UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Luis Felipe Rodríguez Cabal

**Síntese e avaliação de polímeros
molecularmente impressos restritos a interação
com macromoléculas para determinação analítica
de sulfonamidas em matrizes complexas**

São Carlos

2014

Luis Felipe Rodríguez Cabal

Síntese e avaliação de polímeros molecularmente impressos restritos a interação com macromoléculas para determinação analítica de sulfonamidas em matrizes complexas.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos pelo amor e apoio incondicional
A Erika pelo amor e a cumplicidade

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me dar força nos momentos difíceis e pelas pessoas e oportunidades que colocou no meu caminho.

A minha família pelo amor e apoio incondicional.

A Erika pelo amor, companhia e cumplicidade.

Ao povo brasileiro que me aceitou como mais um brasileiro.

A Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pela oportunidade e pelos anos maravilhosos em suas instalações.

Ao meu orientador, Álvaro Jose dos Santos Neto, pela oportunidade, conhecimentos transmitidos, confiança, respeito, pelas aulas de português e especialmente pela sua dedicação. Obrigado por tudo professor.

Ao professor Fernando Mauro Lanças pelo apoio à pesquisa e por ter disponibilizado toda infraestrutura do CROMA para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca por aceitar e contribuir com a minha formação.

A Elaine Alves e ao Guilherme Titato, pela sua amabilidade, apoio e conselhos.

Aos meus amigos do grupo de Cromatografia. Especialmente ao Weliton pela paciência nas aulas de português e a irmandade, a Tanare e a Scarlet pela amizade e imensa colaboração neste trabalho e ao Rodrigo por não me deixar aposentar do futebol.

Ao Felipe, Adriel, Maura, Meire, Bruno, Arley, Maraissa, Leticia, Diego, Rose e Lucas, pelas risadas, companhia, amizade e os excelentes momentos de convivência.

Aos meus amigos Cristian, Irwin, Monica, Julio, David e Cesar.

Ao CNPq pela bolsa e apoio financeiro

A FAPESP (processo 2010/19910-9) e a CAPES

E mais uma vez, OBRIGADO BRASIL!!!!!!

“Viver e não ter a vergonha de ser feliz
Cantar e cantar e cantar
A beleza de ser um eterno aprendiz”

RESUMO

As sulfonamidas são antibióticos amplamente utilizados na medicina humana e animal. Por apresentarem um custo relativamente baixo, além de seu uso medicinal são comumente utilizadas como aditivos nos alimentos para promover o crescimento de animais. O alto consumo das sulfonamidas é preocupante, pois grandes quantidades desses compostos são descartadas no ambiente por meio de excreções humanas, excreções animais e por águas residuárias industriais e hospitalares. A presença de sulfonamidas no ambiente, mesmo em níveis de traços, pode gerar uma toxicidade direta nas espécies expostas bem como a proliferação seletiva de bactérias resistentes, que podem transferir os genes de resistência para outras espécies bacterianas. O impacto ambiental negativo ocasionado por esse tipo de composto exige o monitoramento adequado e o consequentemente desenvolvimento de técnicas e métodos de análise e de preparo de amostra que consigam atingir suficientes intervalos e limites de detecção.

Na atualidade a SPE é uma técnica bastante utilizada para extração de analitos em amostras ambientais, pois permite trabalhar com um consumo de solvente reduzido, sua reprodutibilidade é alta, o tempo de preparo de amostra é curto e permite a automatização. No formato automatizado on-line a fase extratora é empacotada em uma pré-coluna e ligada ao sistema cromatográfico geralmente por meio de uma válvula de seis pórticos. Dentre as possíveis fases para a SPE os polímeros molecularmente impressos (MIP) têm tornado-se atrativos por causa de sua alta seletividade em comparação com as fases extratoras tradicionais; além disso, permitem, mediante procedimentos simples, associar a tecnologia MIP com a tecnologia de materiais de acesso restrito - RAM (do inglês: restricted access media) obtendo assim os materiais RAM-MIP.

Nesse trabalho foi sintetizado e avaliado o desempenho de um polímero de impressão molecular (MIP), e três polímeros de impressão molecular restritos à ligação de macromoléculas (RAM-MIP, BSA-MIP e RAM-MIP-BSA) para a pré-concentração seletiva de sete sulfonamidas (SNs) em amostras complexas para análise em sistema HPLC-bidimensional.

Os materiais obtidos foram avaliados em termos de fator de retenção, seletividade, seletividade competitiva e capacidade de eliminação de macromoléculas. O polímero BSA-MIP apresentou os melhores resultados, demonstrando-se muito mais seletivo para sulfonamidas do que para alguns interferentes como fluoroquinolonas, cafeína, ácido acetilsalicílico entre outros, também demonstrou uma capacidade de exclusão de macromoléculas de 97,63% ao ser testado com uma solução de 44 mg mL⁻¹ de BSA.

ABSTRACT

Sulfonamides are antibiotics widely used in human and veterinary medicine. Due to their relatively low cost and their therapeutic effects, they are frequently employed as growth promoting additive in animal food. This high consumption causes that high amounts of them are being ejected to the environment through the animal and human excrements or industrial and hospital wastewater. Even in trace amount, these compounds can produce direct toxicity in several species and the selective spread of the antibiotic resistant bacteria that can transfer the resistance genes to others bacteria species. This negative impact has to be adequately monitored and, thus, there is a claim to the development of analytical and sample preparation techniques and methods that permit reaching to very low detection limits and intervals.

Currently solid phase extraction (SPE) is the technique commonly used for isolation of analytes from environmental samples, since it allows working with smaller volumes of solvent, shorter sample preparation times, achieving high reproducibility and allowing automation. In automated on-line SPE the extracted phase is packed into a precolumn and linked to the chromatographic system, generally by a 6-port valve. Among the possible phases for SPE the molecular imprinted polymer (MIP) has become interesting because it is more selective than traditional extraction; moreover, through simple procedure it can be associated with the restricted access media (RAM) producing the RAM-MIP and the MIP-BSA materials.

Here we synthesized and evaluated the performance of one MIP and three molecular imprinted polymers linked to macromolecules (RAM-MIP, BSA-MIP e RAM-MIP-BSA) for a selective preconcentration of seven sulfonamides in complex samples for two-dimensional HPLC analysis.

The synthesized materials was evaluated regarding the retention factor, competitive selectivity and elimination capacity of macromolecules. The BSA-MIP option showed the best results, achieving high selectivity for sulfonamides against others interferences such as fluoroquinolone, caffeine and acetylsalicylic acid; additionally presenting an exclusion capacity of 97,63% of macromolecules when was tested with a BSA solution at 44 mg ml⁻¹.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis rotas de contaminação por resíduos de antibióticos e transferência dos genes de resistência.	15
Figura 2 - (a) Estrutura do Ácido p-amino benzoico (b) Estrutura geral das sulfonamidas... ..	16
Figura 3 – Comparação das etapas no preparo de amostra off-line e on-line	18
Figura 4 - Esquema geral da síntese do MIP.....	20
Figura 5 - Funcionamento sistema Column Switching	23
Figura 6 - Representação do mecanismo de ação de uma partícula RAM.	24
Figura 7 - Sistema cromatográfico com duas etapas de pré-tratamento.	26
Figura 8 - Representação de uma partícula RAM-MIP	26
Figura 9 – Representação de uma partícula BSA-MIP	27
Figura 10 - Representação de uma partícula RAM-MIP-BSA.....	27
Figura 11 - (a) Ácido metacrílico (b) Etilenoglicol dimetacrilato (c) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (d) Hidróxi etilmetacrilato (e) Glicidil dimetacrilato (mistura de isômeros)	33
Figura 12 - Foto da montagem empregada na síntese dos polímeros	35
Figura 13 - Sistema de pressurização dos reagentes para recobrimento in situ dos polímeros.	37
Figura 14 – Esquema da configuração do cromatógrafo nos testes de eliminação de macromoléculas sem a pré-coluna.....	40
Figura 15 - Esquema da configuração do cromatógrafo nos testes de eliminação de macromoléculas contendo a pré-coluna.....	41
Figura 16 - Perfil da adsorção da sulfadimetoxina no MIP ao decorrer do tempo.....	50
Figura 17 - Cromatogramas dos testes de seletividade.1- Sulfadimetoxina vs cafeína; 2- Sulfadimetoxina vs norfloxacin; 3- Sulfadimetoxina vs sulfacetamida; 4- Sulfadimetoxina vs sulfametoxazol; 5- Sulfacetamida vs Cafeína.....	54
Figura 18 - Comparação da exclusão do MIP com a “re-injeção” do padrão	55
Figura 19 - Comparação da exclusão do RAM-MIP com a “re-injeção” do padrão	56
Figura 20 - Cromatogramas obtidos durante os testes de exclusão. a- RAM-MIP-BSA e padrão; b- MIP-BSA e padrão e c- Sobreposição de todos os cromatogramas advindos dos testes de exclusão.....	57
Figura 21 – Isoterma de Langmuir na adsorção de sulfadimetoxina no MIP sintetizado por precipitação	58
Figura 22 – Isoterma linearizada de Langmuir na adsorção de sulfadimetoxina no MIP sintetizado por precipitação	59

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura dos polímero MIP. A - MIP em batelada; B - MIP precipitação.	60
Figura 24 - Microscopia de varredura eletrônica do polímero RAM-MIP.	61
Figura 25 - Microscopia de varredura eletrônica dos polímeros. A - RAM-MIP-BSA; B – MIP-BSA.....	61
Figura 26 – Arranjo instrumental utilizado no sistema on-line (Carregamento-configuração 1).	62
Figura 27 - Arranjo instrumental utilizado no sistema on-line (Lavagem-configuração 2).....	63
Figura 28 - arranjo instrumental utilizado no sistema on-line (Dessorção-configuração 3)...	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura e massa molar dos compostos utilizados neste projeto (Continua)	31
Tabela 1 – Estrutura e massa molar dos compostos utilizados neste projeto (Conclusão)	32
Tabela 2 – Tempos de retenção das sulfonamidas em tampão amônio pH 9,0.	44
Tabela 3 - Tempos de retenção das sulfonamidas em tampão fosfato pH 7.	44
Tabela 4 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão acetato pH 4,5 e 30% de metanol como fase móvel.	45
Tabela 5 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão acetato pH 4,5 e 10% de metanol como fase móvel	45
Tabela 6 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão fosfato pH 2,0 e 30% de metanol como fase móvel	46
Tabela 7 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão fosfato pH 2,0 e 10% de metanol como fase móvel	47
Tabela 8 - Tempo de retenção para as sulfonamidas mais retidas no MIP e NIP sintetizados por precipitação	48
Tabela 9 –Valores de K e S para as sulfonamidas mais retidas	49
Tabela 10 - Tempo de retenção para as sulfonamidas menos retidas no MIP e NIP sintetizados por precipitação	49
Tabela 11 - Valores de K e S para as sulfonamidas menos retidas	49
Tabela 12 - Valores de K_d , k e k' para sulfadimetoxina vs cafeína	51
Tabela 13 – Valores de K_d , k e k' para sulfadimetoxina vs norfloxacino	51
Tabela 14 - Valores de K_d , k e k' para sulfadimetoxina vs sulfacetamida	52
Tabela 15 - Valores de K_d , k e k' para sulfadimetoxina vs sulfametoxazol	52
Tabela 16 - Valores de K_d , k e k' para sulfacetamida vs cafeína	52
Tabela 17 - Dados da linearidade para as sulfonamidas avaliadas	64
Tabela 18 - Dados obtidos para estudo da precisão intra-dia e inter-dia das sulfonamidas	65
Tabela 19 - Recuperação relativa	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN	2,2-azoisobutironitrila
ACN	Acetonitrila
AAS	Ácido acetilsalicílico
AS	Ácido salicílico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina bovina sérica
CAF	Cafeína
CAQ/IQSC/USP	Central de Análise Química Instrumental/ Instituto de Química de São Carlos/ Universidade de São Paulo
ENR	Enrofloxacino
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato
FDA	Food and Drug Administration
GDMA	Glicidil dimetacrilato
GMMA	Glicidil monometacrilato
MAA	Ácido metacrílico
HEMA	Hidróxi etil metacrilato
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Polímero de impressão molecular
MIP-BSA	Polímero de impressão molecular revestido com albumina sérica bovina
NIP	Polímero não impresso
NOR	Norfloxacino
RAM	Material de acesso restrito
RAM-MIP	Polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas
RAM-MIP-BSA	Polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas e revestido com albumina bovina sérica
SPE	Extração em fase sólida
SCT	Sulfacetamida
SCZ	Sulfacloropiridazina
SDX	Sulfadimetoxina
SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
SMT	Sulfametazina
SMX	Sulfametoxazol
STZ	Sulfatiazol
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1	Introdução	13
1.1	Sulfonamidas	15
1.2	Técnicas de preparo de amostra.....	17
1.3	Polímeros molecularmente impressos	19
1.4	Materiais de acesso restrito (RAM).....	23
1.5	Polímeros de impressão molecular restritos à ligação com macromoléculas	25
1.6	Validação de métodos analíticos	28
1.6.1	Precisão	28
1.6.2	Linearidade (curva de calibração).....	29
1.6.3	Recuperação (eficiência de extração)	29
2	Objetivos.....	30
2.1	Objetivos específicos	30
3.	Parte experimental	31
3.1	Materiais e reagentes.....	31
3.2	Equipamentos	33
3.3	Sínteses dos polímeros de impressão molecular	34
3.3.1	Sínteses do MIP e NIP	34
3.3.2	Sínteses do RAM-MIP e RAM-NIP	36
3.3.3	Síntese do BSA-MIP e BSA-NIP	36
3.3.4	Síntese do RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA	37
3.3.5	Retirada da molécula-molde.....	38
3.3.6	Caracterização dos polímeros	38
3.3.6.1	Microscopia eletrônica de varredura	38
3.3.6.2	Estudos de seletividade em coluna	38
3.3.6.3	Estudo cinético	39
3.3.6.4	Estudos de seletividade competitiva	39
3.3.6.5	Teste de eliminação de macromoléculas	40

