UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

*Determinação de tetraciclina utilizando eletrodos compósitos grafite-
poliuretana modificados com polímeros metacrilatos com impressão
molecular*

José Eduardo dos Santos Clarindo

SÃO CARLOS

2017

JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS CLARINDO

**DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA UTILIZANDO
ELETRODOS COMPÓSITOS GRAFITE-POLIURETANA
MODIFICADOS COM POLÍMEROS METACRILATOS COM
IMPRESSÃO MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (IQSC/USP), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Éder T. G. Cavalheiro.

SÃO CARLOS

2017

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são primeiramente a Deus, por conceder-me saúde e sabedoria para desempenhar este trabalho, o maior e mais importante desafio da minha carreira.

Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavaleiro, pela oportunidade, confiança, orientação e ensinamentos durante esses dois anos.

À Dr^a. Priscila Cervini, pela parceria, amizade, total disponibilidade e empenho no desenvolvimento de todo trabalho, desde sua concepção à sua finalização.

Aos colegas do LATEQS e IQSC que contribuíram de alguma forma nesses anos, seja no companheirismo diário, como nas reuniões de grupo, ajudando-me a fortalecer o trabalho.

Aos meus familiares, que mesmo de longe, sempre torceram e mandaram boas energias para que tudo transcorresse bem.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pelo apoio, proporcionando-me totais condições para a realização deste projeto.

Ao CNPq, pela bolsa institucional concedida, fundamental para minha manutenção durante o mestrado e realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho propôs-se desenvolver eletrodos compósitos à base de grafite-poliuretana modificados com polímeros metacrilatos com impressão molecular (MIP-TC), visando a determinação do antibiótico tetraciclina em formulações farmacêuticas e urina sintética. O trabalho também visou contribuir no desenvolvimento de um sensor com melhor desempenho no que diz respeito à sensibilidade e seletividade do eletrodo compósito modificado, na quantificação do analito/molécula molde em matrizes complexas. Técnicas eletroanalíticas, tais como voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) foram utilizadas para avaliar a resposta em termos de sensibilidade e seletividade do eletrodo compósito na detecção da tetraciclina (TC), proposto neste trabalho. A otimização dos parâmetros, tais como composição do MIP (5,0 %, *m/m*), amplitude de pulso (50 mV), velocidade de varredura (10 mV s⁻¹), tempo (300 s) e potencial de acumulação [(+ 0,7 V (*vs.* SCE))] e faixa granulométrica do MIP (150 a 250 µm), usando voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial foi realizada para maximizar a determinação da tetraciclina em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 2,5), permitindo obter limites de detecção de 0,555 µmol L⁻¹, 2,70 µmol L⁻¹ e 4,71 µmol L⁻¹, respectivamente, para o EGPU-MIP-TC, EGPU e EGPU-NIP, sem necessidade de renovação da superfície do eletrodo entre as sucessivas medidas. Regiões lineares entre 4,0 e 60,0 µmol L⁻¹, 8,0 e 60,0 µmol L⁻¹ e 20,0 e 100,0 µmol L⁻¹ foram observadas, respectivamente, para o EGPU-MIP-TC, EGPU e EGPU-NIP, para o pico anódico em + 0,9 V (*vs.* SCE). Os EGPU também foram testados quanto à seletividade frente à possíveis interferentes, sendo utilizados clortetraciclina (CTC) e oxitetraciclina (OTC) para os testes de interferência. Em todos os casos, a interferência do EGPU-MIP-TC foi menor do que a obtida com o EGPU-NIP, confirmando que o EGPU-MIP-TC foi mais efetivo na capacidade de reconhecer seletivamente o analito na presença dos interferentes CTC e OTC. Após as etapas de síntese dos MIP/NIP e confecção dos eletrodos, otimização dos parâmetros, avaliações e testes de sensibilidade e seletividade dos EGPU, os eletrodos foram submetidos à aplicação em duas amostras de medicamentos comerciais, TetraMed® 500 mg e genérico de cloridrato de tetraciclina 500 mg e uma amostra sintética de urina. Os resultados foram comparados ao método oficial por HPLC, apresentando 95 % de confiança, de acordo com o teste *t*-Student.

ABSTRACT

In this work, graphite-polyurethane composites electrodes were modified with methacrylate molecularly imprinted polymers (MIP-TC) in order to evaluate the electrodes in the determination of tetracycline (TC) antibiotic in pharmaceutical formulations as well as in biological fluid. The work aimed to contribute in development of a sensor with better performance about the sensitivity and selectivity of the composites electrodes modified in quantification of this analyte. Electroanalytical techniques such as cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were used to evaluate the selectivity and sensitivity of the composite electrodes in the detection of tetracycline. The parameters optimization, such as MIP composition (5.0 %, *m/m*), pulse amplitude (50 mV), scan rate (10 mV s⁻¹), accumulation time (300 s), accumulation potential [+ 0.7 V (*vs.* SCE)], and MIP granulometry (150 to 250 µm), using differential pulse anodic stripping voltammetry was done to maximize the determination of tetracycline in phosphate buffer 0.1 mol·L⁻¹ pH 2.5 resulting in LOD of 0.555 µmol L⁻¹, 2.70 µmol L⁻¹ and 4.71 µmol L⁻¹, respectively for the EGPU-MIP-TC, EGPU and EGPU-NIP, without the need for surface renovation between the measures. A linear dynamic range from 4.0 to 60.0 µmol L⁻¹, 8.0 to 60.0 µmol L⁻¹ and 20.0 to 100.0 µmol L⁻¹, respectively for the EGPU-MIP-TC, EGPU and EGPU-NIP was observed for the anodic peak at + 0.9 V (*vs.* SCE). The EGPU were also tested regarding the selectivity compared to possible interferents, such as chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC) for the interference study. In all cases, the interference of EGPU-MIP-TC was lower than the one that was got with EGPU-NIP, confirming that the EGPU-MIP-TC was more selective than the non-imprinted polymer in the capacity of recognizing, selectively, the analyte in presence of CTC and OTC interferents. After the steps of synthesis of MIP/NIP and electrodes confection, parameters optimization, evaluation and EGPU sensitivity and selectivity studies, the electrodes were submitted to the application in two commercial drugs containing 500 mg of tetracycline cloridrate, TetraMed® and generic; and a synthetic urine sample. The results were compared to the official method by HPLC, presenting 95 % confidence according to the *t*-Student test.

LISTA DE ABREVIACÕES

AIBN	Azobis-(isobutironitrila)
AdSDPV	Voltametria adsortiva de redissolução anódica por pulso diferencial
BET	Brunauer, Emmett e Taller
CTC	Clortetraciclina
CV	Voltametria cíclica
DPV	Voltametria de pulso diferencial
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
EGPU	Eletrodo de grafite-poliuretana
EGPU-MIP-TC	Eletrodo compósito grafite-poliuretana com o MIP-TC
EGPU-NIP	Eletrodo compósito grafite-poliuretana com o NIP
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LOD	Limite de detecção
MAA	Ácido metacrílico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Polímero com impressão molecular
NIP	Polímero sem impressão molecular
OTC	Oxitetraciclina
PU	Poliuretana
SCE	Eletrodo de calomelano saturado
SPE	Extração em fase sólida
TC	Tetraciclina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidades molares dos reagentes utilizados na síntese dos sistemas MIP-TC e NIP.....	22
Tabela 2 Quantidades em massa utilizadas na confecção dos eletrodos.....	24
Tabela 3 Composição química da urina sintética.....	28
Tabela 4 Energia de dissociação (ΔE , em $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) dos complexos tetraciclina-(monômero) ₇	33
Tabela 5 Valores de área ativa e densidade de corrente determinados por cronocoulometria usando ferricianeto de potássio $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para o EGPU sem o modificador e EGPU-MIP-TC contendo 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 % do MIP (11:1), preparados por maceração, na granulometria $< 150 \mu\text{m}$	42
Tabela 6 Valores de área ativa e densidade de corrente determinados por cronocoulometria usando ferricianeto de potássio $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em todas as granulometrias, menores que $150 \mu\text{m}$, 150 a $250 \mu\text{m}$ e maiores que $300 \mu\text{m}$, para o EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP contendo 5,0 % de modificador e preparados por maceração.....	43
Tabela 7 Valores de área ativa e densidade de corrente determinados por cronocoulometria usando ferricianeto de potássio $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para o EGPU sem o modificador e EGPU-MIP-TC contendo 5,0 % do MIP (4:1), preparados por solvente, na granulometria entre 150 e $250 \mu\text{m}$	45
Tabela 8 Média e desvio padrão das correntes de pico medidas em 10 determinações sucessivas em solução de TC $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 2,5 dos EGPU-MIP-TC (4:1), preparados por solvente, contendo 5,0 % do MIP nas três granulometrias.....	46
Tabela 9 Correntes anódicas medidas para solução padrão de TC $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH = 2,5) no EGPU-MIP-TC 5,0 %, considerando diferentes linhas base, nos dois potenciais de pico.....	51

Tabela 10 Parâmetros selecionados após otimização para a determinação da TC usando os eletrodos compósitos EGPU modificados com MIP-TC.....	52
Tabela 11 Figuras de mérito para os eletrodos EGPU-MIP-TC, EGPU e EGPU-NIP.....	55
Tabela 12 Determinação da TC em formulações farmacêuticas pelo método de adição de padrão, em triplicata, usando o EGPU-MIP-TC por DPAdASV e HPLC.....	59
Tabela 13 Coeficiente de recuperação de TC das formulações farmacêuticas e urina sintética.....	61
Tabela 14 Interferência da CTC no sinal obtido para 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TC usando os EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP.....	63
Tabela 15 Interferência da OTC no sinal obtido para 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TC usando os EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do processo de formação do MIP.....	16
Figura 2 Fórmula estrutural da tetraciclina.....	17
Figura 3 Representação esquemática da confecção (a) e imagem real (b) dos EGPU.....	25
Figura 4 Mapa do potencial eletrostático da molécula de tetraciclina.....	31
Figura 5 Estruturas otimizadas dos complexos tetraciclina-(monômeros) ₇ utilizando o método wB97XD/6-31G(d).....	32
Figura 6 Acompanhamento por UV absorbância x comprimento de onda (a) e absorbância x tempo (b), da extração da TC no MIP-TC em 360 nm, de 6 em 6 horas, durante 42 horas.....	34
Figura 7 Imagens de MEV do MIP-TC (a, c, e) e do NIP (b, d, f) com magnificações de 70 x, 1000 x e 5000 x.....	36
Figura 8 Imagens de MEV do EGPU-MIP-TC (a, c) e do EGPU-NIP (b, d) com magnificações de 200 x e 7000 x para o EGPU-MIP-TC e 200 x e 2500 x para o EGPU-NIP.....	37
Figura 9 Imagens de MEV das partículas de MIP-TC (a, b) com magnificações de 70 x e 1000 x e dos compósitos EGPU-MIP-TC (c, d) e EGPU-NIP (e, f) com magnificações de 200 x e 1500 x, respectivamente.....	39
Figura 10 Voltamogramas cíclicos para o ferricianeto de potássio 5,0 mmol·L ⁻¹ em KCl 0,5 mol·L ⁻¹ , com $v = 25 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, utilizando o EGPU não modificado e os EGPU modificados com 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % de MIP-TC.....	40
Figura 11 Voltamogramas comparativos dos EGPU-MIP-TC preparados nas três granulometrias estudadas, < 150 µm, 150 e 250 µm e > 300 µm.....	47

