residue in Milk. **Physics Procedia**, v. 25, p. 1829–1836, 2012.

- 33 Jorge, L.L.; Rezende, M.L.G. Avaliação da eficácia terapêutica da Ciprofloxacina *, administrada pela via intramamária , em vacas em lactação. **A Hora Veterinária**, v. 32, n. 190, p. 23–27, 2012.
- 34 Morales-Gutiérrez, F.J.; Barbosa, J.; et al. Metabolic study of enrofloxacin and metabolic profile modifications in broiler chicken tissues after drug administration. **Food Chemistry**, v. 172, p. 30–39, 2015.
- 35 Naber, K.G.; Busch, W.; et al. Ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis: a prospective, non-comparative multicentre clinical trial with long-term follow-up. The German Prostatitis Study Group. **Int J Antimicrob Agents**, v. 14, n. 2, p. 143–149, 2000.
- 36 Stein, G.E.; Schooley, S.; et al. Urinary pharmacodynamics of low-dose ciprofloxacin and ofloxacin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, n. 4, p. 261–265, 1998.
- 37 Talan, D.A.; Naber, K.G.; et al. Extended-release ciprofloxacin (Cipro XR) for treatment of urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. SUPPL. 1, p. 54–66, 2004.
- 38 Hsieh, W.-J.; Lin, H.-C.; et al. The effect of ciprofloxacin in the prevention of bacterial infection in patients with cirrhosis after upper gastrointestinal bleeding. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 6, p. 962–966, 1998.
- 39 Kusachi, S.; Sumiyama, Y.; et al. Evaluation of the efficacy and safety of intravenous ciprofloxacin versus meropenem in the treatment of postoperative infection. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 2, p. 152–159, 2012.
- 40 Mikamo, H.; Ninomiya, M.; et al. Pharmacokinetics of single-dose intravenous ciprofloxacin in blood and ascites of patients with pelvic peritonitis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 9, n. 3, p. 276–277, 2003.
- 41 Antonela Antoniu, S. Inhaled ciprofloxacin for chronic airways infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1439–1446, 2012.
- 42 Chono, S.; Tanino, T.; et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Efficacy of Intrapulmonary Administration of Ciprofloxacin for the Treatment of Respiratory Infections. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 22, n. 2, p. 88–95, 2007.
- 43 Principi, N.; Esposito, S. Appropriate use of fluorquinolones in children. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 341–346, 2015.
- 44 Burkhardt, J.E.; Hill, M.A.; et al. Morphologic and biochemical changes in articular cartilages of immature beagle dogs dosed with difloxacin. **Toxicologic Pathology**, v. 20, n. 2, p. 246–252, 1992.
- 45 Melhus, A. Fluoroquinolones and tendon disorders. **Expert opinion on drug safety**, v. 4, n. 2, p. 299–309, 2005.

- 46 Tsai, W.; Yang, Y. Fluoroquinolone-associated Tendinopathy. p. 461–467, 2011.
- 47 AOUN, M. Peripheral neuropathy associated with fluoroquinolones. **The Lancet**, v. 340, n. 8811, p. 127, 1992.
- 48 Ghavanini, A.A. Do Fluoroquinolones Cause Neuropathy? **Jornaul of Neurology e Neurosurgery**, v. 3, n. 1, p. 2–4, 2017.
- 49 Grill, M.F.; Maganti, R.K. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: Management considerations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 381–393, 2011.
- 50 Hedenmalm, K.; Spigset, O. Peripheral sensory disturbances related to treatment with fluoroquinolone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 1–7, 2005.
- 51 Adikwu, E.; Brambaifa, N. Ciprofloxacin Cardiotoxicity and Hepatotoxicity in Humans and Animals. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 03, n. 02, p. 207–213, 2012.
- 52 Alshammari, T.M.; Larrat, E.P. The Risk of Hepatotoxicity with Fluoroquinolones : A National Case-Control Safety Study. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 71, n. 1, p. 37–43, 2014.