3.3.6.6	Isoterma de adsorção	41
3.3.7	Empacotamento das colunas.....	41
3.3.8	Montagem do sistema bidimensional	42
3.3.9	Validação do método	42
4.1	Avaliação das metodologias sintéticas – testes de seletividade em coluna ...	43
4.2	Retirada da molécula molde.....	47
4.3	Preenchimento das colunas.....	48
4.4	Testes de seletividade em coluna.....	48
4.5	Estudo cinético	50
4.6	Testes de seletividade competitiva.....	51
4.7	Exclusão de macromoléculas	55
4.8	Isoterma de adsorção	57
4.9	Microscopia eletrônica de varredura	60
4.10	Otimização do sistema bidimensional.....	61
4.11	Validação	63
5	Conclusão.....	67

1 Introdução

A produção e consumo de produtos farmacêuticos têm aumentado muito nos últimos anos. Estudos confirmam que a velocidade de consumo e produção mundial está aumentando a uma taxa maior do que ao crescimento populacional. Na União Europeia até o ano de 2006, eram usadas aproximadamente 300 substâncias na medicina humana, entre estas, analgésicos, anti-inflamatórios, anticoncepcionais, antibióticos, betabloqueadores, reguladores lipídicos, substâncias psicoativas entre outras. Em alguns países como Alemanha, Inglaterra e Austrália as quantidades de substâncias farmacêuticas mais usadas estão na ordem de cem toneladas por ano. (1,2)

A medicina veterinária também faz uso dos produtos farmacêuticos e geralmente a utilização destes em animais é pouco fiscalizada pelos órgãos de controle. Consequentemente, grandes quantidades de medicamentos são administrados e também acumulados no corpo dos animais, de modo a contribuir com a presença de compostos químicos indesejáveis na cadeia alimentar, tanto de animais quanto de humanos. (3)

No ano 2004, a morte inusitada de três espécies de abutres na Índia e Paquistão despertou o interesse da comunidade científica. A população de abutres indianos de dorso branco (*Gyps bengalensis*) diminuiu mais que 95% a partir da década de 1990. Esse fenômeno foi percebido no parque nacional de Keoladeo (Rajasthan, Índia). Desde então, declínios catastróficos envolveram outras duas espécies de abutres (*Gyps indicus* e *Gyps tenuirostris*). A causa da morte foi associada com insuficiência renal e gota visceral. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (LC-MS) permitiram a detecção de concentrações entre 0,051 e 0,643 $\mu\text{g g}^{-1}$ de diclofenaco nos rins dos 25 animais estudados. O anti-inflamatório diclofenaco foi a única droga associada a esse tipo de toxicidade encontrada na pesquisa. Estudos posteriores demonstraram que o diclofenaco, administrado para tratar doenças em animais domésticos foi a causa da deficiência renal nos abutres. (4)

Os medicamentos são planejados para ter um modo específico de ação e a maior parte deles não sofrem alterações no organismo, portanto depois do uso, grandes

quantidades desses produtos são excretadas no ambiente ou descartadas incorretamente nos esgotos domésticos e hospitalares. (2)

Os produtos farmacêuticos presentes no meio ambiente representam um risco potencial para a saúde de pessoas e animais. Mesmo em quantidades traço, podem causar muitas doenças nos seres humanos, entre elas, câncer e mutações genéticas. Por outro lado, são numerosos os casos nos quais os produtos farmacêuticos colocaram em risco a saúde animal. Além da toxicidade direta (como foi relatado anteriormente no caso dos abutres), podem ocorrer fenômenos como o da feminilização de peixes por hormônios sexuais. (2,3)

O impacto ambiental negativo produzido pela presença de produtos farmacêuticos tem despertado o interesse da comunidade científica. Assim, esses compostos começaram a ser monitorados na década de setenta e já nas primeiras pesquisas as quantidades detectadas no meio ambiente mostraram-se preocupantes.

Uma classe importante de fármacos são os antibióticos, eles são empregados para combater infecções bacterianas nos seres humanos e nos animais. São numerosos os estudos que demonstraram a presença de antibióticos em diferentes fontes de água, incluindo efluentes municipais, águas residuárias e águas superficiais. Tong et al. relataram níveis de contaminação superiores a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ em alguns efluentes de agricultura animal, enquanto os níveis gerais oscilam na ordem de dezenas a centenas de ng L^{-1} , sendo encontrados níveis mais altos nos efluentes hospitalares e indústrias. No Brasil, um estudo recente demonstrou a presença de antibióticos na bacia do rio Atibaia, região de Campinas (SP). A maior parte dos antibióticos apresentou concentrações na ordem de ng L^{-1} ou menos, no entanto, a região com maior atividade antropogênica chegou a apresentar contaminações de 1,3 e $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para dois dos antibióticos. (5,6,7,8,9)

Do mesmo modo que outros medicamentos mencionados anteriormente, grandes quantidades de antibióticos não são completamente metabolizados durante o uso terapêutico, e assim, entram no ambiente de forma inalterada. Esse tipo de fármaco além de apresentar toxicidade direta pode conduzir a proliferação seletiva de bactérias resistentes quando há uma exposição prolongada a essas substâncias, mesmo em concentrações traço (Figura 1).

Figura 1 - Possíveis rotas de contaminação por resíduos de antibióticos e transferência dos genes de resistência.

Fonte: Adaptado de Baran et al., 2011.

1.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SNs) são uma família de antibióticos administradas com muita frequência e em grandes quantidades nos seres humanos, plantas e animais para o tratamento de infecções. As SNs foram os primeiros agentes microbianos utilizados clinicamente, sendo a sulfacrisoidina a primeira a ser utilizada (1935) na era moderna da quimioterapia antimicrobiana.(10,11)

As sulfonamidas são antibióticos considerados de amplo espectro, por serem ativas para a maioria das bactérias gram-negativas e também para muitas bactérias gram-positivas. Além da sua eficiência para tratar doenças bacterianas, também são usadas como aditivos em alimentos para auxiliar no crescimento de animais. Adicionalmente, são fármacos de baixo custo. Tudo isso contribui para que cerca de 2,3% do consumo mundial de antibióticos seja de sulfonamidas. (3,12,13)

Uma parte da estrutura das sulfonamidas que apresenta atividade antimicrobiana é análoga à estrutura do ácido *p*-aminobenzoico (Figura 2a). Tais moléculas são amidas do ácido sulfônico, e contém um grupo amino livre ao final

(Figura 2b). A ampla variedade de radicais (R) permite que a essa família apresente um amplo espectro de ação. (2)

Figura 2 - (a) Estrutura do Ácido *p*-amino benzoico (b) Estrutura geral das sulfonamidas.

Fonte: Autoria própria.

O mecanismo de ação das SNs está baseado na competição com o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) pela enzima dihidropteroato sintetase, impedindo assim a síntese de ácido dihidropteróico. Desta maneira, as SNs inibem por mecanismos competitivo o metabolismo de ácido fólico e consequentemente a síntese de ácidos nucleicos nas bactérias. As células bacterianas dependem da produção endógena de ácido fólico para viver, enquanto as células humanas conseguem aproveitar o folato exógeno. (10,12)

A resistência a esse tipo de composto é gerada porque quando um microrganismo é exposto a concentrações traço de SNs ele procura rotas diferentes para a síntese de ácido fólico e diminui a permeabilidade da parede celular às SNs. Além disso, o microrganismo pode aumentar a produção de PABA ou produzir enzima dihidropteroato sintetase que apresenta pouca afinidade pelo antimicrobiano. Essa resistência pode ser transferida a outras gerações através de plasmídeos ou por transposons. (10,12)

Devido aos efeitos das SNs no ambiente, o monitoramento adequado dessa família de compostos é necessário. Porém, as sulfonamidas são compostos de baixa massa molar (entre 170 e 400 Da), com uma alta solubilidade em água,

consequentemente, são pouco adsorvidas na maioria das fases extratoras comerciais (para preparo da amostra) que existem na atualidade. Desta forma, o desenvolvimento de um procedimento analítico capaz de quantificar o analito em diferentes matrizes, tais como: esgoto, solo, sangue, entre outras, é de suma importância. Esse método deve incluir uma técnica de preparo de amostra capaz de extrair, limpar e concentrar as SNs efetivamente nas diferentes matrizes para a posterior análise cromatográfica.

1.2 Técnicas de preparo de amostra

As técnicas de preparo de amostra (técnicas de extração) permitem separar os compostos de interesse, reduzindo ou eliminando os interferentes da matriz. O preparo de amostra tem uma grande influência sobre o tempo necessário para se completar a análise. Fatores como a amostragem e o preparo de amostra podem representar até 80% do tempo das análises, além de influenciar na qualidade dos resultados obtidos. Assim, torna-se necessário desenvolver técnicas de preparo de amostra rápidas, simples, seletivas e de baixo custo, além de técnicas que minimizem a manipulação da amostra. (14)

Dentre as técnicas de extração mais tradicionais encontram-se a extração líquido-líquido (LLE) e a extração por Soxhlet. As principais desvantagens dessas técnicas são o alto consumo de solventes, a formação de emulsões, a falta de reprodutibilidade, além de serem técnicas muito laboriosas e realizadas geralmente no modo *off-line* (ou seja manual). Por outro lado, as técnicas modernas, permitem trabalhar com um consumo de solvente muito menor, não permitem a formação de emulsões, possuem alta reprodutibilidade com menos tempo de preparo de amostra, e permitem o trabalho *on-line* (automatizado). Com relação às análises *on-line*, a fase extratora é preenchida numa pré-coluna e comutada ao sistema cromatográfico, geralmente por meio de uma válvula de seis pórticos. A Figura 3 compara as etapas de preparo de amostra no sistema *off-line* e *on-line*. (15)

São consideradas técnicas modernas de preparo de amostra: a extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSDP), extração com fluido supercrítico (SFE), extração acelerada com solvente (ASE), extração com solvente subcrítico (SWE), extração assistida por micro-ondas (MAE) e as técnicas miniaturizadas como, a microextração em fase sólida (SPME), extração por barra de

sorção (SBSE), microextração por sorvente empacotado (MEPS) e microextração em fase líquida (LPME), entre outras. (14,16,17)

Figura 3 – Comparação das etapas no preparo de amostra off-line e on-line

Fonte: Autoria própria.

A SPE, do inglês “solid phase extraction”, está entre as técnicas modernas mais utilizadas e importantes. Seu mecanismo de ação está baseado na afinidade que apresentam os analitos pela fase extratora (fase sólida) e a fase móvel. As amostras líquidas são forçadas a passar pela fase extratora e os analitos ficam retidos no material por meio de suas interações com a fase estacionária, enquanto os interferentes são eliminados. (14)

A SPE pode apresentar diferentes formatos, tais como: discos, cartuchos, bandejas perfuradas, ponteiras, colunas, e as diferentes formas miniaturizadas (SPME, SBSE, MEPS). Em relação aos tipos de fases extratoras "tradicionais" utilizadas, têm-se as de grupos hidrofóbicos de octadecil (C₁₈) e octil (C₈) ou de grupos polares como ciano (CN) e amino (RNH₂), além das trocadoras catiônicas e aniônicas. Entretanto, essas fases não possuem alta seletividade e alguns interferentes

presentes podem ser co-eluídos. A fim de solucionar esse problema, polímeros molecularmente impressos (MIP) têm demonstrado várias vantagens em relação às fases tradicionais, principalmente quando se procura maior seletividade para um composto ou classe de compostos em uma análise cromatográfica. (14)

1.3 Polímeros molecularmente impressos

Os polímeros de impressão molecular (MIP) são materiais sintéticos com sítios de reconhecimento gerados artificialmente. São polímeros rígidos e tridimensionais, sintetizados ao redor de uma molécula-molde. Após a síntese, a molécula-molde é retirada o que resulta em sítios de reconhecimento molecular. A cavidade impressa permite a ligação com uma molécula-alvo ou com moléculas estruturalmente semelhantes. Esse fato permite um grau de seletividade muito superior quando comparado com as fases extratoras "tradicionais" anteriormente referidas. (18)

A impressão molecular é um método simples e rápido que permite sintetizar novos materiais utilizados na detecção de drogas, toxinas, pesticidas, componentes de alimentos e outras moléculas difíceis de serem isoladas. Diversos métodos de polimerização têm sido desenvolvidos, entre eles, a polimerização em batelada ("bulk"), polimerização por precipitação, polimerização por suspensão, polimerização por emulsão e polimerização em duas etapas. Sendo as mais importantes a polimerização em batelada e a polimerização por precipitação. Cada um destes procedimentos envolve o controle de diferentes parâmetros durante a síntese e produz polímeros com propriedades diferentes. (19,20)

Cronologicamente, o primeiro método para a síntese de MIP foi o método de polimerização em batelada. Esse método consiste basicamente, na mistura de todos os componentes: a molécula-molde, o monômero, o agente de ligação cruzada, o iniciador radicalar e o solvente são adicionados a uma ampola de síntese. Em seguida, o oxigênio presente no sistema deve ser retirado borbulhando-se argônio, nitrogênio ou empregando-se ultrassom. Posteriormente, a ampola é lacrada e submetida a aquecimento ou radiação UV para iniciar o processo (Figura 4). O resultado é uma massa rígida que necessita ser triturada, peneirada e lavada com solvente para a retirada da molécula-molde e de outros reagentes remanescentes da síntese. As partículas obtidas pelo método em batelada apresentam uma forma irregular e o tamanho depende do processo de trituração. Além disso, cerca de 70% do polímero

é perdido na trituração e algumas áreas de heterogeneidade são produzidas na matriz polimérica. (18,20,21)

A síntese pelo método de precipitação difere daquela do método em batelada pela maior quantidade de solvente utilizado (geralmente o dobro do solvente empregado no método em batelada) resultando em partículas mais regulares (estrutura globular). Além disso, o polímero não precisa ser triturado, somente peneirado para obter o tamanho da partícula de interesse. Na Figura 4 é apresentado o esquema geral da síntese dos polímeros molecularmente impressos. (22,23)

Figura 4 - Esquema geral da síntese do MIP

Fonte: Autoria própria.