Figura 12 Voltamogramas de pulso diferencial para a TC $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato pH = 2,5 com os EGPU não-modificado e modificados com 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % de MIP, com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$	49
Figura 13 Exemplo de linhas base testadas para as determinações quantitativas de TC. Neste caso foi usada uma solução contendo padrão de TC $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH = 2,5) no EGPU-MIP-TC 5% (linha preta), medidas em relação ao branco (curva azul), em relação ao método “ombro a ombro”, como tomado no potenciostato (linhas verdes) e usando uma linha base obtida a partir de curvas de calibração (linha em vermelha).....	50
Figura 14 Voltamogramas comparativos entre os EGPU para uma solução de TC $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato pH = 2,5.....	53
Figura 15 Curvas analíticas para o EGPU, EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP, usando o pico de oxidação em + 0,9 V (vs. SCE), com destaque para os voltamogramas obtidos para o EGPU-MIP-TC.....	54
Figura 16 Voltamogramas de DPAdASV nas condições otimizadas (a) e curvas de adição de padrão típicas (b), em tampão fosfato pH 2,5 para TC no medicamento Tetramed®.....	56
Figura 17 Voltamogramas de DPAdASV nas condições otimizadas (a) e curvas de adição de padrão típicas (b), em tampão fosfato pH 2,5 para TC no medicamento cloridrato de tetraciclina 500 mg genérico.....	58
Figura 18 Voltamogramas de DPAdASV nas condições otimizadas (a) e curvas de adição de padrão típicas (b) em tampão fosfato pH 2,5 para TC na urina sintética.....	60
Figura 19 Fórmulas estruturais da tetraciclina em (a), da oxitetraciclina em (b) e da clortetraciclina em (c).....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Eletrodos compósitos	13
1.2 Polímeros com impressão molecular (MIP).....	15
1.3 Tetraciclina (TC).....	17
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Equipamentos	20
3.2 Eletrodos.....	20
3.3 Reagentes e Soluções.....	21
3.4 Cálculos químico quânticos.....	21
3.5 Síntese dos polímeros com impressão molecular para a TC (MIP-TC) e sem impressão molecular (NIP)	22
3.6 Confeção dos eletrodos compósitos de grafite-poliuretana modificados (EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP) e sem modificação (EGPU).....	23
3.7 Tratamento mecânico	25
3.8 Caracterização dos MIP-TC, NIP, EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP.....	25
3.8.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	25
3.8.2 Adsorção/dessorção de N ₂ pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET)	26
3.9 Estudos voltamétricos utilizando os EGPU-MIP-TC	26
3.10 Determinação da área ativa dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP.....	26
3.11 Estudo da repetibilidade dos EGPU-MIP-TC.....	27
3.12 Curvas analíticas dos EGPU-MIP-TC, EGPU-NIP e EGPU para a TC em DPAdASV	27
3.13 Determinação da TC em formulações farmacêuticas comerciais usando EGPU-MIP-TC	27
3.14 Determinação da TC em amostra de urina sintética usando o EGPU-MIP-TC.....	28
3.15 Estudo de seletividade dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP – Teste de interferência.....	29
4 ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE O EFEITO DE PARÂMETROS INSTRUMENTAIS NA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DA TC NO EGPU-MIP-TC	29

4.1 Voltametria cíclica (CV)	29
4.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV) e adsorção de redissolução anódica (DPAdASV)	29
4.2.1 Otimização do potencial de acumulação	30
4.2.2 Otimização do tempo de acumulação.....	30
4.2.3 Otimização da amplitude de pulso (α) e velocidade de varredura (ν)	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Simulação computacional.....	31
5.2 Síntese dos polímeros com impressão molecular para a TC (MIP-TC) e sem impressão molecular (NIP) e confecção dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP	33
5.3 Caracterização dos polímeros com (MIP-TC) e sem impressão molecular (NIP)	35
5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
5.3.2 Adsorção/dessorção de N ₂ pelo método Brauner-Emmett-Teller (BET)	39
5.4 Avaliação da resposta dos eletrodos EGPU com diferentes quantidades de MIP-TC	39
5.5 Determinação de área ativa dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP.....	40
5.6 Considerações sobre o comportamento voltamétrico e estabilidade das tetraciclinas.....	47
5.7 Curvas analíticas dos EGPU-MIP-TC, EGPU-NIP e EGPU para a TC em DPAdASV	52
5.8 Determinação da TC em formulações farmacêuticas comerciais usando o EGPU-MIP-TC	56
5.9 Determinação da TC em urina sintética usando o EGPU-MIP-TC.....	59
5.10 Cálculo dos coeficientes de recuperação	61
5.11 Estudo de seletividade do EGPU-MIP-TC – Teste de interferência	62
6 CONCLUSÕES.....	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8 ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eletrodos compósitos

Segundo Tallman e Petersen, um eletrodo compósito é constituído de pelo menos uma fase condutora aglutinada e por uma fase isolante, resultando em propriedades diferentes dos materiais originais [1]. As partículas condutoras e isolantes podem estar distribuídas de modo ordenado ou aleatório. Se a distribuição for ordenada, o componente isolante pode ficar confinado em uma região do compósito enquanto o componente condutor ordenado atravessa o corpo do material. Normalmente, a fase condutora é a grafite e a fase isolante pode ser constituída por óleos minerais, no caso da pasta de carbono, ou ceras e polímeros, no caso de compósitos sólidos.

A facilidade de preparação desses materiais eletródicos permite desenvolver sensores de tamanhos e formas diferentes, com a possibilidade de incorporação de uma variedade de modificadores, podendo aumentar a seletividade e sensibilidade dos eletrodos.

Os principais métodos de preparação dos compósitos se baseiam [1]:

- Na *termomodelagem* de uma mistura homogênea dos sólidos envolvidos;
- Na *compressão mecânica* de uma mistura de pós, para obtenção de pastilhas;
- Na polimerização “*in situ*” do monômero devidamente misturado com a grafite;
- Pela *liquefação (fusão)* do aglutinante, homogeneização dos componentes do sistema e resfriamento da mistura;
- Na dissolução de um polímero em solvente adequado, dispersando-se a grafite em solução e evaporando-se o solvente.

O Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções (LATEQS) do IQSC/USP vem desenvolvendo estudos utilizando o eletrodo compósito de grafite e poliuretana de origem vegetal, na determinação de diversos analitos, entre eles, a tetraciclina [2-4], desde 2002.

Há uma série de vantagens no uso deste tipo de material de eletrodo, tais como:

- Facilidade de preparação e regeneração da superfície;
- Possibilidade de incorporação de modificadores no corpo do eletrodo e não somente na superfície;
- Custo de confecção relativamente baixo;
- Preparação de um eletrodo com relativa resistência mecânica a solventes não-aquosos;
- Durabilidade e longa vida útil;

A resina poliuretana de origem vegetal também demonstra algumas características importantes, sendo elas [3,4]:

- Ambientalmente sustentável;
- Biocomponente, facilitando a preparação e estocagem;
- Alta hidrofobicidade;
- Facilidade de renovação de superfície;
- Possibilidade de agregar modificadores ao compósito;
- Possibilidade de modelar eletrodos com diversas geometrias;
- Resistência a solventes não-aquosos;

Os eletrodos compósitos à base de grafite e poliuretana também tem sido utilizados como alternativa ao mercúrio, na determinação de analitos com atividade biológica e/ou farmacêutica usando várias estratégias de detecção em batelada e em fluxo [2-4].

1.2 Polímeros com impressão molecular (MIP)

Em 1930, Polyakov [5] iniciou o desenvolvimento da impressão molecular a partir de uma quantidade de sílica gel com um solvente aditivo (molde). Ao final do processo, a sílica mostrava afinidade de ligação a este solvente.

O conceito de impressão molecular despontou da teoria de Pauling em relação à formação dos anticorpos, na qual um antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos [6]. Deste surgiu a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional, um polímero, ao redor de uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular. Esses polímeros são chamados polímeros com impressão molecular, (do inglês, *Molecular Imprinted Polymers, MIP*) e também designados de materiais biomiméticos [7,8].

A abordagem da impressão molecular oferece várias vantagens sobre outros processos utilizados para preparar receptores sintéticos [9]. Os MIP oferecem uma maior estabilidade química, térmica, mecânica do material resultante e conseqüentemente, maior robustez que os análogos biológicos, com a mesma afinidade e seletividade para o analito impresso semelhante ao dos receptores naturais [10,11].

Além disso, as impressões moleculares na superfície fornecem maior controle na orientação e densidade de sítios ligados, fornecendo rapidez e exatidão na detecção do analito. Por estas razões, os MIP têm sido amplamente empregados na química analítica, e podem ser aplicados a uma ampla variedade de analitos, como moléculas orgânicas pequenas (como fármacos, pesticidas, aminoácidos e açúcares) e maiores como os peptídeos, sendo estes últimos ainda um grande desafio [12].

Portanto, a formação de impressões moleculares na superfície do substrato tornou-se uma solução viável aos problemas de acessibilidade e transferência de massa para moléculas grandes. Entretanto, vale ressaltar que um protocolo genérico para impressão molecular ainda não está muito bem estabelecido, requerendo adaptação aos protocolos convencionais, de acordo com o analito utilizado.

As aplicações dos MIP em química analítica são muito amplas. Alguns exemplos ocorrem em extração em fase sólida (SPE) [13,14], microextração em fase sólida [15,16], técnicas cromatográficas [17,18], eletroforese capilar [19] e eletrocromatografia capilar

[20,21]. Se o analito de interesse exibe uma propriedade especial como fluorescência ou atividade eletroquímica, pode ser explorado como sensor em MIP.

Sensores eletroquímicos modificados com MIP também foram relatados, inicialmente em 1990, conforme relatam Piletsky e Turner [22] e Blanco-López *et al.* [23], quando pesquisas descreveram a integração do polímero impresso anilida fenilalanina em um sensor de capacitância e relatou uma redução significativa na capacitância total do sistema quando o sensor foi exposto à molécula molde [24].

Tais exemplos ilustram, ainda que brevemente, a grande utilidade deste tipo de material na química analítica.

A **Figura 1** ilustra sequencialmente o processo de formação do MIP: interação entre monômero e analito juntos ao agente formador da rede polimérica; adição do agente polimerizante/formação do polímero; extração por solvente do analito TC, formando o MIP contendo as cavidades seletivas referentes à molécula molde impressa.

Figura 1 Representação esquemática do processo de formação do MIP.

1.3 Tetraciclina (TC)

As tetraciclinas representam um grupo de antibióticos amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas, tanto em medicina humana quanto veterinária, além de aplicação como aditivos alimentares para animais, como também em adubo animal, frequentemente aplicados na agricultura, podendo contaminar águas subterrâneas e superficiais.

O antibiótico tetraciclina (TC), de nome oficial, 2-(amino-hidróxi-metilideno)-4-demitilamino-6,10,11,12a-tetrahidróxi-6-metil-4,4a,5,5a-tetrahidrotetraceno-1,3,12-triona (**Figura 2**) é largamente utilizado, pois apresenta um amplo espectro de atividade frente a bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas [25].

As tetraciclinas apresentam baixa toxicidade, baixo custo e podem ser administradas por via oral. Estas características tornam este antibiótico um aliado no tratamento médico, na terapia animal e como aditivo alimentar, a fim de aumentar a eficiência no crescimento de animais. No entanto, resíduos desta droga acima do permitido tem sido encontrados em solos, água, em tecido animal e no leite, provocando sintomas alérgicos em humanos [26].

Do ponto de vista ambiental é interessante ressaltar que tetraciclinas foram encontradas por arqueólogos e antropólogos em múmias núbias após 1600 anos, provavelmente originadas de cervejas consumidas por esses indivíduos, as quais teriam sido elaboradas com grãos cultivados em solos contendo microorganismos capazes de produzir esses antibióticos. Portanto, a identificação e determinação desta substância assume importância significativa [27].

Com base nesses fatos, a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio do Programa Nacional de Análise de Resíduos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), determina como limite máximo residual (LMR) aceitável das tetraciclinas, o valor de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do produto [25]. Já o Ministério da Agricultura, pela portaria 193, de 12 de maio de 1998, proíbe o uso da tetraciclina como aditivo na alimentação animal [28].

Figura 2 Fórmula estrutural da tetraciclina.

Os limites de tolerância a este analito se situam na região de resposta dos eletrodos compósitos à base de grafite-poliuretana e sugerem a possibilidade de aplicação destes dispositivos na determinação do analito proposto, minimizando as dificuldades e custo de análise, além do preparo de amostras mais complexas, exigida por outras técnicas analíticas [2-4].

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com diferentes tipos de detecção, tais como espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) [29-33], fluorescência [22,35] ou quimioluminescência [36], tem sido usada para a determinação das tetraciclina. As amostras analisadas incluem alimentos como peixes [33], frango [34], mel [36] ou leite [32,35], bem como amostras ambientais [31] e formulações farmacêuticas [30]. A detecção eletroquímica por técnicas voltamétricas são usadas com frequência, devido às vantagens bem conhecidas, como sensibilidade, seletividade, simplicidade e quase nenhum pré-tratamento da amostra [2-4]. Técnicas eletroquímicas, como amperometria e voltametria também são métodos amplamente utilizados na determinação de tetraciclina [37-43].

Dentre os trabalhos mais relevantes encontrados em levantamento bibliográfico, com relação ao uso dos MIP na determinação de tetraciclina, se podem citar alguns exemplos descritos a seguir.

Xie e colaboradores [44] desenvolveram um sensor eletroquímico para determinação de tetraciclina com resultados satisfatórios em determinações amperométricas quanto à seletividade e sensibilidade alcançadas e limite de detecção mínimo de 0,026 mg L⁻¹ para os MIP.

Guorun e colaboradores [45] discutiram uma nova estratégia na preparação dos MIP usando íons metálicos como complexante ternário (monômero, analito, íon metálico) em sistemas aquosos para evitar a interferência da água na determinação de antibióticos da família das tetraciclinas em amostras de urina.

Jing e colaboradores [46] propuseram um modelo de reconhecimento de antibióticos usando amostras mistas de dois tipos de tetraciclinas (clortetraciclina e oxitetraciclina), que exibiu alta seletividade. Além disso, os resultados sugeriram que os modelos mistos apresentaram maior sensibilidade e afinidade para os grupos das tetraciclinas do que os MIP de modelos simples para determinação em amostras alimentares por MISPE-HPLC-UV.