- 53 Qutrio Baloch, Z.; Raza, M.A.; et al. Ciprofloxacin-induced Hepatotoxicity in a Healthy Young Adult. **Cureus**, v. 9, n. 2, p. 8–11, 2017.
- 54 Unger, C.; Al-Jashaami, L.S. Ciprofloxacin exposure leading to fatal hepatotoxicity: An unusual correlation. **American Journal of Case Reports**, v. 17, p. 676–681, 2016.
- 55 Kary, N. El; Rassy, E. El; et al. Ciprofloxacin and imipenem resistance and cross-resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A single institution experience. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 12, p. 1736–1737, 2016.
- 56 Moreira da Silva, R.C.R.; Oliveira Martins Júnior, P. de; et al. Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p. 61–67, 2017.
- 57 Ory, J.; Bricheux, G.; Togola, A.; Bonnet, J.L.; et al. Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent. **Environmental Pollution**, v. 214, p. 635–645, 2016.
- 58 Wang, Z.; Li, Y.; et al. A detection and confirmation strategy for screening of veterinary drugs in honey by liquid chromatography coupled quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 59–68, 2018.
- 59 REGULATION, C. (2009). On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. 1–33.
- 60 Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 5 11, DE 07 DE MAIO DE 2014**. 2014.

- 61 Vella, J.; Busuttill, F.; et al. A simple HPLC – UV method for the determination of ciprofloxacin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 989, p. 80–85, 2015.
- 62 Muchohi, S.N., Thuo, N., Karisa, J., Muturi, A., Kokwaro, G.O., & Maitland, K. (2011). Determination of ciprofloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Application to a population pharmacokinetics study in children with severe malnutrition. *Journal of Chromatography B*, 879(2) , 146–152.
- 63 Smet, J. De, Boussery, K., Colpaert, K., Sutter, P. De, Paepe, P. De, Decruyenaere, J., & Bocxlaer, J. Van (2009). Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: A bio-analytical HPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(10) , 961–967.
- 64 He, K.; Blaney, L. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 96–105, 2015.
- 65 Díaz-Quiroz, C.A.; Francisco Hernández-Chávez, J.; et al. Simultaneous quantification of antibiotics in wastewater from pig farms by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, n. December 2017, p. 386–393, 2018.
- 66 Bannefeld, K.H.; Stass, H.; et al. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, an adequate alternative to high-performance liquid chromatography, for the determination of ciprofloxacin and its metabolite desethyleneciprofloxacin in human plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 692, n. 2, p. 453–459, 1997.
- 67 Emaldi, P.; Fapanni, S.; et al. Validation of a capillary electrophoresis method for the determination of cephadrine and its related impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 711, n. 2, p. 339–346, 1995.
- 68 Orlandini, S.; Gotti, R.; et al. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: a critical review. **J Pharm Biomed Anal**, v. 87, p. 290–307, 2014.
- 69 Tavares, M.F.M. MECANISMOS DE SEPARAÇÃO EM ELETROFORESE CAPILAR. **QUÍMICA NOVA**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.
- 70 Vaz, F.A.S.; Oliveira, C.L.M. de; et al. FUNDAMENTALS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS: AN ANIMATION APPROACH. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288–291, 2015.
- 71 Xu, X.; Liu, L.; et al. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in foods of animal origin by capillary electrophoresis with field amplified sample stacking-sweeping technique. **Food Chemistry**, v. 176, p. 219–225, 2015.
- 72 Huang, B.; Yin, Y.; et al. Preparation of high-affinity rabbit monoclonal antibodies for ciprofloxacin and development of an indirect competitive ELISA for residues in milk. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 11, n. 10, p. 812–818, 2010.

- 73 Zhang, H.; Jiang, J.; et al. Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 12, n. 11, p. 884–891, 2011.