Para o melhor rendimento na produção do MIP pelos métodos em batelada e por precipitação, a seleção dos reagentes bem como suas concentrações e volumes devem ser ajustados de forma criteriosa. A seleção do solvente é muito importante e influencia diretamente nas características morfológicas do polímero. Ele deve ser capaz de solubilizar todos os reagentes da síntese e permitir as interações entre a molécula-molde e o monômero funcional. Os monômeros funcionais são os responsáveis pela formação da rede polimérica. Esses são capazes de formar ligações covalentes com uma sequência de moléculas iguais ou similares, formando assim, moléculas maiores chamadas de polímeros. O responsável pela rigidez do polímero é o agente de ligação cruzada, promovendo a interligação das cadeias poliméricas formadas pelos monômeros funcionais. (21)

A molécula-molde é o analito usado para moldar estereoquimicamente os sítios de ligação. Para que esta etapa seja bem sucedida é necessário tomar alguns cuidados na escolha da molécula-molde, pois esta não pode ter grupos envolvidos na polimerização, além de manter a estabilidade química do polímero e apresentar grupos funcionais bem adaptados para a ligação com o monômero funcional.

As interações entre a molécula-molde e monômero pode ser de três formas diferentes: interação covalente, semicovalente e não covalente. Nas interações covalentes, ligações covalentes reversíveis existem entre o monômero e a molécula-molde, depois da polimerização a molécula-molde é retirada por quebra das ligações existentes. A vantagem da ligação covalente reversível é sua alta seletividade. A forte ligação da molécula molde ao monômero produz uma quantidade elevada de sítios de reconhecimento, garantindo assim uma maior seletividade do polímero impresso. Porém, essa forte ligação dificulta o processo de eluição dos analitos na análise cromatográfica. (21)

As interações semicovalentes são a opção intermediária na preparação de MIP. Nesse caso, a molécula-molde é ligada covalentemente ao monômero, mas a religação baseia-se apenas em interações não covalentes. Já nas interações não covalentes, interações relativamente fracas (por exemplo, ligação de hidrogênio) existem entre o molde e o monômero. Essa abordagem é a mais utilizada na preparação de MIP, pois sua síntese é de fácil realização, e uma grande variedade de monômeros pode interagir com diferentes tipos de moldes. No entanto, nesse método a formação de sítios de reconhecimento não seletivos é considerável. (18,20)

Devido à variedade de procedimentos poliméricos o desempenho dos MIP é relatado na literatura em termos de parâmetros relativos à seletividade. Tais como: fator de retenção (k) e a seletividade (S). Para determinar k e S os polímeros sintetizados são preenchidos em colunas cromatográficas que são acopladas no sistema cromatográfico. Posteriormente, compostos de interesse são injetados no sistema cromatográfico e os tempos de retenção são obtidos. O cálculo do coeficiente de retenção e da seletividade dá-se de acordo com as seguintes equações: (24)

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: t_R = tempo retenção analito; t_0 = tempo de eluição de um composto não retido

$$S = \frac{K_{mip}}{K_{nip}} \quad (\text{Equação 2})$$

Outros pesquisadores preferem os testes de “seletividade competitiva” para conhecer o efeito de impressão dos polímeros. Neste tipo de teste, uma determinada quantidade do polímero entra em contato com uma solução que contém concentrações conhecidas de dois analitos. A solução junto com o polímero é agitada por um tempo determinado. Posteriormente, a concentração dos analitos é determinada por cromatografia e o desempenho dos polímeros avaliado pelas equações 3, 4 e 5, onde são determinados o coeficiente de distribuição (K_d), coeficiente de seletividade (K) e o coeficiente de seletividade relativa (K'). (25)

$$K_d = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times \frac{V_s(\text{mL})}{\text{massa do MIP ou NIP (g)}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde C_i = concentração inicial, C_f = concentração final, V_s = volume da solução

$$K_{impresso} = \frac{K_{d,analito}}{K_{d,interferente}} \quad (\text{Equação 4a})$$

$$K_{n\tilde{a}o\ impresso} = \frac{K_{d,analito}}{K_{d,interferente}} \quad (\text{Equação 4b})$$

$$K' = \frac{K_{impresso}}{K_{n\tilde{a}o\ impresso}} \quad (\text{Equação 5})$$

Embora os MIP sejam materiais robustos e de alta seletividade, são materiais suscetíveis à ligação com macromoléculas (por exemplo, proteínas e lipídios) o que impede seu uso direto em amostras biológicas ou ambientais. Isso se deve à forte adsorção de macromoléculas na superfície dos polímeros interferindo negativamente nas capacidades de reconhecimento. Pensando em solucionar este problema, Haginaka et al. (2007) propuseram um material que associa as características vantajosas dos RAM (materiais de acesso restrito) e dos MIP em um único polímero capaz de reter seletivamente um tipo de moléculas e eliminar quantitativamente as macromoléculas. Esse tipo de polímero é conhecido como RAM-MIP. (26)

1.4 Materiais de acesso restrito (RAM)

Os materiais (ou meios) de acesso restrito têm se destacado na literatura científica nas últimas duas décadas, e são utilizados geralmente na análise de substâncias com baixa massa molar em matrizes complexas. Esse tipo de material exclui as moléculas de alta massa molar concentrando simultaneamente o analito. Os RAM permitem a injeção direta e repetitiva de amostras biológicas e ambientais sem tratamento prévio no sistema cromatográfico. Essa injeção ocorre frequentemente por meio de um sistema bidimensional que utiliza válvulas de seis pórticos no acoplamento das colunas RAM com os demais componentes do sistema cromatográfico (bombas, sistema de injeção, coluna e detector) (Figura 5). (27,28,29)

Inicialmente a amostra injetada passa por uma pré-coluna preenchida com o material do tipo RAM, que retém os analitos de baixa massa molar e descarta as macromoléculas. A seguir, a posição da válvula de seis pórticos é trocada, permitindo que uma fase móvel apropriada elua os analitos da pré-coluna RAM, direcionando-os para a coluna analítica. Essa troca de colunas no sistema cromatográfico é geralmente denominada *column switching*. A Figura 5 ilustra um esquema representativo do funcionamento do sistema *column switching*. (30,31)

Figura 5 - Funcionamento do sistema de *column switching*

Os materiais de acesso restrito podem possuir estruturas diferentes, porém o mecanismo fundamental de ação é idêntico. Este consiste em uma barreira repelente que permite a permeação das moléculas pequenas, garantindo o acesso delas à interação com a fase estacionária; enquanto essa barreira exclui as macromoléculas por meio de impedimentos físicos, químicos, ou uma combinação de ambos. A Figura 6 ilustra um esquema representativo do funcionamento do mecanismo de ação de uma partícula RAM. (29)

Figura 6 - Representação do mecanismo de ação de uma partícula RAM.

Fonte: MULLETT, W. M., 2007.

Alguns materiais RAM utilizam poros (geralmente de 60 Å), que atuam como barreira repelente. Os poros só permitem a entrada de moléculas pequenas, excluindo assim, macromoléculas como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos entre outros interferentes. Outros materiais aproveitam a presença de grupos funcionais hidrofílicos na superfície externa da fase estacionária, esses grupos funcionais também agem como uma barreira, desta vez química, para as macromoléculas hidrofóbicas. (28,29)

A tecnologia dos polímeros molecularmente impressos pode ser agregada à dos materiais RAM, obtendo-se assim polímeros de impressão molecular restritos a ligações com macromoléculas. O resultado é um material altamente seletivo para a extração de compostos de interesse e, ao mesmo tempo, compatível com amostras cuja matriz apresenta alto grau de complexidade.

1.5 Polímeros de impressão molecular restritos à ligação com macromoléculas

Os primeiros trabalhos que tentaram aliar as características seletivas dos MIP e a capacidade de eliminar as macromoléculas dos materiais RAM, integrados em um sistema cromatográfico, utilizaram duas colunas onde os materiais ficam separados, e requerendo assim duas etapas de pré-tratamento (Figura 7).

A amostra é injetada diretamente (sem tratamento prévio) no sistema cromatográfico e passa pela coluna RAM, os analitos e alguns interferentes de baixa massa molar ficam retidos e as macromoléculas são excluídas (Figura 7a). Depois, os compostos retidos na coluna RAM são eluídos e levados para a coluna MIP, havendo então adsorção seletiva (Figura 7b). Por último, os analitos retidos são separados na coluna analítica e seguem para a detecção. Apesar da efetividade no tratamento da amostra, a implantação desse sistema é complexa e requer várias bombas e válvulas. Dessa forma surgiram os RAM-MIP, como uma alternativa para utilizar um único material que integre as características vantajosas dos RAM e dos MIP na mesma fase. (29,31)

Os RAM-MIP são polímeros que apresentam sítios de reconhecimento molecular e grupos hidrofílicos externos, impedindo a ligação com macromoléculas. Para sintetizar materiais com essas características é realizada a inserção de um monômero hidrofílico como o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) na mistura de pré-polimerização. Esse composto é conhecido por aumentar a compatibilidade dos sistemas RAM-MIP com amostras aquosas. Adicionalmente é capaz de interferir na formação de sítios de reconhecimento na polimerização, formando ligações de hidrogênio com vários analitos. (26,32)

Outra abordagem envolve um processo de polimerização em duas etapas, e inclui a modificação da superfície do MIP, adicionando HEMA e glicidil dimetacrilato (GDMA) após um certo tempo da polimerização. Esses co-monômeros têm grupos vinil que podem integrar a rede polimérica e grupos hidroxila que darão a restrição a macromoléculas hidrofóbicas (Figura 8). Assim, é possível evitar a deposição de macromoléculas sobre a superfície polimérica o que melhora o processo de reconhecimento. A Figura 8 ilustra um esquema representativo de uma partícula RAM-MIP. (26,27,32)

Figura 7 - Sistema cromatográfico com duas etapas de pré-tratamento.

Fonte: MULLETT, W. M., 2007.

Figura 8 - Representação de uma partícula RAM-MIP

Fonte: Autoria própria.

Outra possibilidade surge com a imobilização da albumina sérica bovina (BSA) na superfície do MIP por meio de reações de entrecruzamento, após a percolação prévia de uma solução de BSA pelo MIP. Assim, são obtidos os polímeros do tipo MIP-BSA. Dessa maneira é impedida a deposição de macromoléculas hidrofílicas sobre o MIP. A Figura 9 ilustra um esquema representativo de uma partícula MIP-BSA. (33,34,35)

Figura 9 – Representação de uma partícula BSA-MIP

Fonte: Autoria própria.

Finalmente, também é possível modificar a superfície do MIP com HEMA, GDMA e em seguida, com BSA, obtendo-se dessa maneira um polímero de impressão molecular com alta restrição à ligação de macromoléculas. Esse tipo de material é geralmente chamado de RAM-MIP-BSA. A Figura 10 ilustra um esquema representativo de uma partícula RAM-MIP-BSA. (28,33)

Figura 10 - Representação de uma partícula RAM-MIP-BSA

Fonte: Autoria própria.

Essas novas tecnologias de preparo de amostra devem ser submetidas a uma série de avaliações experimentais para garantir que o novo material seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Essa série de avaliações é denominada validação. (36)

1.6 Validação de métodos analíticos

A validação tem como objetivo demonstrar que um método ou material de análise é adequado para o propósito pretendido. Quando um método é desenvolvido deve-se providenciar uma adequada validação para que ele possa ser usado na rotina de um laboratório. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento e aplicação. (36)

Diversos órgãos de controle no Brasil como: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e outros órgãos internacionais como a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos, a Eurachem na União Europeia, além de outros órgãos de controle e diversos artigos e revisões fornecem regulamentações ou guias, que estabelecem uma série de parâmetros que compõem o processo de validação. Alguns parâmetros avaliados nesse trabalho são abordados a seguir. (37)

1.6.1 Precisão

A precisão é a medida da dispersão dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Em outras palavras, é a concordância entre múltiplas medidas de uma única e homogênea amostra. Este parâmetro que possibilita ao analista decidir se o método é confiável ou não para o objetivo da análise. (36)

A precisão intra-dias (repetibilidade) mede a capacidade do método em repetir, em um intervalo de tempo pequeno, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise, em outras palavras com o mesmo analista, o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e fazendo uso dos mesmos reagentes.