Wong e colaboradores apresentaram um sensor modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e óxido de grafeno, para determinação voltamétrica de TC em amostras farmacêuticas, águas de rios e urina artificial, com limites de detecção (LOD) de $3,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $3,68 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,68 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, usando DPAdASV [47].

Kushiwara e colaboradores construíram uma plataforma para detecção eletroquímica usando nanopartículas de platina suportados em carbono para determinação voltamétrica de TC, obtendo LOD de $4,28 \mu\text{mol L}^{-1}$, usando DPV [48].

Já Filik e colaboradores usaram um eletrodo impresso de carbono modificado com grafeno de alto desempenho para determinar TC em amostras de leite e mel, usando DPV e obtendo LOD de $0,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ [49].

Yakoult e El-Hady [50] combinaram um sensor baseado em beta-ciclodextrina com nanopartículas de óxido de grafeno magnético funcionalizado com beta-ciclodextrina para determinação voltamétrica sensível e seletiva de tetraciclina e doxiciclina em amostras de leite, usando DPV e obtendo LOD de $0,18 \text{ ng L}^{-1}$ para ambos antibióticos.

Dos trabalhos publicados pelo grupo LATEQS, Calixto e colaboradores [2-4] estudaram as propriedades voltamétricas dos EGPU na determinação quantitativa de antibióticos da família das tetraciclinas em amostras de águas ambientais, obtendo limites de detecção de $2,80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Cervini *et. al.* desenvolveram um EGPU modificado com polímero com impressão molecular para o analito paracetamol, a fim de avaliar sensível e seletivamente a determinação voltamétrica deste fármaco, atingindo limites de detecção da ordem de $6,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para este sensor [51]. Já Pereira, Cervini e Cavalheiro [52] sintetizaram um polímero com impressão molecular usando o ácido fólico para modificar

eletrodos compósitos GPU com o propósito de investigar sua sensibilidade e seletividade na determinação voltamétrica deste analito obtendo limites de detecção de 0,17 e 0,034 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para dois picos catódicos, em $-0,52\text{ V}$ e $-0,58\text{ V}$ (vs. SCE), respectivamente.

Portanto estes trabalhos mostram a grande versatilidade dos eletrodos que vem sendo desenvolvidos, sendo a presente dissertação uma contribuição ao desenvolvimento deste material de eletrodo, nesta oportunidade modificado com MIP para avaliar a sua sensibilidade, como sua seletividade, na determinação da tetraciclina.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver eletrodos à base de grafite e poliuretana de origem vegetal, modificados com polímeros com impressão molecular (MIP) para a determinação de antibióticos da classe das tetraciclinas, os quais representam grande interesse biológico, farmacológico e ambiental, visando explorar a seletividade dos dispositivos, durante a determinação deste analito em amostras complexas farmacêuticas e fluidos biológicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato-galvanostato $\mu\text{AUTOLAB TYPE III}$ (Ecochemie), acoplado a um microcomputador e controlado pelo software GPES 4.9 (Ecochemie). Todas as medidas foram realizadas em uma célula de vidro com capacidade total de 25 mL e um arranjo de três eletrodos: O eletrodo de trabalho EGPU, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar.

3.2 Eletrodos

Um eletrodo de calomelano saturado com KCl (SCE) foi utilizado como referência e uma placa de platina de área 1,0 cm^2 como eletrodo auxiliar.

Os eletrodos de trabalho foram confeccionados e utilizados durante os testes. Um eletrodo compósito de grafite-poliuretana modificado com polímero com impressão molecular

para TC (MIP-TC) e outro modificado com polímero sem impressão molecular (NIP). Para comparação, foi utilizado um EGPU sem modificador.

3.3 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes da síntese do MIP-TC e NIP utilizados neste trabalho foram de grau analítico (P.A.). As soluções foram preparadas com água ultra pura em um sistema Barnstead™ EasyPure® RoDI (Thermoscientific, modelo D13321), resistividade maior que $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. As massas de TC (95 %, *m/m*), OTC (95 %, *m/m*) e CTC (77 %, *m/m*), de marca Sigma-Aldrich, foram preparadas diariamente sendo dissolvidas em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 2,5. Todas as tetraciclinas utilizadas neste trabalho estavam na forma dos seus cloridratos, conforme são comercializados. Por simplificação e, em conformidade com a literatura corrente, elas serão tratadas apenas por tetraciclinas ao longo desse texto.

3.4 Cálculos químico quânticos

Todos os cálculos foram realizados com o programa G09 [53] em colaboração com o grupo de química teórica do IQSC/USP. Na tarefa de estabelecer a conformação mais estável da tetraciclina, a metodologia de Othersen *et al.* [54] foi aplicada. Com este propósito, 21 conformações da tetraciclina foram analisadas com o uso de métodos semiempíricos. É importante comentar que os métodos semiempíricos negligenciam uma série de integrais para a diminuição do tempo computacional nas simulações, e para não haver uma perda de eficiência nos resultados são empregados uma série de parâmetros empíricos ou previamente calculados. Os métodos semiempíricos utilizados nesta tarefa foram o PM3 (*Parameterized Model Number 3*) [55] e o PM6 (*Parameterized Model Number 6*) [56]. Com base nos resultados destes dois métodos (ver Anexo B, Tabela B1 e Figura B1), foi realizada uma seleção de 6 conformações para subsequente análise com os métodos baseados na Teoria da Densidade do Funcional (DFT) (ver Anexo B, Figura B2). Nesta etapa, a função de base 6-31G(d) foi aplicada em conjunto com o funcional wB97XD [55], devido à sua precisão na análise de diferentes sistemas [57-60]. O método IEF-PCM [61] foi executado para o efeito do solvente metanol. Para a seleção das estruturas dos complexos formados entre a tetraciclina e os monômeros, foi aplicado o método Monte Carlo Metrópolis implementado no programa

DICE [62]. Por outro lado, o cálculo da energia de interação nos complexos tetraciclina-(monômeros)₇ foi realizado de acordo com a Equação 1:

$$\Delta E = E[\text{tetraciclina}-(\text{monômeros})_7] - \{E(\text{tetraciclina}) + 7 \times [E(\text{monômero})]\} \quad (1)$$

Em que “E(tetraciclina)” e “E(monômero)” representam as energias eletrônicas da tetraciclina e dos monômeros, respectivamente. “E[tetraciclina-(monômeros)₇]” refere-se à energia eletrônica do complexo e o número subscrito 7 ao número de monômeros utilizados para formação dos complexos. Todos estes valores foram obtidos com o método wB97XD/6-31G(d).

3.5 Síntese dos polímeros com impressão molecular para a TC (MIP-TC) e sem impressão molecular (NIP)

A síntese dos polímeros com e sem impressão molecular, foi feita com base em trabalhos previamente descritos na literatura [44,63-67]. Para tanto utilizou-se o método convencional de polimerização em batelada, preparando-se simultaneamente o MIP-TC e o NIP, em ampolas de vidro separadas, mas adicionando-se a molécula molde, nesse caso, a tetraciclina apenas no primeiro sistema reacional.

Foram preparados MIP em duas proporções de monômero e TC, sendo essas proporções definidas com base na literatura, a saber, 10,8:1 [44] e 4:1 [66,67] (*mol/mol*). Os procedimentos de síntese são iguais para ambos os casos, exceto pelas proporções dos reagentes, conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1 Quantidades molares dos reagentes utilizados na síntese dos sistemas MIP-TC e NIP

Sistema	Reagentes (mmol)				MeOH (mL)
	MAA	EGDMA	AIBN	TC	
MIP-TC 10,8:1	2,7	12,8	0,43	0,25	5,0
MIP-TC 4:1	2,7	12,8	0,43	0,68	5,0
NIP	2,7	12,8	0,43	0	5,0

O procedimento de síntese foi realizado utilizando-se duas ampolas, uma para o MIP e outra para o NIP. A quantidade desejada de TC foi adicionada apenas às ampolas nas quais os MIP foram preparados. Em seguida, tanto nas ampolas usadas para preparação dos MIP, quanto dos NIP foi adicionada a quantidade requerida do agente reacional de entrecruzamento (EGDMA), juntamente o número de mols do monômero ácido metacrílico (MAA), a ser usado em cada caso. No total foram usados 5,0 mL de metanol (CH_3OH), como solvente para dissolução da mistura, sendo 4,0 mL adicionados após a adição do monômero. Os sistemas reacionais de MIP e NIP foram submetidos a ultrassom, por 1 minuto visando solubilizar os reagentes no solvente. Após esse procedimento foi adicionada a quantidade prevista do iniciador radicalar AIBN em cada ampola. Finalmente, adicionou-se 1,0 mL restante do CH_3OH , tomando-se o cuidado de lavar as paredes das ampolas e submeteu-se cada sistema ao ultrassom por mais 1 minuto, visando garantir a solubilização total das misturas.

A fim de se evitar reações de oxidação paralelas que pudessem interferir no processo de polimerização, as ampolas foram seladas com septo de borracha e purgou-se nitrogênio por 5 a 10 minutos no intuito de eliminar o oxigênio ambiente, com auxílio de uma agulha hipodérmica. As ampolas contendo os sistemas reacionais de MIP e NIP foram dispostas no interior de um banho ultratermostatizado MA-184 a 60° C, por 24 horas para o processo de polimerização. Após o fim da síntese, o MIP e NIP foram retirados quebrando-se as ampolas, na forma de peças únicas de polímero, as quais foram maceradas cuidadosamente com auxílio de almofariz e pistilo de vidro. Após a síntese do MIP, a TC foi extraída por 18 horas utilizando um extrator do tipo Soxhlet, usando como solvente 70 mL de uma mistura metanol/ácido acético 9:1 (v/v). Entretanto, houve a necessidade de mudança do par solvente usado para metanol/água 1:1 (v/v), devido à demora na extração pelo par utilizado inicialmente, sendo o segundo par usado em todas as extrações posteriores. Os polímeros foram filtrados, secos em estufa a 60° C por 2 horas e tamisados em peneiras para separação em diferentes granulometrias (menores que 150 μm , na faixa de 150 a 250 μm e maiores 300 μm).

3.6 Confeção dos eletrodos compósitos de grafite-poliuretana modificados (EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP) e sem modificação (EGPU)

A resina poliuretana (Poliquil) foi preparada misturando-se 0,8 parte do polioli (B-471) e 1,0 parte do pré-polímero (A-249), conforme recomendação do fabricante. A seguir, uma quantidade de grafite em pó (Aldrich, diâmetro de partícula $\leq 20 \mu\text{m}$) e do MIP foi adicionada

para obter eletrodos compósitos contendo 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (*m/m*) de modificador. Foram então confeccionados EGPU-MIP-TC em diferentes porcentagens do modificador, nas três faixas granulométricas (menores que 150 μm , entre 150 e 250 μm e maiores que 300 μm), para comparação do desempenho durante as medidas voltamétricas.

A **Tabela 2** apresenta as quantidades utilizadas de cada componente na confecção dos eletrodos. Esta mistura foi homogeneizada por cerca de 5 minutos em um almofariz de vidro, prensada em prensa manual e extrusada com extrusor de 3 mm de diâmetro. A forma de misturar o modificador ao compósito também foi avaliada. Em uma primeira preparação dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP, o pó de grafite, a poliuretana e o modificador foram macerados utilizando almofariz e pistilo, enquanto que na segunda preparação, essa mistura foi dispersa em solvente clorofórmio. Os mesmos procedimentos foram adotados para o eletrodo compósito contendo o polímero sem a impressão molecular (EGPU-NIP), que foi novamente confeccionado na mesma composição e alterado apenas na forma de misturar o modificador ao compósito com uso de solvente. O eletrodo sem adição de modificador (EGPU) foi sempre o mesmo, pois não continha modificador em sua composição e foi obtido por maceração, seguida de prensagem e extrusão.

Tabela 2 Quantidades em massa utilizadas na confecção dos eletrodos

Eletrodo Modificado (%)	MIP/NIP (g)	Grafite (g)	Pré-polímero (g)	Poliol (g)
2,5	0,050	1,175	0,431	0,344
5,0	0,100	1,150	0,417	0,331
7,5	0,150	1,125	0,403	0,322
10,0	0,200	1,100	0,389	0,311

Após a cura total da resina, que ocorre em 24 horas à temperatura ambiente, de acordo com o fabricante, os tarugos foram cortados em peças com cerca de 1,0 cm de comprimento. A seguir, foram conectados a um fio de cobre com auxílio de epóxico de prata (Two Part Conductive Silver Paint, Electron Microscopy Sciences).

Após 48 horas, o conjunto compósito/fio de cobre foi inserido em um tubo de vidro de 6 mm de diâmetro e 9 cm de comprimento. Então, uma resina epóxi (Silaex SQ 3024) foi adicionada ao tubo de vidro com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para preenchimento. O processo completo de cura durou 24 horas e é ilustrado pelo esquema apresentado na **Figura 3**.