- 74 Yalow, R.S.; Berson, S.A. IMMUNOASSAY OF ENDOGENOUS PLASMA INSULIN IN MAN. **Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 7, p. 1157–1175, 1960.
- 75 Lequin, R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415–2418, 2005.
- 76 Duan, J.; Yuan, Z. Development of an Indirect Competitive ELISA for Ciprofloxacin Residues in Food Animal Edible Tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1087–1089, 2001.
- 77 Cinková, K.; Andrejčáková, D.; et al. Electrochemical method for point-of-care determination of ciprofloxacin using boron-doped diamond electrode. **Acta Chimica Slovaca**, v. 9, n. 2, p. 146–151, 2016.
- 78 Yi, H.; Li, C. Voltammetric determination of ciprofloxacin based on the enhancement effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) at carbon paste electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1377–1381, 2007.
- 79 Pham, A.T.S.H.; Mahon, P.J.; et al. Hybrid Graphene Based Nanomaterial as Highly Efficient Catalyst for the Electrochemical Determination of Ciprofloxacin. **International Journal of Materials and Metallurgical Engineering**, v. 12, n. 2, p. 73614, 2018.
- 80 Bagheri, H.; Khoshshafar, H.; et al. Fabrication of an electrochemical sensor based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of ciprofloxacin. **Analytical Methods**, v. 8, n. 16, p. 3383–3390, 2016.
- 81 Fotouhi, L.; Alahyari, M. Electrochemical behavior and analytical application of ciprofloxacin using a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 110–114, 2010.
- 82 Karimi-Maleh, H.; Bananezhad, A.; et al. Surface amplification of pencil graphite electrode with polypyrrole and reduced graphene oxide for fabrication of a guanine/adenine DNA based electrochemical biosensors for determination of didanosine anticancer drug. **Applied Surface Science**, v. 441, p. 55–60, 2018.
- 83 LIM, S.A.; AHMED, M.U. A Simple DNA-based Electrochemical Biosensor for Highly Sensitive Detection of Ciprofloxacin Using Disposable Graphene. **Analytical Sciences**, v. 32, n. 6, p. 687–693, 2016.
- 84 Arshady, R.; Mosbach, K. Synthesis of Substrate-selective Polymers by Host-Guest Polymerization. v. 692, p. 687–692, 1981.
- 85 Marestoni, L.D.; Wong, A.; et al. Semi-Empirical Quantum Chemistry Method for Pre-Polymerization Rational Design of Ciprofloxacin Imprinted Polymer and Adsorption Studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2015.

- 86 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 César Ricardo Teixeira Tarley, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor e Lauro Tatsuo Kubota*. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.
- 87 Pap, T.; Horváth, V.; et al. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, n. 6, p. 2005, 2005.
- 88 Matsui, J.; Okada, M.; et al. Solid-phase Extraction of a Triazine Herbicide Using a Molecularly Imprinted Synthetic Receptor. **Analytical Communications**, v. 34, n. 3, p. 85–87, 1997.
- 89 Foguel, M.V.; Pedro, N.T.B.; et al. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective adsorption and quantification of Acid Green 16 textile dye in water samples. **Talanta**, v. 170, 2017.
- 90 Marestoni, L.; Wong, A.; et al. Optimization and Application of Imprinted Poly(AA-EGDMA) for Solid Phase Extraction of Ciprofloxacin in Artificial Urine. **Current Drug Therapy**, v. 9, n. 4, p. 270–276, 2015.
- 91 Marestoni, L.D.; Wong, A.; et al. Semi-Empirical Quantum Chemistry Method for Pre-Polymerization Rational Design of Ciprofloxacin Imprinted Polymer and Adsorption Studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 109–118, 2016.
- 92 Masqué, N.; Marcé, R.M.; et al. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 384–394, 1998.
- 93 Zarbin, A.J.G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.