A precisão inter-dias (intermediária) é utilizada para demonstrar a capacidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas ou diferentes equipamentos. (37)

1.6.2 Linearidade (curva de calibração)

A linearidade é a habilidade de um método em descrever a função de resposta (y) e a concentração (x). Ou seja a linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. (38)

A linearidade deve ser avaliada idealmente usando no mínimo 6 a 8 concentrações diferentes do analito (padrões de calibração) adicionadas à mesma matriz para o qual o método foi desenvolvido e será aplicado. Esse parâmetro é avaliado pela construção de um gráfico de resposta (y) vs. concentração do analito (x), usando o método dos mínimos quadrados para obter uma função do tipo $y = ax + b$. Onde a é o coeficiente angular ou inclinação da reta e b é o coeficiente linear ou intercepto.

A curva de calibração deve contemplar a faixa de aplicação para a qual o ensaio será utilizado. A maioria dos órgãos de controle recomendam que a curva de calibração seja preparada na matriz e que a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se encontrar no centro da faixa linear. (36,37)

1.6.3 Recuperação (eficiência de extração)

A recuperação refere-se à capacidade que tem um método em retirar o analito do seio da matriz. No cálculo da eficiência de extração compara-se a resposta do analito adicionado na matriz e extraído com a resposta do extrato da amostra fortificado com o analito após a extração.

Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir consideravelmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada em três níveis: baixo, médio e alto, de acordo com a curva de calibração. (37)

2 Objetivos

O trabalho tem como objetivo sintetizar e avaliar o desempenho de um polímero de impressão molecular (MIP), e três polímeros de impressão molecular restritos à ligação de macromoléculas (RAM-MIP, BSA-MIP e RAM-MIP-BSA) para a pré-concentração seletiva e análise de sete sulfonamidas (SNs) em amostras complexas (esgoto suíno) utilizando um sistema HPLC-bidimensional.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar os materiais MIP, RAM-MIP, BSA-MIP e RAM-MIP-BSA para sulfonamidas e os equivalentes polímeros não impressos NIP, RAM-NIP, BSA-NIP e RAM-NIP-BSA.
- Avaliar os materiais obtidos em relação a seletividade e capacidade de eliminação de macromoléculas.
- Caracterizar os materiais por microscopia eletrônica de varredura e construir a isoterma de adsorção da sulfadimetoxina (molécula-molde).
- Avaliar o potencial dos materiais sintetizados quanto à pré-concentração e eliminação do efeito de matriz para a melhoria da sensibilidade em análises por cromatografia líquida bidimensional.
- Avaliar as condições experimentais para a extração seletiva das sulfonamidas em amostra de esgoto suíno.
- Validar o método de acordo com as recomendações pertinentes a análises ambientais de traços em matrizes complexas.

3. Parte experimental

3.1 Materiais e reagentes

Os padrões analíticos de sulfadimetoxina (SDX) ($\geq 98,5\%$), sulfametoxazol (SMX) (99%), sulfacloropiridazina (SCZ) (99%), sulfadiazina (SDZ) (99%), sulfamerazina (SMR) (99%), sulfametazina (SMT) (99%), sulfacetamida (SCT) (98%), sulfatiazol (STZ) (98%), sulfametoxazol-(fenil $^{13}\text{C}_6$) (99%), cafeína (CAF) (98%), ácido salicílico (AS) (99%), ácido acetilsalicílico (AAS) (99%), norfloxacino (NOR) (99%), e enrofloxacino (ENR) (99%), foram adquiridos de Sigma–Aldrich. Utilizou-se água deionizada purificada do sistema Milli-Q da Millipore. Os solventes orgânicos metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) (grau HPLC) e ácido fórmico (96%) foram adquiridos da Tedia. A Tabela 1 indica a estrutura e a massa molar dos padrões analíticos utilizados neste projeto.

Tabela 1 – Estrutura e massa molar dos compostos utilizados neste projeto (**Continua**)

Composto	Estrutura	Massa molar (g mol^{-1})
Sulfadimetoxina		310,3
Sulfametoxazol		253,3
Sulfacloropiridazina		284,7
Sulfadiazina		250,3

Tabela 1 – Estrutura e massa molar dos compostos utilizados neste projeto (Conclusão)

Sulfamerazina		264,3
Sulfametazina		278,1
Sulfacetamida		214,2
Sulfatiazol		255,3
Cafeína		194,19
Ácido salicílico		138,12
Ácido acetilsalicílico		180,16
Norfloxacinó		319,33
Enrofloxacinó		359,39

Fonte: Autoria própria.

Os MIP foram sintetizados a partir do ácido metacrílico (MAA) 99% (monômero), etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) 98% (agente de ligação cruzada), azoisobutironitrila (AIBN) 98% (iniciador radicalar), sulfadimetoxina sal de sódio ($\geq 98,5\%$) (molécula-molde) e ACN 99,8% (solvente). Na síntese dos RAM-MIP além dos reagentes anteriormente mencionados, foram empregados os co-monômeros hidróxi etil metacrilato (HEMA) 97% e glicidil dimetacrilato – mistura de isômeros (GDMA) (Figura 11).

Figura 11 - (a) Ácido metacrílico (b) Etilenoglicol dimetacrilato (c) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (d) Hidróxi etilmetacrilato (e) Glicidil dimetacrilato (mistura de isômeros)

Fonte: Autoria própria.

Nas reações de imobilização da albumina sérica bovina (BSA) sobre as superfícies dos polímeros, empregou-se além da proteína, uma solução aquosa de glutaraldeído 25% e borohidreto de sódio 98%. As soluções de BSA foram preparadas em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.

3.2 Equipamentos

Para as análises foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da série 20A Prominence, Shimadzu, contendo bombas LC-20AD, amostrador automático SIL-20A, forno para colunas CTO-20A e detector UV/Vis SPD 20A. Este sistema foi equipado com uma coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 3,0 mm; 2,7 μm) adquirida da Agilent Technologies.

Para a validação do método analítico objetivando o acoplamento da coluna com os polímeros em um sistema on-line com detecção por espectrometria de massas empregou-se o sistema LC-ESI-QtoF/MS compreendido por um HPLC Shimadzu série 20A Prominence, equipado com uma coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 3,0 mm; 2,7 μ m) e espectrômetro Bruker Daltonics modelo microTOF-Q II. Os compostos foram analisados por *electrospray* (ESI), operando no modo positivo com temperatura de dessolvatação de 200°C, voltagem do capilar a 4,5 kV, fluxo do gás de secagem de 8 mL min⁻¹ e pressão do nebulizador de 1,6 bar. Intervalo de m/z monitorado de 50 a 3000 u, taxa de aquisição de espectros a 2 Hz no modo full MS

Nos estudos onde foi necessário manter a temperatura constante além de agitação (estudo cinético e construção da isoterma de absorção) foi utilizada uma câmara incubadora com agitação orbital marca Marconi, modelo MA1415.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 15 kV, corrente de 2,82 A e I probe de 200 pA. Previamente à obtenção das fotomicrografias, as amostras foram recobertas com uma superfície nanométrica de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein).

As medidas de massa foram realizadas em uma balança analítica Mettler Toledo, modelo AG285. Do mesmo modo, as medições de pH foram realizadas em um potenciômetro Qualxtron, modelo 8010. Quando necessário, foram utilizadas as centrífugas Celm, modelo LS-3 Plus e Eppendorf do tipo MiniSpin.

3.3 Sínteses dos polímeros de impressão molecular

3.3.1 Sínteses do MIP e NIP

O polímero MIP foi sintetizado pelo método em batelada e de precipitação. Para o método em batelada foram misturados inicialmente 1 mmol de sulfadimetoxina (molécula-molde), 5 mL de etilenoglicol dimetacrilato (agente de ligação cruzada) e 4 mmol de ácido metacrílico (monômero) em 24 mL de acetonitrila (solvente), e levados ao ultrassom durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionadas 120 mg do iniciador radicalar AIBN e a solução foi submetida a mais 20 minutos ao ultrassom.

Finalmente, o sistema foi lacrado, purgado com nitrogênio, mantido a 60°C e com agitação constante durante 24 horas. A escolha dos reagentes e suas proporções baseou-se nos resultados apresentados no trabalho de Shi et al. (24)

A mistura dos reagentes foi realizada em um balão de duas bocas de fundo redondo e aquecida em um banho de óleo a 60°C. A temperatura foi mantida constante por meio de um banho termostatzado, pelo qual se faz circular água na camisa de vidro que continha o banho de óleo. As bocas do balão foram lacradas com septos o que permitiu purgar o sistema com nitrogênio e a adição de reagentes quando necessário. A Figura 12 é uma foto real da montagem empregada na síntese.

Figura 12 - Foto da montagem empregada na síntese dos polímeros

Fonte: Autoria própria.

Para a síntese do MIP pelo método de precipitação foram empregadas as mesmas quantidades da molécula-molde, monômero, agente de ligação cruzada e iniciador radicalar anteriormente mencionadas, porém a quantidade de solvente foi

acrescentada até 48 mL. Nos dois casos, um polímero não impresso molecularmente (NIP) (polímero controle) foi sintetizado da mesma forma, entretanto sem a presença da molécula molde.

3.3.2 Sínteses do RAM-MIP e RAM-NIP

Antes de prosseguir com a sínteses dos polímeros RAM-MIP. Optou-se em submeter os polímeros MIP descritos no item anterior, a testes de seletividade e determinação do fator de retenção para 8 sulfonamidas e uma série de compostos considerados interferentes (ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, norfloxacin, enrofloxacin e cafeína), os testes são descritos na seção 3.3.6.2.

Baseado nos resultados desses testes, optou-se por sintetizar os polímeros RAM-MIP pelo método de precipitação, pois foi a síntese do polímero que apresentou os melhores valores de seletividade e fator de retenção. Assim, para a síntese dos polímeros RAM-MIP, empregou-se as mesmas quantidades de reagentes descritas na síntese do polímero MIP realizado pelo método de precipitação, no entanto depois de duas horas de reação foram adicionados os co-monômeros HEMA e GDMA (7,5 mmol e 0,5 mmol respectivamente) no balão de reação, a escolha das quantidades dos co-monômeros foi baseada no trabalho de Moraes et al. Ao adicionar esses reagentes procurou-se conferir o caráter hidrofílico do polímero e restringir assim a sua ligação com macromoléculas hidrofóbicas. Nos dois casos um polímero não impresso molecularmente (polímero controle) foi sintetizado da mesma forma, entretanto sem a presença da molécula molde.

3.3.3 Síntese do BSA-MIP e BSA-NIP

O revestimento do polímero MIP e NIP com BSA foi realizado *in situ*, de maneira similar ao processo descrito por dos Santos e Menezes (39,40). Para isso os polímeros foram preenchidos em pré-colunas cromatográficas de aço inoxidável com diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 40 mm aproximadamente. O processo de empacotamento das colunas será descrito em maior detalhe no item 3.3.7. (40,41)

Depois de preenchidas, as colunas foram acopladas a um sistema de pressurização (Figura 13). O sistema é composto por cilindro de gás nitrogênio, válvula agulha, reservatório, coluna empacotada e descarte. Os reagentes usados no

revestimento dos polímeros foram pressurizados diretamente por nitrogênio. A vazão dos reagentes foi ajustada para aproximadamente 1 mL min^{-1} . Inicialmente, a coluna foi condicionada com 25 mL de tampão fosfato 20 mmol L^{-1} pH 6,0, seguido por um fluxo de solução 1 mg mL^{-1} de BSA (preparada no mesmo tampão), por 20 minutos. Em seguida, percolou-se solução aquosa de glutaraldeído 25% (v/v), deixando-se o sistema em repouso por 5 horas. Finalmente, foi passado pela pré-coluna 5 mL de borohidreto de sódio 1 mg mL^{-1} e, depois de duas horas de repouso a coluna foi retirada do sistema de pressurização, acoplada a uma bomba cromatográfica e lavada por aproximadamente 10 horas com água ultrapura.

3.3.4 Síntese do RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA

Para a síntese do polímero RAM-MIP-BSA utilizou-se o mesmo método descrito no item 3.3.3, entretanto o polímero revestido foi o RAM-MIP. Para obter o RAM-NIP-BSA recobriu-se o RAM-NIP com BSA, conforme mencionado anteriormente.

Figura 13 - Sistema de pressurização dos reagentes para recobrimento *in situ* dos polímeros.

(1) Cilindro gás nitrogênio, (2) válvula agulha, (3) reservatório, (4) coluna empacotada (5) descarte.

Fonte: adaptado de Santos-Neto, A., 2007

3.3.5 Retirada da molécula-molde

Depois de sintetizados os polímeros, foi necessário retirar a molécula-molde dos MIP. Para a retirada da molécula-molde foram testadas duas metodologias. A primeira delas foi colocar as partículas dos polímeros em um recipiente de reação e lavagem com a solução metanol/ácido fórmico (90:10). (42,43)

Na segunda metodologia empacotou-se os polímeros em colunas cromatográficas (conforme item 3.3.7), seguido por acoplamento em um sistema cromatográfico e lavagem dos polímeros com acetonitrila/água, por meio de um gradiente com intervalos de 0 a 100% de solvente orgânico (Foram testados ACN e metanol).