Figura 3 Representação esquemática da confecção (a) e imagem real (b) dos EGPU.

3.7 Tratamento mecânico

O tratamento mecânico consistiu de abrasão em lixa d'água 600 em uma lixadeira politriz motorizada, modelo Aropol 2V (Arotec), para eliminar o excesso de resina epóxi na superfície e expor o compósito dos EGPU-MIP-TC e NIP. Tal procedimento foi realizado utilizando água destilada para retirada de possíveis partículas na superfície do eletrodo, antes de cada medida.

3.8 Caracterização dos MIP-TC, NIP, EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP

3.8.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os eletrodos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP e os polímeros com e sem impressão molecular, MIP-TC e NIP, respectivamente, foram caracterizados morfolologicamente quanto aos grãos menores que 150 μm , entre 150 e 250 μm e maiores que 300 μm , para os quais foram obtidas micrografias utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na Central

de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP). As micrografias foram obtidas em um microscópio ZEISS LEO 440 (Cambridge, England), com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram recobertas com 6 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise.

3.8.2 Adsorção/dessorção de N₂ pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET)

A determinação da área superficial do material polimérico foi feita a partir da adsorção/dessorção física de gás inerte (nitrogênio) em um equipamento Micromeritics ASAP 2020 V3, pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET).

3.9 Estudos voltamétricos utilizando os EGPU-MIP-TC

A melhor composição de eletrodo utilizando 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % (*m/m*) de MIP-TC no compósito foi determinada em CV e DPAdASV, sob condições previamente otimizadas. Curvas analíticas foram ajustadas e otimizadas utilizando o EGPU com 5,0 % (*m/m*) de MIP (EGPU-MIP-TC), o eletrodo compósito GPU modificado com 5,0 % (*m/m*) de NIP (EGPU-5,0NIP) e o eletrodo EGPU não modificado, para comparação, usando velocidade de varredura $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso $a = 50 \text{ mV}$, variando a concentração de TC de 0,1 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando como eletrólito suporte, solução tampão fosfato com pH = 2,5.

3.10 Determinação da área ativa dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP

As áreas ativas dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP foram determinadas por cronocoulometria [68]. Determinações cronocoulométricas foram realizadas utilizando solução 5,0 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] em KCl 0,5 mol L⁻¹ ($D_0 = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) com pH ajustado para 3,0, no intervalo de potencial entre - 0,250 a 0,750 V (vs. SCE). As densidades de corrente foram determinadas pelas medidas das correntes de pico, obtidas por voltametria cíclica em solução de K₃[Fe(CN)₆], divididas pela área ativa obtida para cada eletrodo.

3.11 Estudo da repetibilidade dos EGPU-MIP-TC

Para testar a repetibilidade na resposta voltamétrica dos EGPU-MIP, foram realizadas medidas de CV em solução de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 10 vezes para cada granulometria, menores que $150 \text{ }\mu\text{m}$, entre 150 e $250 \text{ }\mu\text{m}$ e maiores que $300 \text{ }\mu\text{m}$, no intuito de observar se os eletrodos responderiam de modo constante em várias medidas sucessivas. Os valores de corrente observados foram calculados e tabelados para a média aritmética e desvio padrão obtidos com as medidas voltamétricas.

3.12 Curvas analíticas dos EGPU-MIP-TC, EGPU-NIP e EGPU para a TC em DPAdASV

Para determinar a região linear de resposta dos EGPU, foram obtidos voltamogramas adsorptivos de redissolução anódica por pulso diferencial, sem renovação de superfície dos eletrodos entre as medidas, em diferentes concentrações de TC nos EGPU-MIP-TC, EGPU e EGPU-NIP, com o intuito de avaliar a sensibilidade da resposta dos eletrodos a partir da inclinação das curvas analíticas, além do efeito da presença do polímero contendo as cavidades da tetraciclina no EGPU-MIP-TC.

Os EGPU foram testados, nas condições pré-otimizadas, em uma faixa de concentração de $0,1$ a $100,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para determinar a faixa de trabalho de cada um dos eletrodos. As medidas foram realizadas em triplicata. Para a obtenção da região linear dos EGPU, foram usados os valores médios de corrente de pico anódico extraídos com os respectivos desvios padrão das medidas.

3.13 Determinação da TC em formulações farmacêuticas comerciais usando EGPU-MIP-TC

O EGPU-MIP-TC foi utilizado na determinação do antibiótico TC em duas formulações farmacêuticas. A concentração do analito presente nas amostras analisadas foi determinada pelo método de adição de padrão.

Conforme a Farmacopeia Brasileira [69], foram triturados conteúdos de vinte cápsulas de cada amostra farmacêutica de cloridrato de tetraciclina 500 mg dos fármacos Tetramed® do fabricante MedBrasil e um medicamento genérico de fabricação da empresa Prati-Donaduzzi, homogeneizando as massas obtidas. Prepararam estoques das amostras e do padrão de TC, dissolvendo as respectivas massas de cada fármaco para obter 5,0 mmol da TC. Em 20,0 mL do tampão fosfato pH 2,5 foram adicionados 40,0 µL das amostras, afim de se obter soluções correspondentes a 10 µmol L⁻¹ TC. Em seguida, as 3 adições do padrão de TC foram adicionadas à célula eletroquímica de modo a se obter, nesta ordem, 10, 15 e 20 µmol L⁻¹. Foram realizadas medidas de DPAdASV em triplicata para cada adição e os valores de corrente de pico anódica foram observados em sua média entre as medidas.

3.14 Determinação da TC em amostra de urina sintética usando o EGPU-MIP-TC

A urina sintética foi preparada em água ultra pura de um sistema Barnstead EasyRoDI com resistividade igual a 18 MΩ cm⁻¹ utilizando os reagentes listados na **Tabela 3**.

Tabela 3 Composição química da urina sintética [70]

Composto	Concentração (mmol L ⁻¹)
NaCl	51,3
Na ₂ SO ₄	14,1
KH ₂ PO ₄	7,35
KCl	26,8
NH ₄ Cl	18,7
Uréia	416,3

De maneira análoga à utilizada na determinação dos fármacos, prepararam-se estoques da urina contaminada com a TC e do padrão de TC, dissolvendo as respectivas massas correspondentes a 5,0 mmol da TC em 25,00 mL da urina sintética para a amostra contaminada e 5,0 mmol da TC em 25,00 mL do tampão fosfato pH 2,5, para o padrão da TC, afim de se obter soluções correspondentes a 50 µmol L⁻¹ de TC. Em seguida, as adições de

amostra de urina sintética contendo TC e padrão foram feitas na célula eletroquímica de modo a se obter, respectivamente, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e adições de 10, 15 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foram realizadas medidas de DPAdASV em triplicata para cada adição e os valores de corrente de pico anódica foram observados em sua média entre as medidas.

3.15 Estudo de seletividade dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP – Teste de interferência

Um estudo de interferência foi realizado utilizando como interferentes em potencial os antibióticos clortetraciclina e oxitetraciclina, cujas estruturas são muito semelhantes à da TC, para verificar a seletividade do EGPU-MIP-TC. Foram obtidos voltamogramas em DPAdASV para soluções contendo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em tampão fosfato pH 2,5, na presença de 10, 20 e $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada interferente. O EGPU-NIP foi usado para comparação.

4 ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE O EFEITO DE PARÂMETROS INSTRUMENTAIS NA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DA TC NO EGPU-MIP-TC

4.1 Voltametria cíclica (CV)

Inicialmente, a resposta eletroquímica da TC no eletrodo compósito à base de grafite e resina poliuretana, 60 % (pó de grafite, *m/m*), foi investigada usando voltametria cíclica, para verificar a efetividade na resposta eletroquímica dos EGPU. Para medidas quantitativas, optou-se pela voltametria de pulso diferencial (DPV) a fim de se obter respostas com maior sensibilidade para o método analítico a ser desenvolvido.

4.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV) e adsortiva de redissolução anódica (DPAdASV)

Os parâmetros experimentais usados na voltametria de pulso diferencial (DPV) e na voltametria adsortiva de redissolução anódica por pulso diferencial (DPAdASV) necessitaram ser previamente otimizados, a fim de se explorar os melhores sinais analíticos e perfis eletroquímicos do método analítico para os EGPU. A metodologia utilizada foi a combinação entre todos os parâmetros instrumentais, mantendo um parâmetro fixo e variando os demais, determinando as melhores condições experimentais de cada parâmetro, isoladamente. Nesta combinação dos parâmetros, os fatores de interesse foram o potencial e tempo de pré-acumulação, a amplitude de pulso (*a*) e a velocidade de varredura (*v*).

4.2.1 Otimização do potencial de acumulação

Para determinar o melhor potencial de acumulação do analito na superfície dos EGPU, fixou-se um tempo de 60 segundos de pré-concentração da TC na superfície do eletrodo e variou-se o valor mínimo do potencial de acumulação, utilizando-se intervalos de potenciais iniciando entre 0,2 a 0,7 V (vs. SCE) e mantendo o final em 1,2 V para obter as melhores magnitudes dos sinais, observando a intensidade das correntes, como também os perfis voltamétricos da voltametria adsortiva de redissolução anódica.

4.2.2 Otimização do tempo de acumulação

Após definição do melhor potencial de pré-concentração, manteve-se constante o intervalo de potencial otimizado e variou-se o tempo de acumulação de 60 em 60 segundos, (na faixa de 60 a 420 segundos), com e sem renovação de superfície antes de cada medida, a fim de se otimizar também o tempo de pré-concentração, no qual o analito melhor respondesse em valores de corrente e perfil dos voltamogramas.

4.2.3 Otimização da amplitude de pulso (a) e velocidade de varredura (v)

Para a otimização da amplitude de pulso (a) e da velocidade de varredura de potencial (v), foi utilizado um planejamento fatorial, no qual foram previamente estabelecidos valores de $a = 5$ e 10 mV s^{-1} e $v = 25$ e 50 mV , totalizando-se uma combinação de quatro experimentos que permitissem avaliar o efeito conjunto dos parâmetros, com o objetivo de extrair o par (a):(v) que proporcionasse eletroquimicamente os melhores sinais analíticos para o analito de estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Simulação computacional

Uma análise teórica envolvendo as interações entre a molécula-alvo e os monômeros pode ser um aspecto importante para entender de forma mais aprofundada a natureza das ligações intermoleculares na formação do MIP, sendo possível interpretar a força das interações em um determinado modelo. Desta forma, sete diferentes monômeros foram estudados na formação dos complexos tetraciclina-(monômeros)₇: o ácido acrílico (**1**), o ácido metacrílico (**2**), a 2-vinil-piridina (**3**), a 4-vinil-piridina (**4**), o 1-vinil-imidazol (**5**), o 4-vinil-imidazol (**6**), e a acrilamida (**7**). A ideia da construção dos modelos tetraciclina-(monômeros)₇ foi voltada para explorar o grande número de grupos funcionais e o fato de existir uma grande deslocalização de cargas entre os grupos funcionais da tetraciclina (ver **Figura 4**), portanto estes modelos funcionam como um caminho alternativo para entender a força da interação evitando a enorme busca dos sítios mais fortes para cada monômero. Na **Figura 4**, as regiões em azul representam a concentração de cargas positivas, enquanto que as regiões em vermelho indicam a localização das cargas negativas.

Figura 4 Mapa do potencial eletrostático da molécula de tetraciclina.

A **Figura 5** apresenta a estrutura otimizada de cada um dos sete complexos analisados neste estudo, enquanto a **Tabela 4** mostra o valor da energia de interação para a formação destas estruturas. A interpretação do valor de ΔE é feita analisando a quantidade de energia necessária para produzir o complexo tetraciclina-(monômero)₇ em que quanto menor o valor de ΔE , maior é a força das interações intermoleculares e, portanto, maior é a estabilidade da

estrutura formada. Com base nos valores da Tabela 4 a ordem de estabilidade é a seguinte: $6 > 5 \approx 1 \approx 2 \approx 7 > 4 \approx 3$. No entanto, estas proximidades nas energias de interação são bastante similares aos valores estimados por Marestoni *et al.* [71], que avaliou a energia de interação entre a ciprofloxacina e diferentes monômeros com o uso de métodos semiempíricos. Um aspecto interessante entre estes sete complexos é a carga da tetraciclina na formação de complexos, a qual apenas nos sistemas com o ácido acrílico (**1**) e o ácido metacrílico (**2**) é que foi observado uma carga positiva para o fármaco. Esta carga positiva reflete a transferência de carga entre a tetraciclina e os monômeros, sendo estimada uma transferência de carga tetraciclina→monômeros duas vezes maior do que na transferência monômeros→tetraciclina. No caso da acrilamida (**7**) a relação entre os dois processos de transferência de carga foi idêntica, ao passo que nos demais complexos os processos de transferência de carga monômeros→tetraciclina foram três ou quatro vezes maiores que na transferência tetraciclina→monômeros. Estas diferenças na transferência de carga são um reflexo do caráter ácido/base dos monômeros. Embora o ácido acrílico (**1**) e o ácido metacrílico (**2**) apresentem resultados similares na transferência de carga, além de valores semelhantes para as energias de interação, o ácido metacrílico foi escolhido para as sínteses devido ao seu sucesso no desenvolvimento de MIP para a tetraciclina [66,67].