- 94 Rovatti Pupin, R., Claro Monteiro, G., et al. Molecularly imprinted polymers (MIP): from the bulk synthesis to hybrid material to classic and new applications. In: T QUINN (Ed.); **Molecularly imprinted polymers (MIPs): challenges, uses and prospects**. 2016, p. 43–118.
- 95 Gupta, A.K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005.
- 96 Abbas, M.; Takahashi, M.; et al. Facile sonochemical synthesis of high-moment magnetite (Fe₃O₄) nanocube. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1354, 2013.
- 97 Togashi, T.; Umetsu, M.; et al. One-pot hydrothermal synthesis of an assembly of magnetite nanoneedles on a scaffold of cyclic-diphenylalanine nanorods. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 9, p. 3991–3999, 2011.
- 98 Sathish, S.; Balakumar, S. Influence of physicochemical interactions of capping agent on magnetic properties of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 173, p. 364–371, 2016.

- 99 Ramimoghadam, D.; Bagheri, S.; et al. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 368, p. 207–229, 2014.
- 100 Lv, Y.-K.; Yang, L.; et al. Preparation and evaluation of a novel molecularly imprinted hybrid composite monolithic column for on-line solid-phase extraction coupled with HPLC to detect trace fluoroquinolone residues in milk. **Analytical Methods**, v. 5, n. 7, p. 1848, 2013.
- 101 Sorribes-Soriano, A.; Esteve-Turrillas, F.A.; et al. Magnetic molecularly imprinted polymers for the selective determination of cocaine by ion mobility spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1545, p. 22–31, 2018.
- 102 Li, J.; Zhou, Q.; et al. Iron-based magnetic molecular imprinted polymers and their application in removal and determination of di-n-pentyl phthalate in aqueous media. 2017.
- 103 Boitard, C.; Bée, A.; et al. Magnetic protein imprinted polymers: A review. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 11, p. 1563–1580, 2018.
- 104 Ming, W.; Wang, X.; et al. Magnetic molecularly imprinted polymers for the fluorescent detection of trace 17 β -estradiol in environmental water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 1309–1315, 2017.
- 105 Yu, X.; Liu, H.; et al. Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for separating aromatic amines from azo dyes – Synthesis, characterization and application. **Separation and Purification Technology**, v. 204, p. 213–219, 2018.
- 106 Shi, X.-R.; Chen, X.-L.; et al. Magnetic metal-organic frameworks for fast and efficient solid-phase extraction of six Sudan dyes in tomato sauce. **Journal of Chromatography B**, v. 1086, p. 146–152, 2018.
- 107 Luo, X.; Zhan, Y.; et al. Removal of water-soluble acid dyes from water environment using a novel magnetic molecularly imprinted polymer. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1–3, p. 274–282, 2011.
- 108 Xie, X.; Chen, L.; et al. Synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers by reversible addition fragmentation chain transfer strategy and its application in the Sudan dyes residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1405, p. 32–39, 2015.
- 109 Lian, Z.; Wang, J. Selective detection of chloramphenicol based on molecularly imprinted solid-phase extraction in seawater from Jiaozhou Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, p. 750–755, 2018.
- 110 Zhou, Y.; Zhou, T.; et al. Rapid and selective extraction of multiple macrolide antibiotics in foodstuff samples based on magnetic molecularly imprinted polymers. **Talanta**, v. 137, p. 1–10, 2015.
- 111 Hu, Y.; Wang, C.; et al. Preparation and application of epitope magnetic molecularly imprinted polymers for enrichment of sulfonamide antibiotics in water. **ELECTROPHORESIS**, v. 38, n. 19, p. 2462–2467, 2017.

- 112 Kumar, N.; Narayanan, N.; et al. Application of magnetic molecularly imprinted polymers for extraction of imidacloprid from eggplant and honey. **Food Chemistry**, v. 255, p. 81–88, 2018.