3.3.6 Caracterização dos polímeros

3.3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

Com o objetivo de verificar o tamanho e a forma das partículas dos polímeros, estes foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Desta forma as amostras foram recobertas com 6 nm de ouro em um metalizador e mantidas em dessecador até o momento da análise. As condições de metalização foram as seguintes: pressão na câmara: $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente: 60 mA; taxa de deposição 0,60 nm/s).

3.3.6.2 Estudos de seletividade em coluna

Depois de sintetizados, os MIP (sintetizados pelo método em batelada e de precipitação), foram submetidos a testes de seletividade em coluna. O objetivo destes testes foi determinar a seletividade e o fator de retenção, em relação aos analitos e os interferentes e, assim, determinar qual método de síntese apresenta os melhores resultados.

Para isso os polímeros foram empacotados em colunas cromatográficas de 4,6 mm de diâmetro interno e comprimento de 40 mm (conforme item 3.3.7). As colunas preenchidas foram acopladas ao HPLC. Posteriormente, foram injetados os analitos e os “interferentes” de modo a determinar o fator de retenção e os valores de

seletividade. É importante mencionar que estes parâmetros estão relacionados com o pH do meio, assim como o solvente utilizado. Portanto, foram testados diferentes solventes (metanol e acetonitrila) e diferentes valores de pH (2,0; 4,5; 7,0 e 9,0). Para a fase aquosa com pH 2,0 e 7,0 foi utilizado tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, para o pH 4,5 foi empregado tampão acetato 20 mmol L⁻¹ e para o pH 9,0 tampão amônio 20 mmol L⁻¹.

3.3.6.3 Estudo cinético

O tempo necessário para que a interação entre a sulfadimetoxina (molécula-molde) e o MIP chegue ao equilíbrio (estudo cinético) foi determinado. Para isso, oito tubos de ensaio contendo 10 mg de MIP (cada) foram adicionados de 2 mL de uma solução tamponada (tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 2,0) de sulfadimetoxina (300 mg L⁻¹). Esses tubos foram mantidos sob agitação constante a temperatura ambiente. Assim, alíquotas do sobrenadante de cada tubo foram coletadas em tempos pré-determinados (5, 10, 20, 25, 30, 40, 45 e 60 minutos). A sulfadimetoxina remanescente foi quantificada por HPLC usando uma coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 3,0 mm; 2,7 µm), fase móvel de acetonitrila/água acidificados com 0,1% de ácido fórmico.

3.3.6.4 Estudos de seletividade competitiva

Para os testes de seletividade competitiva foram formadas cinco combinações (soluções binárias) do tipo sulfonamida A/sulfonamida B e sulfonamida/interferente. 50 mg do MIP foram adicionados a um frasco de polietileno e agitado durante 20 minutos com 10 mL da solução binária contendo 1 mg mL⁻¹ de cada analito e tamponada (pH 2,0) com fosfato 20 mmol L⁻¹ (o pH e concentração do tampão adotado foram extraídos do procedimento de seletividade em coluna). Seguidamente, as quantidades de sulfonamida e interferente adsorvidos pelo MIP foram determinadas pela diferença entre a concentração inicial e a concentração do sobrenadante. A concentração do sobrenadante foi determinada conforme relatado na seção anterior. Finalmente, foram determinados o coeficiente de distribuição (K_d), o coeficiente de seletividade (K) e o coeficiente de seletividade relativo (K').

3.3.6.5 Teste de eliminação de macromoléculas

Para avaliar a capacidade dos polímeros sintetizados quanto a eliminação de macromoléculas, foram injetados 100 μL de soluções aquosas de albumina sérica bovina com concentrações de 11, 22, 33 e 44 mg mL^{-1} . Os 100 μL das soluções de BSA foram injetados em um sistema de cromatografia líquida sem nenhuma coluna e com o detector operando em 280 nm, no lugar da coluna foi colocado uma união para fechar o “circuito” cromatográfico (Figura 14). A fase móvel empregada foi tampão fosfato pH 2,0 (20 mmol L^{-1}) e vazão de 1 mL min^{-1} . Imediatamente depois da injeção foi coletado tudo o que saía do detector em um balão volumétrico de 5 mL durante 4 minutos. Posteriormente, o volume do balão foi completado até 5 mL e a solução foi injetada novamente, com as bandas cromatográficas obtidas foi construída uma curva de calibração.

Figura 14 – Esquema da configuração do cromatógrafo nos testes de eliminação de macromoléculas sem a pré-coluna

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, foram colocadas as colunas MIP, RAM-MIP, RAM-MIP-BSA e BSA-MIP no percurso analítico (uma de cada vez) e 100 μL do padrão BSA de 44 mg mL^{-1} (mesma concentração média de albumina encontrada no plasma humano) foram injetados no sistema cromatográfico. Do mesmo modo, foi coletado o que saiu do detector em um balão volumétrico de 5 mL durante 4 minutos (Figura 15). O volume do balão foi completado até 5 mL e a solução foi injetada novamente. As bandas cromatográficas obtidas foram comparadas com as advindas da injeção do padrão de 44 mg mL^{-1} sem coluna e dessa forma foi avaliado o percentual de BSA eliminado pela coluna.

Figura 15 - Esquema da configuração do cromatógrafo nos testes de eliminação de macromoléculas contendo a pré-coluna

3.3.6.6 Isoterma de adsorção

Para a obtenção da isoterma de adsorção realizou-se um experimento em batelada. Assim, aos tubos de ensaio com soluções tamponadas (tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, pH 2,0) de sulfadimetoxina nas concentrações de 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mg L⁻¹ foram adicionados 10 mg de MIP. Os tubos foram agitados por 20 minutos (tempo determinado no estudo cinético) e a uma temperatura constante de 35°C. A temperatura (parâmetro muito importante nesse experimento) foi controlada com ajuda da câmara incubadora com agitação. Finalmente, as suspensões foram centrifugadas e a sulfadimetoxina presente no sobrenadante foi quantificada por HPLC, do mesmo modo relatado na seção 3.3.6.3. A quantidade de sulfadimetoxina adsorvida pelo MIP foi determinada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração do sobrenadante.

3.3.7 Empacotamento das colunas

Para o empacotamento das colunas, primeiramente, selecionou-se as partículas com tamanhos entre 38 e 75 µm. Para isso, os polímeros foram peneirados utilizando-se peneiras granulométricas de aço inox de 400 e 200 mesh. O processo de peneiramento foi realizado manualmente. Em seguida, suspendeu-se as partículas em acetona e aguardou-se um determinado tempo até que as partículas de maior massa sofressem a decantação. O sobrenadante foi descartado e com ele as partículas mais leves. Este procedimento foi realizado sucessivas vezes até que o tempo para decantação total fosse de 2 a 3 minutos.

As colunas foram manualmente empacotadas com as partículas selecionadas. O material empacotado foi preenchido usando uma bomba cromatográfica LC-20D e metanol como solvente propulsor.

3.3.8 Montagem do sistema bidimensional

Na montagem do sistema bidimensional foram acoplados um cromatógrafo Shimadzu da série 20A, 4 bombas de alta pressão, uma coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 (de Agilent Technologies), duas válvulas de seis pórticos e duas posições e um espectrômetro da Bruker do tipo QToF. O sistema foi controlado pelo software HyStar da Bruker.

3.3.9 Validação do método

O protocolo de validação foi desenvolvido com a adaptação de diferentes guias de validação aceitos por diferentes agências: EPA, FDA, ANVISA, INMETRO, AOAC e FDA. Adaptações foram necessárias devido à inexistência de guias específicos para as análises de antibióticos em amostras aquosas e com ênfase ambiental.

Na validação foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, recuperação e o limite de quantificação. Uma curva analítica foi construída com quintuplicatas de análises de amostra de esgoto sintético (composição - vide Anexo 3) em seis concentrações diferentes: 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A curva de calibração foi obtida plotando-se a divisão da área da banda cromatográfica do analito pela área do padrão interno (área relativa da banda cromatográfica) versus a concentração do analito no padrão de calibração. O isótopo sulfametoxazol-(fenil $^{13}\text{C}_6$) foi usado como padrão interno nas análises e o esgoto sintético como branco.

A precisão intra-dia foi avaliada em cinco replicatas em três níveis diferentes 100 ng L^{-1} (baixo), 600 ng L^{-1} (médio) e 1000 ng L^{-1} (alto) analisados no mesmo dia. A precisão inter-dias foi calculada com as mesmas concentrações em cinco replicatas e analisadas no dia seguinte.

Para avaliar a recuperação relativa foram fortificados em água os pontos baixo, médio e alto (100, 600 e 1000 ng L^{-1}) e injetados no sistema bi-dimensional. As áreas obtidas foram comparadas com as áreas dos mesmos pontos fortificados em esgoto sintético. O limite de quantificação foi definido utilizando a razão 10:1 para o sinal/ruído.

4. Resultados e discussão

4.1 Avaliação dos métodos de síntese – testes de seletividade em coluna

Inicialmente foram utilizados dois métodos para a síntese dos MIP, a síntese pelo método em batelada e a síntese pelo método de precipitação. Após as sínteses os dois polímeros obtidos foram avaliados quanto a sua seletividade e fator de retenção para sulfonamidas e “interferentes”. Para a determinação destes parâmetros os polímeros foram empacotados em pré-colunas cromatográficas (4,6 mm x 40 mm) e a molécula molde foi retirada (seção 4.2 e 4.3 respectivamente). Posteriormente, as pré-colunas foram acopladas ao sistema cromatográfico. Sulfonamidas e “interferentes” foram injetados no sistema cromatográfico empregando como fase móvel soluções tampão de pH 2,0, 4,5, 7,0 e 9,0.

Os interferentes escolhidos foram enrofloxacino, norfloxacino, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico e cafeína. Esses compostos podem ser encontrados em matrizes biológicas como o sangue e ambientais como o esgoto, por isso esses compostos foram escolhidos. O enrofloxacino e o norfloxacino são geralmente os fluoroquinolonas mais e menos retidos, respectivamente, nas fases extratoras comerciais. Portanto, testando esses dois compostos espera-se cobrir o comportamento dos fluoroquinolonas nos MIP.

Os primeiros resultados mostraram que as sulfonamidas apresentaram pouca afinidade pelos polímeros quando a fase móvel estava composta pela solução tamponada (tampão amônio 20 mmol L⁻¹) em pH 9,0. A Tabela 2 apresenta os tempos de retenção quando as oito sulfonamidas estudadas foram injetadas nas condições anteriormente descritas. A vazão da fase móvel foi 2,0 mL min⁻¹.

Com pH 7 as sulfonamidas apresentaram maior afinidade pelos polímeros. A Tabela 3 apresenta os tempos de retenção para três das sulfonamidas avaliadas nos dois polímeros sintetizados, uma mais retida (sulfadimetoxina), a que apresentou uma retenção intermediária (sulfamerazina) e uma menos retida (sulfacetamida). A ordem nos tempos de retenção foi a mesma do que nos ensaios com pH 9,0, porém os tempos de retenção foram um pouco maiores.

Tabela 2 – Tempos de retenção das sulfonamidas em tampão amônio pH 9,0.

Composto	Tempo retenção (min) MIP em batelada	Tempo retenção (min) MIP precipitação
Sulfadimetoxina	0,511	0,682
Sulfametoxazol	0,422	0,492
Sulfacoloropiridazina	0,420	0,433
Sulfamerazina	0,400	0,411
Sulfadiazina	0,373	0,486
Sulfametazina	0,355	0,370
Sulfatiazol	0,344	0,352
Sulfacetamida	0,341	0,343

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Tempos de retenção das sulfonamidas em tampão fosfato pH 7.

Composto	Tempo retenção (min) MIP em batelada	Tempo retenção (min) MIP precipitação
Sulfadimetoxina	1,388	4,648
Sulfamerazina	0,411	1,611
Sulfacetamida	0,398	0,432

Fonte: Autoria própria

Com os pH 4,5 e 2,0 os polímeros apresentaram os melhores resultados. Sendo o pH mais ácido o que apresentou a melhor relação referente ao tempo de retenção das sulfonamidas e interferentes. É válido lembrar que esses experimentos estavam focados em encontrar condições cromatográficas ideais onde as sulfonamidas ficassem retidas e os interferentes excluídos da pré-coluna.

Devido aos altos tempos de retenção nestes pH os ensaios foram realizados com uma porcentagem de fase orgânica (10 e 30%), desta maneira os tempos foram adequados para este tipo de teste. Para as fases orgânicas foram testados metanol e acetonitrila. A ACN apresentou uma força de eluição elevada e com uma pequena porcentagem na fase móvel os analitos e interferentes foram eluídos do sistema. Já com o metanol, que apresentou uma força de eluição menor, foi possível realizar os experimentos de maneira satisfatória.

Sulfadimetoxina, sulfametoxazol e sulfacloropiridazina foram os compostos mais retidos pelos polímeros. A Tabela 4 apresenta os tempos de retenção destas sulfonamidas e os “interferentes” no pH 4,5, usando 30% de metanol na fase móvel e uma vazão de 2 mL min⁻¹. Do mesmo modo, a sulfamerazina, sulfadiazina, sulfametazina, sulfatiazol e sulfacetamida foram as SN menos retidas. A Tabela 5 apresenta os tempos de retenção para o último grupo, usando 10% de metanol na fase móvel. Evidentemente o polímero sintetizado pelo método de precipitação apresentou a maior afinidade pelas sulfonamidas, porém nestas condições o polímero também apresentou uma alta afinidade pelos fluoroquinolonas, evidenciando uma perda de seletividade.