Figura 5 Estruturas otimizadas dos complexos tetraciclina-(monômeros)₇ utilizando o método wB97XD/6-31G(d).

Tabela 4 Energia de dissociação (ΔE / kcal mol⁻¹) dos complexos tetraciclina-(monômero)₇

Monômero	Complexo	ΔE / kcal mol ⁻¹
ácido acrílico	1	-97.2
ácido metacrílico	2	-96.2
2-vinil-piridina	3	-74.7
4-vinil-piridina	4	-76.3
1-vinil-imidazol	5	-100.1
4-vinil-imidazol	6	-110.5
Acrilamida	7	-94.8

5.2 Síntese dos polímeros com impressão molecular para a TC (MIP-TC) e sem impressão molecular (NIP) e confecção dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP

A síntese do MIP-TC e NIP foi feita com base na copolimerização do monômero funcional MAA e do agente reacional de ligação inter cruzada, EGDMA. Na síntese do MIP-TC, estes reagentes interagem com as moléculas da TC, antes da polimerização. Depois da remoção das moléculas do analito no polímero, sítios de ligação são gerados na forma de cavidades. No caso do NIP, não há estas cavidades, pois não há adição da TC na preparação do polímero. O MIP-TC macerado apresentou coloração com leve contraste entre branco e amarelo, o que é característico de resquícios do analito, enquanto o NIP apresentou coloração branca. O processo de extração foi acompanhado retirando-se alíquotas de 3 mL do solvente extrator (MeOH/H₂O) e medindo-se a absorbância em 360 nm em um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800, conforme **Figura 6**.

Os grãos foram separados em três faixas granulométricas, (a) menores que 150 μm , (b) entre 150 e 250 μm e (c) maiores que 300 μm , antes da mistura ao compósito, no entanto, as micrografias mostraram grãos menores nos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP, entre 10 e 120 μm , provavelmente devido à maceração durante a mistura do compósito (grafite, PU, modificador), que diminuiu o tamanho médio das partículas dos polímeros MIP e NIP nos EGPU.

Figura 6 Acompanhamento por UV absorbância x comprimento de onda (a) e absorbância x tempo (b), da extração da TC no MIP-TC em 360 nm, de 6 em 6 horas, durante 42 horas.

A razão monômero/analito usada na primeira síntese foi de cerca de 10,8:1, porém esta relação apresentou resultados analíticos insatisfatórios em relação à repetibilidade das respostas voltamétricas. Então, foi feita uma nova síntese do MIP-TC contendo uma razão (monômero/analito) menor. As percentagens em massa dos demais reagentes foram mantidas.

Neste ponto é importante lembrar que uma maior porcentagem do analito TC indicaria uma maior quantidade de impressões em toda extensão do polímero, aumentando tanto a quantidade de cavidades dispersas da tetraciclina assim como um aumento na homogeneidade da matriz polimérica, o que resultaria no aumento da repetibilidade da resposta tornando-a mais seletiva. Na nova síntese com a razão 4:1, foram mantidas as mesmas condições da anterior.

5.3 Caracterização dos polímeros com (MIP-TC) e sem impressão molecular (NIP)

Para a caracterização dos MIP-TC e NIP foram utilizadas a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para visualizar e avaliar a morfologia dos polímeros com e sem impressão molecular e o método de Braumer-Emmett-Teller (BET), para calcular a área superficial e comparar a porosidade desses polímeros com e sem as cavidades do analito.

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Pelos estudos voltamétricos com os parâmetros pré-estabelecidos anteriormente, definiu-se dentre as três faixas granulométricas do polímero no compósito, a granulometria de 150 a 250 μm como a faixa com melhores respostas nos sinais analíticos e, portanto, o tamanho dos grãos para seguir com os testes. As imagens de MEV de ambas as amostras, MIP-TC e NIP com partículas de 150 a 250 μm , são apresentadas na **Figura 7**. As imagens *a* e *c* mostram grãos do MIP-TC regulares e com certa rugosidade superficial, enquanto os grãos do NIP, *b* e *d*, se mostram também regulares em forma e tamanho, porém com maior rugosidade. As imagens mais ampliadas confirmam em *e* que o MIP-TC tem maior porosidade, provavelmente devido à remoção do analito, enquanto o NIP em *f*, demonstrou ser menos poroso, porém mais rugoso.

Figura 7 Imagens de MEV do MIP-TC (*a, c, e*) e do NIP (*b, d, f*) com magnificações de 70 x, 1000 x e 5000 x, respectivamente.

Após incorporação no compósito, formando o EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP, lixados em lixa d'água 600 grit e polidos em alumina com partícula de 1 μm e em seguida lavados com isopropanol em ultra-som. O material resultante foi caracterizado por MEV e as imagens dos EGPU modificados com grãos de 150 a 250 μm são apresentadas na **Figura 8**.

Partículas do MIP e NIP foram observadas na superfície dos EGPU. Imagens ampliadas mostram como as partículas estão incrustadas no material compósito, bem como confirmam a diminuição no tamanho das partículas do MIP-TC e NIP, quando se compara ao tamanho original das partículas, o que foi atribuído à maceração durante o preparo do compósito (grafite, PU, modificador). Isso resulta em um material praticamente imerso na

matriz do compósito, com pouca área exposta e, portanto, pouca ação. No entanto, estas partículas podem ser maiores que o observado nas imagens, uma vez que, não se observa de forma tridimensional a disposição das partículas MIP-TC e NIP nos EGPU.

Figura 8 Imagens de MEV do EGPU-MIP-TC (a, c) e do EGPU-NIP (b, d) com magnificações de 200 x e 7000 x para o EGPU-MIP-TC e 200 x e 2500 x para o EGPU-NIP.

Assim decidiu-se por preparar os compósitos em uma forma diferente de misturar o pó de grafite, a PU e o modificador para evitar a maceração, no intuito de manter o tamanho médio das partículas dos polímeros nos EGPU, dessa forma, o solvente clorofórmio (CHCl_3) foi aplicado na mistura dos compósitos (MIP-TC e NIP) tornando a mistura do compósito mais branda. Após a homogeneização, o CHCl_3 foi extraído por evaporação. Em resumo, o MIP-TC e NIP apresentaram ao final as mesmas características físicas anteriores.

Os novos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP confeccionados em solvente usando o MIP-TC e NIP da nova síntese, usando grãos entre 150 e 250 μm , também foram caracterizados utilizando MEV e as imagens de ambos, partículas e compósito, são mostradas na **Figura 9**.

Figura 9 Imagens de MEV das partículas de MIP-TC (*a, b*) com magnificações de 70 x e 1000 x e dos compósitos EGPU-MIP-TC (*c, d*) e EGPU-NIP (*e, f*) com magnificações de 200 x e 1500 x, respectivamente.

As imagens *a* e *c* mostram grãos da nova síntese do MIP-TC e a superfície do compósito do novo EGPU-MIP-TC, respectivamente. Em *a* os grãos se mostram regulares e com certa rugosidade superficial. Em *c* é possível notar cavidades do polímero expostas na superfície do EGPU. A imagem *b*, mais ampliada, confirma a maior rugosidade e porosidade do MIP-TC espaçado, provavelmente devido à remoção do analito, enquanto que a partir da ampliação do EGPU-MIP-TC em *d*, confirma-se a inserção do polímero no corpo do

compósito, onde estão as cavidades da tetraciclina. A superfície do novo EGPU-NIP em *e* e *f* também mostram o polímero sem impressão molecular efetivamente incorporado ao material compósito.

As partículas do MIP-TC e NIP foram identificadas mais claramente e com os tamanhos esperados, em média 150-200 μm , na superfície dos EGPU, usando a preparação do compósito com solvente. Imagens ampliadas mostram mais nitidamente a rede polimérica incrustada no material compósito. As novas imagens confirmam que o uso do solvente para uma mistura mais branda entre grafite, PU e modificador, foi eficiente para que o polímero permanecesse no seu tamanho original após a mistura ao compósito e as partículas mais expostas, com maior área aparente e, portanto, mais disponíveis para a ação desejada dos MIP.

5.3.2 Adsorção/dessorção de N_2 pelo método Braumer-Emmett-Teller (BET)

Pelos resultados da análise de BET foi possível calcular uma área superficial de 99,07 e de 1,67 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ para o MIP-TC e o NIP, respectivamente. Pode-se afirmar que o significativo aumento na área do MIP (se comparado ao NIP) se deve às diferenças morfológicas provocadas pela impressão da molécula-molde no polímero, o que corrobora com as micrografias das **Figuras 7 e 9**. Em outras palavras, os resultados por BET ressaltam que o MIP-TC deve ter uma área superficial maior por apresentar uma morfologia mais irregular e porosa, quando comparado ao NIP.

5.4 Avaliação da resposta dos eletrodos EGPU com diferentes quantidades de MIP-TC

O comportamento voltamétrico dos eletrodos não modificado e modificados com diferentes percentagens do MIP-TC foi inicialmente avaliado em voltametria cíclica usando como sonda eletroquímica ferricianeto de potássio 5,0 mmol L^{-1} em KCl 0,5 mol L^{-1} com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ para identificar a melhor composição dos eletrodos, preparados com os MIP 10,8:1 (monômero/TC, *mol/mol*).

Os voltamogramas cíclicos obtidos são apresentados na **Figura 10**.

Figura 10 Voltamogramas cíclicos para o ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹, com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando o EGPU não modificado e os EGPU modificados com 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % de MIP-TC.

A partir dos voltamogramas cíclicos da **Figura 10**, pode-se observar uma pequena diferença no maior valor de corrente para o EGPU 0%, sem modificador. Entre os eletrodos modificados, os EGPU 2,5; 5,0 e 7,5 % apresentaram resposta voltamétrica semelhante e o EGPU 10 % os menores valores do sinal de corrente. Isto mostra que os MIP reduzem a área ativa do eletrodo, ocupando espaço da fase condutora, devido à sua natureza isolante. Estes resultados revelaram que todos os eletrodos apresentam perfis voltamétricos condizentes com o ferricianeto, usado como sonda eletroquímica.

5.5 Determinação de área ativa dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP

As áreas ativas dos EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP foram determinadas utilizando-se cronocoulometria. Inicialmente, determinaram-se as áreas ativas e densidades de corrente dos EGPU-MIP-TC para todos os eletrodos com as diferentes porcentagens do modificador (MIP

10,8:1), preparados por maceração usando como sonda eletroquímica solução de ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹.

Em seguida, foram determinadas as áreas dos eletrodos nas diferentes granulometrias, porém na percentagem que apresentou os melhores resultados em termos de área ativa e densidade de corrente no experimento anterior. Esses eletrodos também foram preparados por maceração.

Para efeito comparativo, as áreas ativas e densidades de corrente dos EGPU-NIP também foram determinadas em todas as granulometrias.

Para os cálculos, foi utilizada a Equação de Cottrell na forma integrada (Eq. 2) [68]:

$$q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}} \frac{1}{t^{1/2}} \quad (2)$$

de acordo com essa equação, os gráficos de q em função de $t^{1/2}$ são retas com coeficiente angular que se relaciona com a área do eletrodo pela Equação de Cottrell, segundo a qual, a área do eletrodo é diretamente proporcional ao coeficiente angular da reta (Eq. 3).

$$A = \frac{(CA)\pi^{1/2}}{2nF D_0^{1/2} C_0} \quad (3)$$

Sendo:

q – carga determinada (C)

A – área ativa (cm²)

F – constante de Faraday (96487 C mol⁻¹)

C – concentração do reagente na solução (mmol L⁻¹)

D – coeficiente de difusão (7,6·10⁻⁶ cm² s⁻¹) para o ferricianeto de potássio

n – número de elétrons

CA – coeficiente angular

t – tempo

Os resultados obtidos para as áreas efetivas dos eletrodos nas diferentes composições e granulometrias estão apresentados nas **Tabelas 5 e 6**, respectivamente.