- 113 Khan, S.; Hussain, S.; et al. Synthesis and characterization of magnetic-molecularly imprinted polymers for the HPLC-UV analysis of ametryn. **Reactive and Functional Polymers**, v. 122, p. 175–182, 2018.
- 114 Ji, W.; Sun, R.; et al. Selective solid phase extraction of chloroacetamide herbicides from environmental water samples by amphiphilic magnetic molecularly imprinted polymers. **Talanta**, v. 170, p. 111–118, 2017.
- 115 Li, H.; Xie, T.; et al. Core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for the extraction of triazophos residues from vegetables. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 4, p. 1011–1019, 2017.
- 116 Yáñez-Sedeño, P.; Campuzano, S.; et al. Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 960, p. 1–17, 2017.
- 117 Han, Q.; Shen, X.; et al. Magnetic sensing film based on Fe₃O₄@Au-GSH molecularly imprinted polymers for the electrochemical detection of estradiol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 180–186, 2016.
- 118 Valero-Navarro, A.; Medina-Castillo, A.L.; et al. Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4520–4525, 2011.
- 119 Haupt, K.; Mosbach, K. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2495–2504, 2000.
- 120 Zhu, L.; Cao, Y.; et al. Electrochemical sensor based on magnetic molecularly imprinted nanoparticles at surfactant modified magnetic electrode for determination of bisphenol A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 258–261, 2014.
- 121 Tang, Y.; Liu, H.; et al. Upconversion particle@Fe₃O₄ @molecularly imprinted polymer with controllable shell thickness as high-performance fluorescent probe for sensing quinolones. **Talanta**, v. 181, p. 95–103, 2018.
- 122 Sari, E.; Üzek, R.; et al. Detection of ciprofloxacin through surface plasmon resonance nanosensor with specific recognition sites. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 11, p. 1302–1318, 2018.
- 123 TONG, Y.; HU, Y.; et al. Preparation of a novel magnetic molecularly imprinted polymer and its application for the determination of fluoroquinolone antibiotics. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 35, n. 3, p. 291, 2017.
- 124 Guan, X.; Cheng, T.; et al. Preparation of polysulfone materials on nickel foam for solid-phase microextraction of floxacin in water and biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 12, p. 3127–3133, 2017.

- 125 Oliveira, H.M.V.; Moreira, F.T.C.; et al. Ciprofloxacin-imprinted polymeric receptors as ionophores for potentiometric transduction. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 2017–2023, 2011.
- 126 Perini, J.A. de L.; Silva, B.F.; et al. Zero-valent iron mediated degradation of ciprofloxacin - Assessment of adsorption, operational parameters and degradation products. **Chemosphere**, v. 117, n. 1, p. 345–352, 2014.
- 127 Coutinho, F.M.B.; Gomes, A.S. PRINCIPAIS MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DA POROSIDADE DE RESINAS À BASE DE DIVINILBENZENO. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808–818, 2001.
- 128 Marestoni, L.D., Sotomayor, M.D.P., & Tarley, C.R.T. (2014). Simulação computacional e síntese de polímero molecularmente impresso para extração em fase sólida (MISPE) de Ciprofloxacina em urina.
- 129 Kong, X.; Gao, R.; et al. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymers (Fe₃O₄@MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 8–16, 2012.
- 130 Hu, Y.; Feng, S.; et al. Detection of melamine in milk using molecularly imprinted polymers-surface enhanced Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 176, p. 123–129, 2015.
- 131 Saini, S.; Frankel, R.; et al. Magnetism: a primer and review. **American Journal of Roentgenology**, v. 150, n. 4, p. 735–743, 1988.
- 132 Sodipo, B.K.; Aziz, A.A. Recent Advances in Synthesis and Surface Modification of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Silica. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 416, p. 275–291, 2016.
- 133 Gregg, S.J.; Sing, K.S.W. Adsorption, Surface Area and Porosity. **Academic Press, London**, p. 1–39, 1982.