Tabela 4 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão acetato pH 4,5 e 30% de metanol como fase móvel.

Composto	Tempo retenção (min) MIP em batelada	Tempo retenção (min) MIP precipitação
Sulfadimetoxina	1,183	12,752
Sulfametoxazol	0,864	5,606
Sulfacloropiridazina	0,799	6,664
Enrofloxacino	0,534	2,009
Norfloxacino	0,445	3,403
Ácido acetilsalicílico	0,399	0,470
Ácido salicílico	0,333	0,416
Cafeína	0,373	0,664

Fonte: Autoria própria

Tabela 5 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão acetato pH 4,5 e 10% de metanol como fase móvel (continua)

Composto	Tempo retenção (min) MIP em batelada	Tempo retenção (min) MIP precipitação
Sulfamerazina	3,734	10,909
Sulfadiazina	2,800	8,118
Sulfametazina	4,245	9,805
Sulfatiazol	2,772	9,974
Sulfacetamida	1,496	3,457
Enrofloxacino	1,325	5,364
Norfloxacino	0,828	4,991

Tabela 5 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão acetato pH 4,5 e 10% de metanol como fase móvel (conclusão)

Ácido acetilsalicílico	0,620	0,949
Ácido salicílico	0,589	0,766
Cafeína	0,739	1,832

Fonte: Autoria própria

Com pH 2,0 o comportamento das sulfonamidas foi similar ao descrito anteriormente. Sulfadimetoxina, sulfametoxazol e sulfacloropiridazina foram os compostos mais retidos. Do mesmo modo, a sulfamerazina, sulfadiazina, sulfametazina, sulfatiazol e sulfacetamida foram as sulfas menos retidas. Porém, desta vez os interferentes ficaram pouco retidos e o tempo de retenção das sulfonamidas aumentou ainda mais. Com isso é possível analisar uma amostra em condições onde as sulfonamidas ficariam retidas e os interferentes seriam excluídos. As tabelas 6 e 7 apresentam os tempos de retenção para sulfonamidas e interferentes usando 30 e 10% de metanol (respectivamente), além de tampão fosfato pH 2,0 (20 mmol L⁻¹) na fase móvel.

Tabela 6 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão fosfato pH 2,0 e 30% de metanol como fase móvel

Composto	Tempo retenção (min) MIP em batelada	Tempo retenção (min) MIP precipitação
Sulfadimetoxina	1,209	13,045
Sulfametoxazol	0,902	5,788
Sulfacloropiridazina	0,886	7,727
Enrofloxacino	0,351	0,575
Norfloxacino	0,376	0,393
Ácido acetilsalicílico	0,897	1,034
Ácido salicílico	0,561	0,961
Cafeína	0,444	0,759

Fonte: Autoria própria

Tabela 7 - Tempos de retenção das sulfonamidas utilizando tampão fosfato pH 2,0 e 10% de metanol como fase móvel

Composto	Tempo retenção (min) MIP em batelada	Tempo retenção (min) MIP precipitação
Sulfamerazina	2,653	7,738
Sulfadiazina	2,320	7,169
Sulfametazina	2,616	5,241
Sulfatiazol	2,102	7,277
Sulfacetamida	1,629	4,039
Enrofloxacino	1,325	1,112
Norfloxacino	0,828	0,766
Ácido acetilsalicílico	0,620	1,534
Ácido salicílico	0,589	1,166
Cafeína	0,748	1,436

Fonte: Autoria própria

Os testes de seletividade anteriormente descritos permitiram demonstrar que o polímero sintetizado pelo método de precipitação é mais eficiente do que o polímero sintetizado pelo método em batelada. Também, foi possível conhecer que em uma solução de tampão fosfato pH 2 (20 mmol L^{-1}) o polímero sintetizado por precipitação apresenta um comportamento seletivo ideal, quanto a retenção das sulfonamidas e eliminação de interferentes. O comportamento resulta ideal porque as sulfonamidas são bem retidas pelo polímero e os interferentes são excluídos com pequena retenção.

Com base nos resultados apresentados acima, definiu-se que o polímero que apresentou os melhores resultados foi o sintetizado pelo método de precipitação sendo este o escolhido para prosseguir com os testes de seletividade, exclusão de macromoléculas e a aplicação no sistema on-line.

4.2 Retirada da molécula molde

A primeira metodologia empregada para retirar a molécula molde foi colocar as partículas dos polímeros em um recipiente de reação e lavar com a solução metanol/ácido fórmico (90:10). Por meio desta metodologia conseguiu-se a retirada da molécula-molde, porém é uma técnica muito laboriosa, demorada e dispendiosa,

pois apresenta um alto consumo de solventes, além de uma perda elevada do polímero.

Na segunda metodologia empregada, empacotou-se os polímeros em colunas cromatográficas, seguido pelo acoplamento em um sistema cromatográfico e lavagem dos polímeros com acetonitrila/água, por meio de um gradiente com intervalos de 0 à 100% de solvente orgânico (foram testados ACN e metanol). Desta maneira o consumo de solvente e o tempo de lavagem foi significativamente inferior, além disso observou-se que não houve a perda do polímero.

4.3 Preenchimento das colunas

A seleção de partículas maiores que 38 μm foi de extrema importância para o empacotamento, pois materiais de tamanho muito inferior apresentam elevada pressão na coluna cromatográfica, o que pode comprometer com o sistema de HPLC. Portanto, o empacotamento de partículas maiores que 38 μm apresentaram bons resultados em relação as pressões nas colunas para o sistema HPLC bidimensional.

4.4 Testes de seletividade em coluna

Na Tabela 8, são apresentados os tempos de retenção para as sulfonamidas do primeiro grupo (mais retidas), no polímero impresso e não impresso (NIP) para testes de seletividade em coluna iguais às descritas anteriormente, empregando metanol (30%) e uma solução de tampão fosfato pH 2 (20 mmol L^{-1}) como fase móvel. Com estes tempos foi possível determinar o fator de retenção (k) e a seletividade (S) do MIP em relação ao NIP. Os valores de k e S para o primeiro grupo são apresentados na Tabela 9.

Tabela 2 - Tempo de retenção para as sulfonamidas mais retidas no MIP e NIP sintetizados por precipitação

Composto	Tempo retenção (min) MIP precipitação	Tempo retenção (min) NIP precipitação
Sulfadimetoxina	13,045	5,040
Sulfametoxazol	5,788	2,800
Sulfacloropiridazina	7,727	3,168

Fonte: Autoria própria

Tabela 9 –Valores de k e S para as sulfonamidas mais retidas.

Composto	$k_{\text{nip}} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$k_{\text{nip}} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$S = \frac{k_{\text{mip}}}{k_{\text{nip}}}$
Sulfadimetoxina	37,37	13,82	2,70
Sulfametoxazol	16,02	7,23	2,21
Sulfacoloropiridazina	21,73	8,32	2,61

Fonte: Autoria própria

Do mesmo modo, são calculados k e S para as sulfonamidas menos retidas empregando metanol (10%) e uma solução de tampão fosfato pH 2 (20 mmol L⁻¹) como fase móvel. Os resultados são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Tempo de retenção para as sulfonamidas menos retidas no MIP e NIP sintetizados por precipitação

Composto	Tempo retenção (min) MIP precipitação	Tempo retenção (min) NIP precipitação
Sulfamerazina	7,738	3,414
Sulfadiazina	7,169	3,011
Sulfametazina	5,241	2,095
Sulfatiazol	7,277	3,716
Sulfacetamida	4,039	1,933

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Valores de k e S para as sulfonamidas menos retidas

Composto	$k_{\text{mip}} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$k_{\text{nip}} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$S = \frac{K_{\text{mip}}}{K_{\text{nip}}}$
Sulfamerazina	21,76	9,04	2,40
Sulfadiazina	20,08	7,86	2,56
Sulfametazina	14,41	5,16	2,80
Sulfatiazol	20,40	9,93	2,05
Sulfacetamida	10,88	4,68	2,32

Fonte: Autoria própria

É interessante conhecer os valores de k e S para cada analito, pois dessa maneira é possível conhecer o efeito da impressão molecular no momento da síntese. Esses parâmetros relacionam os tempos de retenção do polímero impresso e os do polímero não impresso. Os valores de k obtidos mostraram que o polímero impresso apresenta uma maior retenção de sulfonamidas do que o polímero não impresso. Já os valores de S demonstraram que o MIP apresenta de 2 a 2,8 vezes mais afinidade pelas sulfonamidas do que o respectivo polímero não impresso. Estes resultados foram similares aos obtidos por Shi et al., (44). Entretanto os referidos autores utilizaram o método de batelada para a síntese do polímero.

4.5 Estudo cinético

É importante conhecer o tempo de equilíbrio entre a molécula molde e o polímero de impressão molecular, pois este tempo é utilizado nos testes de seletividade competitiva e na determinação da isoterma de adsorção.

A sulfadimetoxina e o MIP chegam ao equilíbrio rapidamente, quase 90% do antimicrobiano é adsorvido nos dez primeiros minutos e manteve-se constante até os 60 minutos. Assim, o tempo de 20 minutos foi adotado como o tempo ideal e consequentemente os testes de seletividade competitiva e a isoterma de adsorção foram baseados neste tempo. O perfil da adsorção da sulfadimetoxina no MIP é apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Perfil da adsorção da sulfadimetoxina no MIP ao decorrer do tempo

4.6 Testes de seletividade competitiva

Além dos testes de seletividade em coluna, também foram realizados testes de seletividade competitiva, nos quais foi comparada a adsorção da sulfadimetoxina com a adsorção de outras sulfonamidas e alguns interferentes no polímero. Este teste foi realizado com o polímero sintetizado pelo método de precipitação. Além disso, comparou-se a adsorção da sulfonamida menos retida com a adsorção do interferente mais retido. Para isso foram formadas cinco combinações:

- 1 Sulfadimetoxina (sulfonamida mais retida) vs Cafeína (interferente mais retido)
- 2 Sulfadimetoxina vs Norfloxacino (interferente antimicrobiano)
- 3 Sulfadimetoxina vs Sulfacetamida (sulfonamida menos retida)
- 4 Sulfadimetoxina vs Sulfametoxazol (segunda sulfonamida mais retida)
- 5 Sulfacetamida vs Cafeína

Ao término dos experimentos foram obtidas as concentrações finais para cada um dos analitos e desta forma foram calculadas as constantes de distribuição (K_d), seletividade (K) e seletividade relativa (K'). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 12 a 16. Os cromatogramas dos testes de seletividade competitiva são apresentados na Figura 17.

Tabela 4 - Valores de K_d , K e K' para sulfadimetoxina vs cafeína

Adsorvente	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		Concentração final (mg L ⁻¹)		K_d		K	K'
	SDM	CAF	SDM	CAF	SDM	CAF		
MIP	1,50	1,50	0,17	0,97	1564,70	108,00	14,49	48,30
NIP	1,50	1,50	1,40	1,22	14,30	45,90	0,30	

Fonte: Autoria própria

Tabela 53 – Valores de K_d , K e K' para sulfadimetoxina vs norfloxacino

Adsorvente	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		Concentração final (mg L ⁻¹)		K_d		K	K'
	SDM	NOR	SDM	NOR	SDM	NOR		
MIP	1,50	1,50	0,32	1,10	737,50	74,54	9,89	8,04
NIP	1,50	1,50	1,16	1,22	58,62	47,54	1,23	

Fonte: Autoria própria

Tabela 64 - Valores de K_d , K e K' para sulfadimetoxina vs sulfacetamida

Adsorvente	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		Concentração final (mg L ⁻¹)		K_d		K	K'
	SDM	SCT	SDM	SCT	SDM	SCT		
MIP	1,50	1,50	0,28	0,99	871,43	105,05	8,29	2,48
NIP	1,50	1,50	1,01	1,31	97,03	29,01	3,34	

Fonte: Autoria própria

Tabela 75 - Valores de K_d , K e K' para sulfadimetoxina vs sulfametoxazol

Adsorvente	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		Concentração final (mg L ⁻¹)		K_d		K	K'
	SDM	SMX	SDM	SMX	SDM	SMX		
MIP	1,5	1,5	0,25	0,81	1000	170,37	5,87	4,16
NIP	1,5	1,5	1,17	1,25	56,40	40,00	1,41	

Fonte: Autoria própria

Tabela 86 - Valores de K_d , K e K' para sulfacetamida vs cafeína

Adsorvente	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		Concentração final (mg L ⁻¹)		K_d		K	K'
	SCT	CAF	SCT	CAF	SCT	CAF		
MIP	1,5	1,5	0,73	0,94	210,96	119,15	1,76	3,60
NIP	1,5	1,5	1,12	0,89	67,86	137,08	0,49	

Fonte: Autoria própria

O coeficiente de distribuição (K_d) indica a migração e a afinidade dos analitos pelo polímero molecularmente impresso. (45) Os resultados obtidos mostram para as sulfonamidas sempre valores maiores de K_d no MIP do que no NIP, o que é um indicativo do sucesso da impressão molecular. Ao avaliar os interferentes, é possível observar que os valores de K_d também foram maiores no MIP do que NIP mas o valor de K_d no MIP aumento pouco com relação ao valor de K_d no NIP. Ou seja, a impressão molecular aumenta também a afinidade do polímero pelos interferentes, mas esse aumento é menos expressivo do que para as sulfonamidas.