Tabela 5 Valores de área ativa e densidade de corrente determinados por cronocoulometria usando ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ para o EGPU sem o

modificador e EGPU-MIP-TC contendo 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % do MIP (10,8:1), preparados por maceração, na granulometria < 150 μm

EGPU	Área ativa* / cm^2	Corrente de pico / 10^{-5}A	Densidade de corrente / 10^{-4}Acm^{-2}
EGPU- 0%	0,11	4,00	3,7
EGPU-MIP 2,5%	0,095	3,59	3,8
EGPU-MIP 5 %	0,100	3,76	3,8
EGPU-MIP 7,5%	0,085	3,24	3,8
EGPU-MIP 10%	0,088	3,53	4,1

*Área geométrica = 0,071 cm^2 para um raio $r = 1,5\text{ mm}$

Pelos resultados obtidos na **Tabela 5**, pode-se observar que o EGPU-MIP-TC com 5,0 % (m/m) do MIP apresentou um valor de área ativa e intensidade de corrente de pico anódica, ligeiramente maior entre os EGPU modificados. Os valores também foram muito próximos do EGPU não modificado (EGPU-0 %). Entretanto, esses valores são muito próximos e não há parâmetros estatísticos para comparação da repetibilidade de área por polimento. Uma discussão mais detalhada será apresentada a seguir.

Tabela 6 Valores de área ativa e densidade de corrente determinados por cronocoulometria usando ferricianeto de potássio 5,0 mmol L^{-1} em KCl 0,5 mol L^{-1} , em todas as granulometrias, menores que 150 μm , 150 a 250 μm e maiores que 300 μm , para o EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP contendo 5,0 % de modificador e preparados por maceração

EGPU	Área ativa */ cm ²	Corrente / 10 ⁻⁵ A	Densidade de corrente / 10 ⁻³ A cm ⁻²
EGPU-NIP-10	0,053	6,38	1,2
EGPU-MIP-10	0,047	6,26	1,3
EGPU-NIP-150	0,047	6,06	1,3
EGPU-MIP-150	0,049	6,04	1,2
EGPU-NIP-300	0,046	5,88	1,3
EGPU-MIP-300	0,043	5,72	1,3

*Área geométrica = 0,071 cm² para um raio r = 1,5 mm

Os resultados da cronocoulometria para os eletrodos com 5,0 % de MIP (10,8:1) nas diferentes granulometrias (**Tabela 6**) mostraram que, apesar dos valores absolutos de área ativa e corrente, ligeiramente maiores para o EGPU-NIP-10, todos os demais apresentam valores muito próximos para esses parâmetros assim como para a densidade de corrente.

Também foi possível observar que os valores de área ativa dos eletrodos contendo 5,0 % de MIP (10,8:1), apresentados na Tabela 5 são aproximadamente o dobro daquele medido para o EGPU-MIP-TC 5,0 % apresentado na Tabela 6. Isso sugere que se deve ter em conta uma falta de repetibilidade entre polimentos efetuados entre-dias.

Portanto, para uma comparação estatística minimamente confiável seria necessário preparar um certo número de eletrodos contendo o MIP (10,8:1) por maceração com 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % do modificador, em pelo menos uma granulometria e, com eles, realizar pelo menos cinco determinações de área ativa para, então, definir a melhor composição. Em seguida, confeccionar uma bateria de eletrodos como os da **Tabela 6**, contendo a quantidade otimizada do modificador e medir-se a área ativa, de cada um deles, em uma série de experimentos para definir a melhor granulometria a ser utilizada.

Isso resultaria em significativo volume de trabalho experimental. Antes de efetuar todo esse conjunto de preparação de eletrodos e medidas, tendo em conta a proximidade dos valores determinados para área ativa, corrente de pico e densidade de corrente, ponderou-se sobre a eficiência da presença dos MIP nas condições de trabalho utilizadas até este ponto, tendo-se concluído que os MIP não estariam sendo eficientes. A resposta para essa

ineficiência foi encontrada observando-se as micrografias obtidas por MEV e apresentadas na seção anterior. Nas **Figuras 7a e 7b** notou-se que as partículas de MIP isoladas apresentavam granulometrias conforme separadas por tamisação, neste caso, da ordem de 100 μm . Porém, quando inseridas no compósito elas apresentavam tamanhos muito inferiores, como mostram as imagens da **Figura 8**. Além do tamanho reduzido, as partículas de MIP se mostravam parcialmente soterradas no compósito, resultando em pequena área exposta para uma efetiva ação desejada dos MIP, como já foi discutido na seção anterior.

Assim concluiu-se dos dados das **Tabelas 5 e 6** associados às micrografias da **Figura 8** que de fato, os MIP não estavam resultando em uma modificação efetiva, produzindo resultados praticamente idênticos àqueles obtidos pelo eletrodo não modificado.

Isso seria resultado da ação mecânica do processo de maceração, durante o qual as partículas de MIP seriam moídas e reduzidas em tamanho. Esse fato foi confirmado pois os MIP se trituravam ao serem atritados mesmo nos dedos das mãos.

Em trabalhos anteriores verificou-se que o tamanho dos MIP é um parâmetro importante no seu desempenho analítico [51], além do que também foi visto na literatura que é necessária uma certa quantidade de cavidades referentes à molécula molde na superfície dos MIP para sua eficiência enquanto agente seletivo na modificação de eletrodos. Dessa forma foi proposta uma nova estratégia de preparo do compósito contendo o MIP baseada na solubilização dos componentes do compósito e o modificador em um solvente seguido da homogeneização da mistura e evaporação do solvente e extrusão do material antes da cura do polímero. Dessa forma foi possível obter os compósitos contendo os MIP na granulometria desejada.

Usando essa nova estratégia e com base nos indícios da **Tabela 6** e em resultados anteriores [50,51] decidiu-se preparar novos eletrodos contendo 5,0 % de NIP e MIP-TC na proporção 4:1 (monômero:TC, *mol/mol*), visando maior densidade de sítios de reconhecimento expostos [66,67].

As áreas ativas e densidades de corrente desses novos eletrodos foram determinadas usando cronocoulometria em ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ como sonda eletroquímica. Os resultados são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 Valores de área ativa e densidade de corrente determinados por cronocoulometria usando ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ para o EGPU sem o modificador e EGPU-MIP-TC contendo 5,0 % do MIP (4:1), preparados por solvente, na granulometria entre 150 e 250 µm

EGPU	Área ativa* / cm ²	Corrente 10 ⁻⁵ /A	Densidade de corrente 10 ⁻³ /Acm ⁻²
EGPU	0,016	4,61	2,90
EGPU-MIP	0,009	3,68	4,10
EGPU-NIP	0,075	3,81	0,51

*Área geométrica = 0,07 cm² para um raio r = 1,5 mm

Como esperado, os eletrodos modificados preparados pela nova estratégia de confecção do compósito já mostram diferenças entre si atribuídas a maior exposição dos modificadores (como pode ser visto nas imagens da **Figura 9**). Essas diferenças não podem ser atribuídas à densidade de sítios de reconhecimento, pois a sonda eletroquímica é inerte em relação à molécula molde.

A área ativa dos EGPU foi menor que a área geométrica do eletrodo, de 0,07 cm², o que pode ser justificado pela presença do polímero aglutinante do compósito e pelo modificador, ambos materiais isolantes, que ocupam posições em lugar dos sítios ativos do grafite na superfície do compósito.

No sentido de realizar uma avaliação estatística da resposta dos eletrodos preparados com 5,0 % de MIP (4:1), em diferentes granulometrias, usando a nova estratégia de confecção dos compósitos, foi realizado um estudo de repetibilidade, no qual mediu-se a resposta dos eletrodos em solução de TC 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato com pH 2,5, lixando a superfície dos eletrodos entre as sucessivas medidas.

Os resultados da média e desvio padrão do EGPU-MIP-TC dos valores de corrente, obtidos por CV, nesse estudo de repetibilidade são apresentados na **Tabela 8**:

Tabela 8 Média e desvio padrão das correntes de pico medidas em 10 determinações sucessivas em solução de TC 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato pH 2,5 dos EGPU-MIP-TC (4:1), preparados por solvente, contendo 5,0 % do MIP nas três granulometrias

Granulometria	< 150 µm	150 a 250 µm	> 300 µm
Média (µA)	8,0	7,3	7,1
Desvio Padrão (µA)	0,4	0,2	0,2
Intervalo de confiança*	8,4±0,3	7,3±0,1	7,1±0,1

* Calculado por *t*-Student com n = 10

Observando-se os resultados da **Tabela 8**, nota-se claramente que o EGPU-MIP-TC (5,0 %, 4:1, preparado por solvente), com granulometria < 150 µm é o que apresenta maior corrente média de pico, porém com maior desvio padrão. Por essa razão optou-se por continuar os estudos usando o EGPU-MIP-TC (5,0 %, 4:1, preparado por solvente), com granulometria entre 150 e 250 µm, pois este apresentou uma corrente relativamente elevada mas com menor desvio padrão. O eletrodo contendo o MIP de maior granulometria poderia ter área superficial ativa bloqueada pelo modificador. Além disso, o eletrodo selecionado foi o que apresentou perfis voltamétricos melhor definidos para a tetraciclina, conforme mostra a **Figura 11**.

Em trabalhos anteriores com a tetraciclina não foi notado o pico em torno de 700 mV [3]. Assim, o mesmo foi atribuído a eventuais resíduos de síntese dos MIP, com maior exposição nas partículas maiores. Essa hipótese se reforça pela ausência de tal pico nos MIP preparados na nova síntese, cujos resultados são apresentados nas seções seguintes.

Figura 11 Voltamogramas comparativos dos EGPU-MIP-TC preparados nas três granulometrias estudadas, < 150 μm , 150 e 250 μm e > 300 μm .

5.6 Considerações sobre o comportamento voltamétrico e estabilidade das tetraciclina

Segundo Kazemifard e Moore [72], a oxidação eletroquímica das TC ocorre no grupo fenol na posição C-10, bem como no grupo dimetilamina na posição C-4 (**Figura 1**), resultando em dois picos de oxidação, cuja posição depende do pH do meio.

Chatten *et. al.* [73] concordam que os grupos fenol e dimetilamina são os prováveis sítios para ocorrer uma oxidação inicial, em potencial menor que 1,0 V (*vs.* SCE). Segundo os autores, o grupo amino é protonado em tampão acetato pH 4,0 e 5,6 e o núcleo fenólico da molécula se oxida de forma irreversível na presença de 1 elétron.

Por outro lado, Dang *et. al.* [74], observaram somente um pico de oxidação da TC ($E \sim 0,58$ V *vs.* SCE), o qual atribuíram à oxidação do grupo fenol na posição 10. O mecanismo de oxidação proposto pelos autores, Equações 4 e 5, é baseado na oxidação do grupo fenol a benzoquinona, o qual se adsorve na superfície do eletrodo negro de acetileno, formando um par redox hidroquinona/benzoquinona.

O fato destes autores não observarem o segundo evento, pode estar relacionado com a atividade da superfície do eletrodo e à aparente baixa velocidade do processo de transferência eletrônica.

A estabilidade das tetraciclinas em água foi discutida por Loftin *et. al.* [75]. De acordo com esses autores, as tetraciclinas se degradam em água, incluindo os processos de hidrólise e epimerização. Os efeitos da força iônica, pH e temperatura em cada reação foram apresentados e, para a TC, OTC e CTC a 4 mmol L⁻¹ em tampão fosfato pH 2,0, a 22° C, foram encontrados tempos de meia vida (t_{1/2}) iguais a 306, 1052 e 318 h, respectivamente.

Para obter uma melhor sensibilidade dos EGPU na determinação voltamétrica da TC, a DPV foi utilizada após otimização de parâmetros experimentais e instrumentais a fim de verificar o potencial dos picos de oxidação da TC e confirmar a resposta dos eletrodos modificados na presença da tetraciclina.

Nestas condições, foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial (**Figura 12**) utilizando o EGPU e EGPU-MIP-TC nas diferentes porcentagens com amplitude de pulso $a = 50$ mV e velocidade de varredura $\nu = 10$ mV s⁻¹ e dois picos de oxidação foram novamente observados a 0,94 e 1,10 V (*vs.* SCE) para o EGPU e em 0,96 V (*vs.* SCE) para os EGPU-MIP-TC.

Neste caso, não houve diferença significativa na resposta voltamétrica obtida com os eletrodos nas diferentes concentrações de MIP concordando com os resultados obtidos por voltametria cíclica, entretanto, o eletrodo compósito contendo 5,0 % (*m/m*) de MIP-TC (EGPU-MIP-TC) apresentou ligeira vantagem em termos de corrente de pico e perfil voltamétrico.

Figura 12 Voltamogramas de pulso diferencial para a TC $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($\text{pH} = 2,5$) com os EGPU não-modificado e modificados com 2,5; 5,0; 7,5 e 10 % de MIP, com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A concentração hidrogeniônica do eletrólito suporte também desempenha um papel importante no potencial de pico e na intensidade de corrente na oxidação da TC. Os voltamogramas de DPV obtidos para solução de TC $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com variação de pH de 2,3 até 7,3 observaram uma diminuição da corrente enquanto o potencial de pico é deslocado para valores menos positivos para ambos os picos.