A comparação dos valores dos coeficientes de seletividade (K), permite confirmar a habilidade do polímero em reconhecer as sulfonamidas mesmo na presença de interferentes. (44,45) Ao observar os valores de K_d e K para a cafeína é evidente que o polímero apresenta uma afinidade “natural” por este composto. Entretanto, depois da impressão o polímero apresenta maior afinidade pelas sulfonamidas do que pela cafeína. Resumindo, a impressão molecular conseguiu superar a afinidade “natural” do polímero pela cafeína, mesmo nos testes competitivos com a sulfacetamida que é a sulfonamida que apresente menor afinidade pelo polímero.

O coeficiente de seletividade relativa (K') é o valor calculado para avaliar a eficiência da impressão química do polímero, onde os valores mais elevados do que uma unidade confirmam um efeito positivo. (45) Os valores de K' obtidos permitem observar que o polímero apresenta uma afinidade muito superior para sulfadimetoxina do que para norfloxacino e cafeína. Também é evidente que apresenta maior afinidade pela sulfadimetoxina do que para sulfametoxazol (segunda sulfonamida mais retida) e sulfacetamida (sulfonamida menos retida) confirmando os resultados dos testes de seletividade em coluna. O valor de K' para sulfacetamida versus cafeína, confirma que o polímero apresenta uma maior afinidade pela sulfacetamida do que para a cafeína, mesmo sendo a sulfacetamida a sulfonamida que apresenta menor afinidade pelo polímero.

Figura 17 - Cromatogramas dos testes de seletividade competitiva. 1- Sulfadimetoxina vs cafeína; 2- Sulfadimetoxina vs norfloxacino; 3- Sulfadimetoxina vs sulfacetamida; 4- Sulfadimetoxina vs sulfametoxazol; 5- Sulfacetamida vs Cafeína

Após a comprovação da seletividade e afinidade do polímero MIP (sintetizado por precipitação) pelas sulfonamidas, foram sintetizados os polímeros RAM-MIP, RAM-MIP-BSA e MIP-BSA. Estas modificações foram realizadas para conferir ao polímero MIP a capacidade de eliminar macromoléculas e, assim, serem usados em análises on-line de sulfonamidas em amostras complexas. O desempenho desses novos polímeros sintetizados quanto à seletividade, foi comprovado por testes de seletividade em coluna, os mesmos analitos injetados no polímero MIP foram injetados no sistema cromatográfico contendo a pré-coluna preenchida com os novos polímeros obtendo-se os mesmos tempos de retenção ou com diferenças pouco significativas.

4.7 Exclusão de macromoléculas

O primeiro polímero que foi avaliado quanto a sua capacidade em eliminar macromoléculas foi o MIP. Como já foi descrito, a área da banda cromatográfica obtida através da “re-injeção” de uma solução 44 mg mL⁻¹ de albumina de soro bovino, foi comparada com a área obtida da “re-injeção” dessa mesma solução injetada em um sistema cromatográfico ao qual foi acoplada a pré-coluna preenchida com o MIP. Ao comparar as áreas foi evidente a retenção das macromoléculas pelo polímero. O polímero reteve 96% das macromoléculas, o que impossibilitaria a utilização desse polímero em sistemas cromatográficos on-line ante amostras complexas em macromoléculas. A Figura 18, apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos dos testes de exclusão para o padrão de BSA 44 mg mL⁻¹ e para o MIP.

Figura 18 - Comparação da exclusão do MIP com a “re-injeção” do padrão

Fonte: Autoria própria.

Como era esperado o polímero RAM-MIP apresentou um melhor desempenho quanto à eliminação de macromoléculas. O polímero conseguiu eliminar 39,4% das proteínas o que confirma assim a funcionalização dos polímeros pela HEMA e GDMA. Embora os resultados apresentem um melhor desempenho dos polímeros RAM-MIP quanto à exclusão de macromoléculas, o polímero ainda reteve mais do que 60% das proteínas injetadas o que potencializaria problemas de entupimento das colunas ao serem acopladas no sistema cromatográfico. A Figura 19 ilustra a sobreposição dos cromatogramas dos testes de exclusão para o padrão de BSA 44 mg mL⁻¹ e para o MIP.

Figura 19 - Comparação da exclusão do RAM-MIP com a “re-injeção” do padrão

Fonte: Autoria própria.

O melhor desempenho foi dos polímeros que foram recobertos com o BSA. Os polímeros RAM-MIP-BSA e MIP-BSA conseguiram eliminar 64,3% e 97,93% das macromoléculas, respectivamente. Esperava-se que o polímero RAM-MIP-BSA apresentasse o melhor desempenho, entretanto, este polímero reteve uma elevada porcentagem de macromoléculas, o que inviabiliza seu emprego em sistemas on-line.

O polímero MIP-BSA foi capaz de excluir as proteínas eficientemente possibilitando seu uso em sistemas de preparo de amostra on-line. A alta capacidade de eliminação do polímero MIP-BSA sugere que as reações de entrecruzamento foram mais efetivas na superfície do MIP, consequentemente levando a melhor exclusão de macromoléculas. Na Figura 20 são apresentados os cromatogramas dos testes de exclusão, para o padrão de BSA 44 mg mL⁻¹ ante o RAM-MIP-BSA e o MIP-BSA. Também estão sobrepostos os cromatogramas obtidos nos testes de exclusão para todos os polímeros avaliados.

Figura 20 - Cromatogramas obtidos durante os testes de exclusão. a- RAM-MIP-BSA e padrão; b- MIP-BSA e padrão e c- Sobreposição de todos os cromatogramas advindos dos testes de exclusão.

Fonte: Autoria própria.

4.8 Isoterma de adsorção

Para avaliar a capacidade do polímero em adsorver a sulfadimetoxina e entender as características deste processo foi realizada uma isoterma de adsorção. Geralmente, são dois os modelos empregados para descrever em termos quantitativos a adsorção de solutos por sólidos a temperatura constante, esses modelos são o de Freundlich e o de Langmuir. A escolha do modelo a ser aplicado é

baseada no coeficiente de correlação das equações linearizadas, maiores coeficientes indicam maior linearidade e assim maior adaptabilidade ao modelo.(46,47)

No presente trabalho, de acordo com o coeficiente de correlação das equações, a adsorção adaptou-se melhor ao modelo de Langmuir. Este modelo já foi usado por muitos pesquisadores para descrever a adsorção de solutos por polímeros molecularmente impressos. (46,47,48,49)

O modelo de Langmuir baseia-se em três suposições: (a) a superfície de adsorção é homogênea, isto é, a adsorção é constante e independente da extensão da cobertura da superfície; (b) a adsorção ocorre em sítios específicos, sem interação com as moléculas do soluto; (c) a adsorção torna-se máxima quando uma camada monomolecular cobre totalmente a superfície do adsorvente. (27,50)

A isoterma de Langmuir é representada pela equação:

$$a_{eq} = \frac{A_{max}K_a C_{eq}}{1 + K_a C_{eq}}; \quad \text{Equação 6}$$

Onde a_{eq} é a quantidade de sulfadimetoxina adsorvida por grama de adsorvente (polímero), K_a é a constante de Langmuir e C_{eq} é a concentração no equilíbrio. Na Figura 21 são apresentados os dados experimentais do perfil de adsorção da sulfadimetoxina pelo MIP sintetizado por precipitação, à medida que a concentração de sulfadimetoxina foi aumentada. (47)

Figura 21 – Isoterma de Langmuir na adsorção de sulfadimetoxina no MIP sintetizado por precipitação

Fonte: Autoria própria.

Ao plotar C_{eq}^{-1} versus a_{eq}^{-1} obteve-se uma reta de acordo com a forma da equação linear isotérmica de Langmuir (Equação 7). Na Figura 22 é apresentada a isoterma linearizada de Langmuir na adsorção de sulfadimetoxina no MIP sintetizado por precipitação.

$$\frac{1}{a_{eq}} = \frac{1}{A_{max}} + \frac{1}{A_{max}K_a C_{eq}} ; \quad \text{Equação 7}$$

Figura 22 – Isotherma linearizada de Langmuir da adsorção de sulfadimetoxina no MIP sintetizado por precipitação

Fonte: Autoria própria.

Observando a Figura 22 é possível concluir que os dados se ajustam ($r^2 = 0,989$) ao modelo de Langmuir. Consequentemente, a capacidade máxima adsorptiva do MIP sintetizado por precipitação ante a sulfadimetoxina pode ser calculado pelo inverso do coeficiente angular da isoterma linearizada de Langmuir, o valor obtido foi $9,80 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$. Resultados comparáveis foram obtidos por Valtchev et al. Os referidos autores avaliaram a adsorção de sulfametoxazol em vários polímeros de impressão molecular e obtiveram valores entre $2,3 \times 10^{-5}$ e $6,5 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$ (47). Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram uma capacidade máxima de adsorção de uma ordem de magnitude acima dos resultados de Valtchev.

4.9 Microscopia eletrônica de varredura

As microscopias eletrônicas de varredura obtidas para o polímero sintetizado pelo método em batelada mostraram que este não apresenta uma forma regular, já o polímero sintetizado por precipitação apresenta partículas menores, estrutura globular e uma maior macroporosidade. Essas características do polímero sintetizado pelo método de precipitação influenciaram a pressão e efetividade das pré-colunas. Embora o procedimento para seleção das partículas e empacotamento das pré-colunas tenha sido o mesmo empregado para os dois polímeros, a pré-coluna empacotada com o polímero MIP sintetizado por precipitação suportou vazões de até 10 mL min^{-1} (capacidade máxima da bomba) o que não foi possível com o polímero obtido por batelada. Além disso, este polímero foi o mais eficiente, o que concorda com a teoria, pois a diminuição do tamanho da partícula e a sua homogeneidade resulta em colunas mais eficientes. (51) A Figura 23 apresenta as microscopias de varredura para os polímeros feitos pelo método em batelada e precipitação.

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura dos polímero MIP. A - MIP em batelada; B - MIP precipitação.

Fonte: Autoria própria.

A morfologia dos polímeros RAM-MIP também foi arredondada e com porosidade elevada (Figura 24). O recobrimento com BSA deixou as partículas do RAM-MIP-BSA e MIP-BSA um pouco rugosa, mas os polímeros apresentaram a mesma eficiência e suportaram vazões de até 10 mL min^{-1} (Figura 25).

Figura 24 - Microscopia de varredura eletrônica do polímero RAM-MIP.

Fonte: Autoria própria.

Figura 25 - Microscopia de varredura eletrônica dos polímeros. A - RAM-MIP-BSA; B – MIP-BSA.

Fonte: Autoria própria.

4.10 Otimização do sistema bidimensional

A pré-coluna preenchida com o polímero MIP-BSA foi a escolhida para as análises on-line de sulfonamidas em amostras complexas. Esta coluna apresentou a maior capacidade para excluir macromoléculas e demonstrou ser seletiva para sulfonamidas. A matriz selecionada para a análise foi esgoto suíno, uma matriz bastante complexa e ideal para testar os polímeros.

O sistema foi operado no arranjo *backflush* (ou seja, com inversão do sentido do fluxo na coluna MIP-BSA). O sistema operou da seguinte forma: primeiro a bomba C

impulsiona a solução de carregamento (tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, pH 2,0, 1 mL min⁻¹) através do amostrador e a coluna MIP-BSA, ao mesmo tempo as bombas A e B condicionam a coluna analítica impulsionando a fase móvel com as condições iniciais do gradiente para a eluição e separação dos analitos. Uma quarta bomba (D) passa solvente diretamente para o espectrômetro de massas (Figura 26). Enquanto as válvulas são mantidas na configuração 1, a amostra é injetada, os analitos são retidos na pré-coluna e as macromoléculas e interferentes são excluídos da coluna MIP-BSA. Após 4 minutos a válvula de carregamento foi girada e uma fase móvel composta por 100% água passou pela pré-coluna durante 3 minutos para tirar o excesso de fosfato e evitar assim que este chegasse ao detector de massas (Figura 27). No minuto 7 as válvulas foram giradas novamente e os analitos foram eluídos da pré-coluna e direcionados para a coluna analítica com um gradiente de acetonitrila que começou em 5% e chegou a 100% depois de 3 minutos (Figura 28). Os analitos foram separados pela coluna analítica e analisados por um espectrômetro de massas baseado em tempo de voo. Finalmente, após 21 minutos o sistema volta para a configuração 1 (Figura 26) e fica pronto para uma nova injeção.

Figura 26 – Arranjo instrumental utilizado no sistema on-line (Carregamento-configuração 1).

Fonte: Autoria própria.

Figura 27 - Arranjo instrumental utilizado no sistema on-line (Lavagem-configuração 2).

Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Arranjo instrumental utilizado no sistema on-line (Dessorção-configuração 3).

Fonte: Autoria própria.

4.11 Validação

Os resultados do estudo de linearidade como: faixa linear, equações de reta, coeficientes de correlação e de determinação, bem como os limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 17. As curvas de calibração são apresentadas no anexo 1.

Tabela 97 - Dados da linearidade para as sulfonamidas avaliadas.

	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
Sulfametazina	$Y=0,072x + 1,391$	0,9973
Sulfadimetoxina	$Y=0,0086x + 2,4235$	0,9879
Sulfadiazina	$Y=0,0051x + 0,3523$	0,9917
Sulfametoxazol	$Y=0,0014x + 0,0079$	0,9998
Sulfacloropiridazina	$Y=0,0007x + 0,0397$	0,9988
Sulfamerazina	$Y = 0,036x + 0,8268$	0,979
Sulfatiazol	$Y=0,0009 + 0,1375$	0,992

Fonte: Autoria própria.

Os coeficientes de correlação foram maiores ou iguais a 0,99 e os coeficientes de determinação maiores do que 0,98 para sulfametazina, sulfametoxazol, sulfacloropiridazina, sulfadimetoxina, sulfadiazina e sulfatiazol demonstrando que o método apresenta ajuste adequado para esses analitos. Segundo a recomendação da Anvisa, para linearidade o critério mínimo de aceitação é coeficiente de correlação (r) igual a 0,99. Portanto, se elevar ao quadrado deve dar um coeficiente de determinação maior que 0,98. Para sulfamerazina o valor do coeficiente de correlação foi abaixo de 0,98. Esse composto apresentou uma elevada intensidade de sinal o que fez com que nos níveis superiores o detector provavelmente saturasse e assim a resposta desse analito não fosse linear. Possivelmente o estreitamento do intervalo linear estudado para esse analito resolveria o problema.

Os resultados da precisão intra-dias e inter-dias encontram-se sumarizados na Tabela 18. Todas as sulfonamidas estudadas apresentaram desvio padrão relativos abaixo de 15%, demonstrando precisão adequada do método para esses analitos.

A Tabela 19, apresenta os dados da recuperação relativa dos níveis baixo, médio e alto. Os resultados obtidos indicam, para uma matriz complexa, um método com eficiência relativamente próxima a 100% para todos os compostos estudados, com valores de recuperação entre 91 e 118%.

Após a validação o sistema foi utilizado para quantificar sulfonamidas em amostras reais de esgoto suíno. Não foram detectadas sulfonamidas em nenhuma das amostras, provavelmente porque o limite de quantificação é relativamente alto ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). Com intuito de obter limites de quantificação e detecção mais baixos estão sendo implementados estudos de cromatografia on-line utilizando como detector um espectrômetro de massas sequencial do tipo quadrupolo – “Ion trap linear”, o qual apresenta melhor detectabilidade do que o sistema de tempo de voo utilizado neste trabalho. Além disso, esse novo sistema permite injeções de volume de amostra de até $1.500 \mu\text{L}$, quinze vezes mais do que o permitido no sistema atual.

Tabela 18 - Dados obtidos para estudo da precisão intra-dia e inter-dia das sulfonamidas

Composto	Níveis	Intra-dia 1 (DPR %)	Intra-dia 2 (DPR %)	Inter-dia (DPR %)
Sulfametazina	Baixo	2	12,53	14,26
	Médio	5,87	13,92	3,18
	Alto	2,47	10,77	6,89
Sulfadimetoxina	Baixo	5,65	10,16	6,09
	Médio	6,49	13,62	11,27
	Alto	10,18	8,5	2,65
Sulfadiazina	Baixo	7,08	6,36	5,26
	Médio	14,21	13,02	6,66
	Alto	14,99	11,33	7,9
Sulfametoxazol	Baixo	11,41	10,49	8,29
	Médio	4,49	9,83	6,89
	Alto	4,62	11,47	6,9
Sulfacloropiridazina	Baixo	6,61	13,07	6,70
	Médio	9,03	11,9	10,81
	Alto	4,18	12,19	8,87
Sulfamerazina	Baixo	6,57	10,64	11,07
	Médio	14,05	13,38	2,22
	Alto	11,97	13,86	7,32
Sulfatiazol	Baixo	4,01	6,66	6,78
	Médio	8,69	6,46	5,74
	Alto	7,53	12,81	13,62

Fonte: Autoria própria.

Tabela 19 - Recuperação relativa

Composto	Recuperação relativa		
	Nível baixo % recuperação	Nível médio % recuperação	Nível alto % recuperação
Sulfametazina	111,13	118,04	105,41
Sulfadimetoxina	108,57	117,30	102,49
Sulfadiazina	102,58	112,70	95,33
Sulfametoxazol	103,19	98,92	100,41
Sulfacloropiridazina	116,84	105,71	104,03
Sulfamerazina	114,86	120,04	103,35
Sulfatiazol	106,19	91,14	94,28

Fonte: Autoria própria.

5 Conclusão

Neste trabalho foram avaliadas duas metodologias de impressão molecular (em batelada e precipitação). Os resultados de seletividade, fator de retenção e os coeficientes de seletividade, demonstraram que o polímero sintetizado pelo método de precipitação apresenta melhor desempenho na concentração de sulfonamidas e eliminação de interferentes do que o análogo polímero obtido por batelada. Também, foi demonstrado que em uma solução de tampão fosfato (pH 2,0) o polímero sintetizado por precipitação apresenta um desempenho ideal. O comportamento resulta ideal porque o polímero apresenta uma alta afinidade pelas sulfonamidas e pouca ou nenhuma pelos interferentes avaliados.

O polímero MIP sintetizado pelo método de precipitação apresentou adsorção compatível com o modelo de Langmuir, e sua capacidade máxima adsorptiva foi $9,80 \times 10^{-4}$ mol de sulfadimetoxina por grama de polímero.

Além das sínteses dos polímeros mencionados anteriormente, foram sintetizados 3 polímeros restrito a ligação com macromoléculas (MIP-BSA, RAM-MIP e RAM-MIP-BSA), sendo o polímero MIP-BSA o que melhor desempenho apresentou na exclusão de macromoléculas (97,9% de exclusão).

A validação demonstrou que método desenvolvido apresenta boa linearidade, precisão e recuperação. Porém, para ser utilizado na determinação de sulfonamidas em matrizes complexas ambientais é necessário usar um espectrômetro de massas com melhor detectabilidade que o empregado neste trabalho, bem como um sistema cromatográfico que permita a injeção de maiores volumes de amostra ou fator de pré-concentração.

Referências

- 1 FENT, K.; WESTON, A. A; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–59, 2006.
- 2 BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIAŃSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 196, p. 1–15, 2011.
- 3 YU, H.; MU, H.; HU, Y.-M. Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC–DAD. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 76–81, 2012.
- 4 OAKS, J. L. et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 630–3, 2004.
- 5 TONG, L.; LI, P.; WANG, Y.; ZHU, K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. **Chemosphere**, v. 74, n. 8, p. 1090–7, 2009.
- 6 BROWN, K. D.; KULIS, J.; THOMSON, B.; CHAPMAN, T. H.; MAWHINNEY, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. **The Science of the Total Environment**, v. 366, n. 2-3, p. 772–83, 2006.
- 7 ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **The Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1069–75, 2010.
- 8 BATT, A. L.; BRUCE, I. B.; AGA, D. S. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 142, n. 2, p. 295–302, 2006.
- 9 LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 3, p. 385–93, 2011.
- 10 AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). **Antimicrobianos: Bases teóricas e uso clínico**. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/mo_dulo1/bibliografia.htm>. Acesso em: 3 ago. 2014.
- 11 HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466–485, 2007.
- 12 CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. [Antimicrobial mechanisms of action]. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 1, p. 44–52, 2009.

- 13 RENEW, J. E.; HUANG, C.-H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1042, n. 1-2, p. 113–121, 2004.
- 14 RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84–98, 2012.
- 15 DEAN, A. Sample preparation for chromatographic an overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 236, p. 3–42, 1990.
- 16 PAVLOVIĆ, D. M.; BABIĆ, S.; HORVAT, A. J. M.; KAŠTELAN-MACAN, M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1062–1075, 2007.
- 17 SEIFRTOVÁ, M.; NOVÁKOVÁ, L.; LINO, C.; PENA, A.; SOLICH, P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, n. 2, p. 158–79, 2009.
- 18 TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 87–99, 2010.
- 19 PEREZ-MORAL, N. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, n. 1, p. 15–21, 2004.
- 20 TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 32–40, 2007.
- 21 CORMACK, P. A G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, v. 804, n. 1, p. 173–182, 2004.
- 22 BELTRAN, A.; BORRULL, F.; MARCÉ, R. M.; CORMACK, P. A. G. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1363–1375, 2010.
- 23 MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 169–181, 2013.
- 24 SHI, X.; MENG, Y.; LIU, J.; SUN, A.; LI, D.; YAO, C.; LU, Y.; CHEN, J. Group-selective molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 15-16, p. 1071–6, 2011.
- 25 SEGATELLI, M. G.; SANTOS, V. S.; PRESOTTO, A. B. T.; YOSHIDA, I. V. P.; TARLEY, C. R. T. Cadmium ion-selective sorbent preconcentration method using ion imprinted poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-vinylimidazole). **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 6, p. 325–333, 2010.

- 26 SAMBE, H.; HOSHINA, K.; HAGINAKA, J. Molecularly imprinted polymers for triazine herbicides prepared by multi-step swelling and polymerization method. Their application to the determination of methylthiotriazine herbicides in river water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 130–137, 2007.
- 27 ISAC, G. DE O.; MORAES. **Síntese de um polímero de impressão molecular restrito à la ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAM-MIPBSA), para análise direta de clorpromazina em plasma por sistema de cromatografia líquida bidimensional**. 2012. 66 f. Tese (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.
- 28 SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 141–156, 2004.
- 29 MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 263–73, 2007.
- 30 SCHÄFER, C.; LUBDA, D. Alkyl diol silica: restricted access pre-column packings for fast liquid chromatography-integrated sample preparation of biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 909, n. 1, p. 73–8, 2001.
- 31 SADÍLEK, P.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375–384, 2007.
- 32 HAGINAKA, J.; TAKEHIRA, H.; HOSOYA, K.; TANAKA, N. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. **Journal of Chromatography A**, v. 849, n. 2, p. 331–339, 1999.
- 33 CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 7-8, p. 1462–1469, 2006.
- 34 CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M.; PEDRAZZOLI, J. Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 766, n. 1, p. 153–60, 2002.
- 35 CASS, Q. B.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; CASSIANO, N. M.; DEGANI, A. L. G.; PEDRAZZOLI, J. Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral–chiral column-switching. **Journal of Chromatography B**, v. 798, n. 2, p. 275–281, 2003.
- 36 RIBANI, M. B.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- 37 CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

- 38 BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.
- 39 MENEZES, M. L.; FÈLIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863–2871, 1998.
- 40 SANTOS-NETO, Á. JOSÉ. **Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos : da escala convencional à miniaturizada**. 2007. 217 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- 41 MENEZES, M. L.; FÈLIX, G. On line Extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863–2871, 1998.
- 42 PENG-JU, W.; JUN, Y.; QING-DE, S.; YUN, G.; XIAO-LAN, Z.; JI-BAO, C. Rapid removal of template from molecularly imprinted polymers by accelerated solvent extraction. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 484–488, 2007.
- 43 ELLWANGER, A.; KARLSSON, L.; OWENS, K.; BERGGREN, C.; CARLO, E.; KEES B.; CORMACK, S.; PETER, S.; DAVID, S. Evaluation of methods aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers. **The Analyst**, v. 126, n. 6, p. 784–792, 2001.
- 44 SHI, X.; MENG, Y.; LIU, J.; SUN, A.; LI, D.; YAO, C.; LU, Y.; CHEN, J. Group-selective molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 15-16, p. 1071–1076, 2011.
- 45 ANDRADE, F. N. Microextraction by packed sorbent liquid chromatography with time of flight mass spectrometry of triazines employing a molecularly imprinted polymer. **Journal of Separation Science**, p. 1–16, 2014.
- 46 DE OLIVEIRA ISAC MORAES, G.; DA SILVA, L. M. R.; DOS SANTOS-NETO, A. J.; FLORENZANO, F. H.; FIGUEIREDO, E. C. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7687–96, 2013.
- 47 VALTCHEV, M.; PALM, B. S.; SCHILLER, M.; STEINFELD, U. Development of sulfamethoxazole-imprinted polymers for the selective extraction from waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2-3, p. 722–728, 2009.
- 48 AHMAD, T.; GUIOCHON, G. Numerical determination of the adsorption isotherms of tryptophan at different temperatures and mobile phase compositions. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, n. 2, p. 148–63, 2007.
- 49 LV, Y.; WANG, L.; YAN, S.; WANG, X.; SUN, H. Synthesis and characterization of molecularly imprinted poly (methacrylic acid)/ silica hybrid composite materials for selective recognition of lincomycin in aqueous media. **Journal of Applied Polymer Science**, V. 126, 1631–1636 2012.

50 SOUZA, R. S.; CHAVES, L. H. G.; FERNANDES, J. D. Isotermas de langmuir e de Freundlich na descrição da adsorção de zinco em solos do Estado da Paraíba 1 Langmuir and Freundlich isotherms to describe zinc adsorption by soils from. **Revista Brasileira de Ciencias Agrarias**, v. 2, p. 123–127, 2007.

51 LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 382 p.

Anexo 1: Curvas analíticas para as sulfonamidas

Anexo 2: Cromatograma obtido no sistema on-line (ponto baixo)

Anexo 3: Composição do esgoto sintético.

Composição	Quantidade para 1 L
Sacarose	35,0 mg
Amido	114,0 mg
Extrato de carne	208,0 mg
Óleo de soja	51,0 mg
NaCl	250,0 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	7,0 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,5 mg
NaHCO ₃	200,0 mg
Detergente	3 gotas

Fonte: TORRES, P., 1992.

- 1 TORRES, P. Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação. **Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.**