Picos bem definidos de oxidação de TC em pH 2,0 foram observados em um eletrodo de diamante dopado com boro, atribuindo esse fato às cargas negativas da superfície do eletrodo geradas pelo pré-tratamento anódico do eletrodo, enquanto a TC deve ser carregada positivamente a esse pH. Deve-se lembrar que Kazemifard e Moore [72] sugerem que o pKa da TC é da ordem de 3,3

No entanto, uma vez que os EGPU não foram submetidos a nenhum pré-tratamento eletroquímico, portanto, sem alta concentração de cargas negativas em suas superfícies, pode-se concluir que a degradação da TC é o fato mais importante para as mudanças atuais com o pH. Isto está de acordo com outro grupo que atribuiu a diminuição da intensidade atual em pH maior em eletrodos de carbono de nanotubos/óxidos de carbono de paredes múltiplas para a

instabilidade da TC em tais condições, que também apresentaram melhores respostas voltamétricas usando um eletrodo de ouro em meio ácido.

Neste ponto é importante destacar a necessidade de definir uma linha base adequada para a medida das correntes de pico das tetraciclinas em meio de tampão fosfato (pH = 2,5) com os EGPU modificados ou não [3]. Ocorre que as TC se oxidam em potenciais relativamente elevados e a linha base varia quando se adiciona o analito em relação ao branco.

Uma ilustração da necessidade de escolher uma linha base apropriada é apresentada na **Figura 13**, na qual as correntes de pico de um voltamograma obtido à partir de uma solução contendo padrão de TC $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH = 2,5) no EGPU-MIP-TC 5 % (linha preta), são medidas em relação ao branco (curva azul), em relação ao método “ombro a ombro”, como tomado no potenciostato (linhas verdes) e usando uma linha base obtida a partir de curvas de calibração (linha vermelha). As correntes de pico resultantes são apresentadas na **Tabela 9** tendo sido tomadas respectivamente em 0,924 e 1,07 V (vs. SCE).

Figura 13 Exemplo de linhas base testadas para as determinações quantitativas de TC. Neste caso foi usada uma solução contendo padrão de TC $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH = 2,5) no EGPU-MIP-TC 5% (linha preta), medidas em relação ao branco (curva azul), em relação ao método “ombro a ombro”, como tomado no potenciostato (linhas verdes) e usando uma linha base obtida a partir de curvas de calibração (linha em vermelha).

Tabela 9 Correntes anódicas medidas para solução padrão de TC 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH = 2,5) no EGPU-MIP-TC 5,0 % (m/m), considerando diferentes linhas base, nos dois potenciais de pico

Linha base	Corrente de pico anódica em / μA	
	0,924*	1,07*
“Ombro-a-ombro” (verde)	0,164	0,184
Medida por calibração (vermelha)	0,492	0,860
Branco (azul)	0,778	1,47
Sem descontar branco	1,43	2,64

* potenciais de pico, V (vs. SCE)

Observa-se variação significativa no valor de corrente de pico anódica, dependendo da forma como a mesma é determinada. Nas curvas analíticas obtidas com a TC, descritas mais adiante neste texto, observou-se que, ao tomar as correntes de pico na modalidade “ombro a ombro”, fornecidas pelo “*software*” de tratamento de dados do potenciostato, a região linear passa abaixo da origem, o que significa desconto excessivo do sinal do branco.

Em uma segunda tentativa optou-se por tomar as correntes por medida direta sobre o voltamograma, a partir do eixo das abcissas e descontando-se o sinal do branco. Neste caso a a região linear passa acima da origem, o que significa contribuição indesejada do sinal do branco.

Nestes dois casos foram usadas curvas de calibração, obtidas por adição de padrão em amostras contendo quantidades conhecidas de TC, resultando em valores medidos respectivamente abaixo ou acima do valor adicionado. Usando-se essas mesmas curvas, foi feita uma nova aproximação buscando-se uma linha base que levasse aos valores conhecidos de concentração para o antibiótico conforme mostra a **Figura 13**. Uma linha base tomada de forma semelhante à que mostrou melhor resultado, passou a ser usada em todas as medidas quantitativas descritas nesse trabalho.

5.7 Curvas analíticas dos EGPU-MIP-TC, EGPU-NIP e EGPU para a TC em DPAdASV

Uma vez concluída a avaliação de todos os parâmetros envolvidos na preparação dos compósitos, que incluíram porcentagem de modificador, tamanho de partícula e método de preparação, assim como as condições experimentais e instrumentais para desempenho máximo do sistema, o eletrodo escolhido foi usado na obtenção de curvas analíticas da tetraciclina usando DPAdASV. A **Tabela 10** apresenta um resumo desses parâmetros.

Tabela 10 Parâmetros selecionados após otimização para a determinação da TC usando os eletrodos compósitos EGPU modificados com MIP-TC

Parâmetros	Selecionados
Composição do eletrodo / %	55 (grafite): 45 (PU): 5 (MIP)
Tamanho do MIP / μm	150 - 250
Método de preparação	Solvente (CHCl_3)
Meio eletrolítico	Solução tampão fosfato pH 2,5
Amplitude de pulso / mV	50
Velocidade de varredura / $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$	10
Tempo de acumulação / s	300
Potencial de acumulação / V (vs. SCE)	0,7
Intervalo de potenciais / V (vs. SCE)	0,7 a 1,2
Linha base	Calibrada

Assim foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial com redissolução anódica em diferentes concentrações de TC para os EGPU-MIP-TC, EGPU-NIP e EGPU, no intuito de avaliar a sensibilidade do EGPU-MIP-TC mediante adição do modificador contendo as cavidades do analito. Resultados típicos são apresentados na **Figura 14**, para comparação do desempenho em termos resolução de picos e amplitude de corrente entre os diferentes eletrodos.

Figura 14 Voltamogramas comparativos entre os EGPU para uma solução de TC $40 \mu mol L^{-1}$ em tampão fosfato pH = 2,5.

Um exemplo da variação de resposta analítica do EGPU-MIP-TC, na presença de diferentes concentrações de TC é apresentado na **Figura 15**.

Resguardadas as seletividades, resultados semelhantes foram obtidos com os demais eletrodos. Uma comparação entre as curvas analíticas obtidas com o EGPU-MIP-TC, EGPU-NIP e EGPU, com destaque para os voltamogramas obtidos para o EGPU-MIP-TC é apresentada na **Figura 15**.

A Figura 15 mostra claramente que os NIP promovem resposta menos sensível na região linear entre 20 e $100 \mu mol L^{-1}$, o que pode ser explicado pela ocupação de sítios ativos na superfície do eletrodo sem efeito de pré-concentração ou incremento na velocidade do processo de transferência de cargas.

Figura 15 Curvas analíticas para o EGPU, EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP, usando o pico de oxidação em + 0,9 V (vs. SCE), com destaque para os voltamogramas obtidos para o EGPU-MIP-TC.

Por outro lado, a presença dos MIP levou a resposta a ser ligeiramente mais sensível do que a própria PU, sugerindo que o MIP atua efetivamente no processo de pré-concentração do analito, apesar de ser eletroquimicamente inerte e sua presença ocupar sítios ativos da superfície, permitindo que a TC pré-concentrada na superfície do sensor seja reconhecida com sensibilidade. Um resumo das figuras de mérito de cada eletrodo é apresentado na **Tabela 11**, sendo os limites de detecção calculados como três vezes o desvio do branco, dividido pelo coeficiente angular, dessa forma, $LOD = 3 S_d / \text{"slope"}$ [76].

Da **Tabela 11** nota-se claramente que o EGPU-MIP-TC apresenta vantagens sobre os demais eletrodos, que inclui região linear de resposta em menores concentrações da TC, menor limite de detecção e maior sensibilidade analítica.

Vale lembrar que Calixto *et. al.* [3] encontraram limites de detecção da ordem de $\mu mol L^{-1}$, 2,6; 1,7 e 0,82 $\mu mol L^{-1}$ para TC, OTC e CTC, respectivamente, usando um EGPU não modificado e determinando as correntes no pico de menor potencial.

Tabela 11 Figuras de mérito para os eletrodos EGPU-MIP-TC, EGPU e EGPU-NIP

Eletrodo	Intercepto / μA	Sensibilidade / $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$	Coeficiente de correlação	Região linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD / $\mu\text{mol L}^{-1}$
EGPU	1,40	0,0211	0,9989	8,0 a 60	2,70
EGPU-NIP	0,384	0,00880	0,9992	20 a 100	4,71
EGPU-MIP-TC	1,16	0,0239	0,9999	4,0 a 60	0,555

5.8 Determinação da TC em formulações farmacêuticas comerciais usando o EGPU-MIP-TC

Com base em toda otimização e procedimentos adotados para determinar TC, utilizou-se o EGPU-MIP-TC 5,0 % (*m/m*) na determinação de TC em duas formulações farmacêuticas: cloridrato de tetraciclina 500 mg dos fármacos Tetramed[®] e de um medicamento genérico de fabricação da empresa Prati-Donaduzzi. Para determinar a quantidade do analito contido nas amostras, utilizou-se o método de adição de padrão com medidas feitas em triplicata. Os resultados da determinação de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em formulação farmacêutica do medicamento Tetramed[®] cloridrato de tetraciclina 500 mg são mostrados na **Figura 16**, a qual apresenta os voltamogramas de DPAdASV com adição de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da amostra do fármaco Tetramed[®] 500 mg e três adições do padrão de TC de 10, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as respectivas curvas de cada adição, da amostra e do padrão.

Figura 16 Voltamogramas de DPAdASV nas condições otimizadas com $n = 3$ (a) e curvas de adição de padrão típica com $n = 3$ (b), em tampão fosfato pH 2,5 para TC no medicamento Tetramed[®].

O mesmo método de adição de padrão e concentração de amostra e padrão foram usados para determinar TC no medicamento genérico cloridrato de tetraciclina 500 mg. Os resultados da determinação são mostrados na **Figura 17**.

Figura 17 Voltamogramas de DPAdASV nas condições otimizadas com $n = 3$ (a) e curvas de adição de padrão típica com $n = 3$ (b), em tampão fosfato pH 2,5 para TC no medicamento cloridrato de tetraciclina 500 mg genérico.

A **Tabela 12** apresenta os resultados das determinações por DPAdASV usando o EGPU-MIP-TC, em comparação com o valor rotulado das concentrações de TC nas amostras farmacêuticas e os valores obtidos utilizando o procedimento oficial HPLC [77]. Os resultados obtidos por DPAdASV e HPLC estão de acordo, em um intervalo de confiança de 95 %, de acordo com o teste *t*-Student [78], que confirma a eficiência no desempenho do EGPU-MIP-TC na determinação do analito TC.

Tabela 12 Determinação da TC em formulações farmacêuticas pelo método de adição de padrão, em triplicata, usando o EGPU-MIP-TC por DPAdASV e HPLC

Amostras	Rotulado / mg	Determinado / mg drágea ¹			
		DPAdASV	E ₁ ^a / %	HPLC	E ₂ ^b / %
Tetramed®	500	545	9,0	507	7,5
Genérico	500	530	11,2	547	-3,1

a = DPAdASV vs. Rotulado: $((\text{DPAdASV} - \text{Rotulado}) / \text{Rotulado} \times 100\%, n = 3$

b = DPAdASV vs. HPLC: $((\text{DPAdASV} - \text{HPLC}) / \text{HPLC} \times 100\%, n = 3$

Os valores encontrados por HPLC e por DPAdASV apresentam convergência em relação ao valor rotulado nas duas amostras e concordam entre si quando se aplica o teste *t*-Student com 98 % de confiança, pois os valores de *t* calculados são 5,6181 e 4,3599, respectivamente para o Tetramed® e para a formulação genérica, enquanto o *t* tabelado para *n* = 3 é 6,965. Entretanto para intervalo de confiança de 95 %, os valores do genérico estão no limite da concordância entre si (*t*_{calc} = 4,360 e *t*_{tab} = 4,303).

5.9 Determinação da TC em urina sintética usando o EGPU-MIP-TC

Usando os mesmos parâmetros na determinação dos fármacos, a TC foi determinada em uma amostra de urina sintética, utilizando o mesmo EGPU-MIP-TC. A urina sintética foi contaminada com 10,0 µmol L⁻¹ de TC e as medidas realizadas em triplicata utilizando o método de adição de padrão. Os resultados estão apresentados na **Figura 18**:

Figura 18 Voltamogramas de DPAdASV nas condições otimizadas com $n = 3$ (a) e curvas de adição de padrão típica com $n = 3$ (b), em tampão fosfato pH 2,5 para TC na urina sintética.

A partir da curva de adição de padrão encontrou-se um valor de $10,4 \pm 0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TC na urina sintética quando o esperado era de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que implica em um erro relativo de 4,0 %.

5.10 Cálculo dos coeficientes de recuperação

A exatidão do método foi estimada baseada nos valores dos percentuais de recuperação apresentados na **Tabela 13** e obtidos em triplicata utilizando o EGPU-MIP-TC em DPAdASV. A **Tabela 13** apresenta os valores médios obtidos para as amostras Tetramed®, medicamento genérico e urina sintética. As recuperações médias foram de 98,8; 100,7; 101,3 %, respectivamente.

Tabela 13 Coeficiente de recuperação de TC das formulações farmacêuticas e urina sintética

Amostras	Adição	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Tetramed®	1 ^a	10	9,74	97,4
	2 ^a	15	14,59	97,3
	3 ^a	20	20,37	101,8
Genérico	1 ^a	10	10,30	103,0
	2 ^a	15	15,08	100,5
	3 ^a	20	19,73	98,6
Urina sintética	1 ^a	10	10,49	104,9
	2 ^a	15	15,26	101,7
	3 ^a	20	19,47	97,3

5.11 Estudo de seletividade do EGPU-MIP-TC – Teste de interferência

A principal contribuição analítica esperada da presença dos MIP, enquanto modificador de eletrodos está relacionada com a melhora da seletividade do sensor contendo esses modificadores, em relação ao eletrodo não modificado e ao eletrodo modificado com o NIP. Assim foi feita uma avaliação do desempenho dos EGPU-MIP-TC quanto à seletividade de resposta à TC, na presença de clortetraciclina (CTC) e oxitetraciclina (OTC), cujas estruturas são estruturalmente semelhantes, conforme **Figura 19**.

Figura 19 Fórmula estrutural da tetraciclina em (a), da oxitetraciclina em (b) e da clortetraciclina em (c).

No teste de seletividade usando a clortetraciclina como interferente da TC (ver a **Tabela 14**), pode-se observar que o EGPU-MIP-TC apresentou interferência positiva menor em todos os casos, quando adicionadas quantidades metade, iguais e o dobro de CTC. No geral, em valores percentuais, a interferência foi menor do que a obtida com o EGPU-NIP, confirmando que o EGPU-MIP-TC foi mais efetivo na capacidade de reconhecer seletivamente o analito na presença do interferente CTC.

Tabela 14 Interferência da CTC no sinal obtido para 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC usando os EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP

EGPU-MIP-TC			EGPU-NIP	
$C_{TC} : C_{\text{Interferente}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	I_p (μA)	Interferência (%)	I_p (μA)	Interferência (%)
20 : 0,0	0,65	-	0,89	-
20 : 10	0,78	20,0	1,40	57,3
20 : 20	0,78	20,0	1,40	57,3
20 : 40	0,98	50,7	1,64	84,2

No teste de interferente usando a oxitetraciclina (**Tabela 15**), pode-se notar que o EGPU-MIP-TC não apresentou interferência quando adicionadas quantidades metade e iguais de OTC, enquanto o EGPU-NIP apresentou interferência negativa para metade da OTC e positiva para quantidades iguais entre TC e OTC. Para o dobro de OTC em relação à TC, a interferência foi muito menor para o EGPU-MIP-TC, confirmando novamente que o EGPU-MIP-TC foi mais efetivo na capacidade de reconhecer seletivamente o analito TC na presença do interferente OTC.

Tabela 15 Interferência da OTC no sinal obtido para 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC usando os EGPU-MIP-TC e EGPU-NIP

EGPU-MIP-TC			EGPU-NIP	
$C_{TC} : C_{\text{Interferente}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	I_p (μA)	Interferência (%)	I_p (μA)	Interferência (%)
20 : 0,0	0,68	-	0,72	-
20 : 10	0,68	0	0,68	-5,60
20 : 20	0,68	0	0,82	13,8
20 : 40	0,73	7,35	1,13	56,9

Comparando-se os dois interferentes, pode-se concluir que a interferência foi maior com a CTC. Isso ocorre devido à semelhança estrutural entre a TC e a CTC. No entanto, pode-se observar que o EGPU-MIP-TC foi capaz de reconhecer seletivamente o analito TC em meio aos dois interferentes, CTC e OTC, comparado ao EGPU-NIP sem impressão molecular.

6 CONCLUSÕES

Os cálculos teóricos mostraram que o monômero utilizado é adequado para preparação do MIP utilizando a TC como molécula molde, resultando em eletrodos com capacidade de discriminação, mesmo na presença de outras tetraciclinas com estruturas moleculares semelhantes e que apresentam processos redox nos mesmos sítios ativos.

Na preparação dos eletrodos deve-se levar em conta que os polímeros com e sem impressão molecular, respectivamente, os MIP-TC e os NIP, são inertes eletroquimicamente e podem obstruir sítios ativos da superfície eletródica. Além disso, a granulometria do MIP/NIP deve permitir uma exposição da face do modificador com uma área mínima que permita seu contato com a amostra resultando no efeito desejado.

Os MIP-TC como preparados neste trabalho permitiram o aumento da sensibilidade dos eletrodos resultantes, provavelmente devido à sua capacidade de interagir com a molécula molde provocando a sua pré-concentração na superfície do eletrodo, que compensa a diminuição de sítios eletroativos quando se substitui o grafite pelo MIP. Esse efeito compensatório não foi observado no caso do NIP, provando a eficiência dos sítios de reconhecimento molecular no material impresso.

Os resultados quantitativos na determinação de TC, tanto em formulações farmacêuticas comerciais, como em urina sintética demonstraram que o EGPU-MIP-TC pode ser utilizado eficientemente neste tipo de procedimento com resultados comparáveis aos métodos tradicionais. O uso do MIP como modificador de eletrodos permitiu obter limites de detecção da ordem de submicromol L⁻¹ do analito TC, portanto abaixo dos valores obtidos com o eletrodo modificado sem impressão molecular (EGPU-NIP) e o eletrodo não modificado (EGPU).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] TALLMAN, D.E.; PETERSEN, S.L. Composite electrodes for electroanalysis: Principles and applications. **Electroanalysis**, v. 2, n. 7, p. 499–510, 1990.
- [2] CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, E. T. G.; Determination of tetracycline in bovines and human urine using a graphite-polyurethane composite electrode; **Analytical Letters**, v. 2, ed. 9, p. 1454-1464, 2015.
- [3] CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of tetracycline in environmental waters samples at a graphite-polyurethane composite electrode; **Journal of the Brazilian Chemical Society**; v. 23, ed. 5, p. 938-943, 2012.
- [4] SACIOTO, T. R. **Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos impressos à base de grafite e poliuretana**. 2014. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- [5] POLYAKOV, M.V. Adsorption properties and structure of silica gel. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, v. 2, p. 799–804, 1931.
- [6] PAULING, L. A Theory of the structure and process of formation of antibodies*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p. 2643–2657, 1940.
- [7] MASQUÉ, N.; MARCÉ, R.; BORRULL, F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 384–394, 1998.
- [8] MAYES, A.G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 321–332, 1997.
- [9] MAHONY, J. O.; NOLAN, K.; SMYTH, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 1, p. 31–39, 2005.

- [10] MOLINELLI, A.; JANOTTA, M.; MIZAIKOFF, B. Protein Nanotechnology. In: T Vo-Dinh (Ed.); **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, New Jersey: Humana Press, v. 300, p. 243–54, 2005.
- [11] PILETSKY, S. A.; ALCOCK, S.; TURNER, A. P. F. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 9–12, 2001.
- [12] HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2495–2504, 2000.
- [13] BLOMGREN, A.; BERGGREN, C.; HOLMBERG, A.; LARSSON, F.; SELLERGREN, B. Ensing, Kees. Extraction of clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 157–164, 2002.
- [14] BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 35–44, 2001.
- [15] ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- [16] MULLETT, W. M.; MARTIN, P.; PAWLISZYN, J. In-Tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2383–2389, 2001.
- [17] HWANG, C. C.; LEE, W. C. Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 765, n. 1, p. 45–53, 2001.
- [18] SKUDAR, K.; BRÜGGEMANN, O.; WITTELSBERGER, A.; RAMSTRÖM, O. Selective recognition and separation of β -lactam antibiotics using molecularly imprinted polymers. **Analytical Communications**, v. 36, n. 9-10, p. 327, 1999.

- [19] NILSSON, K.; LINDELL, J.; NORRLÖW, O.; SELLERGREN, B. Imprinted polymers as antibody mimetics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 680, n. 1, p. 57–61, 1994.
- [20] SCHWEITZ, L.; ANDERSSON, L. I.; NILSSON, S. Capillary electrochromatography with molecular imprint-based selectivity for enantiomer separation of local anaesthetics. **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1-2, p. 401–409, 1997.
- [21] VALLANO, P. T.; REMCHO, V. T. Highly selective separations by capillary electrochromatography: molecular imprint polymer sorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 887, n. 1-2, p. 125–135, 2000.
- [22] PILETSKY, S. A.; TURNER, A. P. F. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. **Electroanalysis**, v. 14, n. 5, p. 317–323, 2002.
- [23] BLANCO-LÓPEZ, M. C.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 36–48, 2004.
- [24] CRISTALLINI, C.; CIARDELLI, G.; BARBANI, N.; GIUSTI, P. Acrylonitrile-acrylic acid copolymer membrane imprinted with uric acid for clinical uses. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 31–38, 2004.
- [25] AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa nacional de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo – PAMVET**. Brasília, 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 28 jun. 2017.
- [26] BASSETT, E.J., M.S. KEITH, G.J. ARMELAGOS, D.L. MARTIN, AND A.R. VILLANUEVA. 1980. Tetracycline-labeled bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* 209: 1532-1534.
- [27] PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B.; SANTOS, H. F.; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclinas e glicidinas: Uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

- [28] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Aditivos proibidos na alimentação animal**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-proibidos>. Acesso em: 28 jun. 2017.
- [29] GHOLIVAND, M. B.; KHANI, H. Determination tetracycline at a UV-irradiated DNA film modified glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 2, p. 461 – 467, 2013.
- [30] MONSER, L.; DARGHOUTH F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 23, p. 353-362, 2000.
- [31] DELÉPÉE R., POULIQUEN H. Ion-paired solid phase extraction as a sample preparation strategy for the high-performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline in the bryophyte *Fontinalis antipyretica*. **Analytica Chimica Acta** 475, p. 117-123, 2003.
- [32] FURUSAWA, N. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. **Talanta** 59, p. 155-159, 2003.
- [33] WEN, Y.; WANG, Y.; FENG, Y Q. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta** 70, p. 153-159, 2006.
- [34] PENA, A. L. S.; LINO, C. M.; SILVEIRA, I. N. Determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography with post column derivatization and fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, 82, p. 55-59, 1999.
- [35] FERRAZ SPISSO, B.; DE OLIVEIRA E JESUS, A. L.; GONÇALVES DE ARAÚJO JÚNIO, M. A.; ALVES MONTEIRO, M. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. **Analytica Chimica. Acta** 581, p. 108-117, 2007.
- [36] WAN, G.; CUI, H.; ZENG, H.; ZHOU, J.; LIU, L.; YU, X. Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with

potassium permanganate–sodium sulfite– β -cyclodextrin chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography, B** 824, p. 57-64, 2005.

[37] PALAHARN, S.; CHAROENRAKS, S. T.; WANGFUENGKANAGUL, N.; GRUDPAN, K.; CHAILAPAKUL, O. Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, 499, p. 191-197, 2003.

[38] CHAROENRAKS, T.; CHUANUWATANAKUL, S.; HONDA, K.; YAMAGUCHI, Y.; CHAILAPAKUL, O. Analysis of tetracycline antibiotics using HPLC with pulsed amperometric detection. **Analytical Sciences**. 21(3), p. 241, 2005.

[39] CAI, Y.; SHI, Y.; MOU, S.; LU, Y. Optimizing the integrated pulsed amperometric multicycle step waveform for the determination of tetracyclines. **Journal of Chromatography A**, 1118, p. 35-40, 2006.

[40] VEGA, D.; AGUÍ, L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Voltammetry and amperometric detection of tetracyclines at multi-wall carbon nanotube modified electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 389, p. 951-958, 2007.

[41] WANGFUENGKANAGUL, W.; SIANGPROH, W.; CHAILAPAKUL, O. Electrochemical analysis of Tetracycline using an Anodized boron-doped diamond thin film electrode. **Talanta** 64, p. 1183-1188, 2004.

[42] OUNGPIPAT, W.; SOUTHWELL-KEELY, P.; ALEXANDER, P. W. Flow injection detection of tetracyclines by electrocatalytic oxidation at a nickel-modified glassy carbon electrode. **Analyst** 120, p. 1559-1565, 1995.

[43] TREETEPVIJIT, S.; PREECHAWORAPUN, A.; PRAPHAIRAKSIT, N.; CHUANUWATANAKUL, S.; EINAGA, Y., CHAILAPAKUL, O. Use of nickel implanted boron-doped diamond thin film electrode coupled to HPLC system for the determination of tetracyclines. **Talanta** 68, p. 1329-1335, 2006.

[44] XIE, Q., HUIMIN, Z.; HONGTAO, W.; FENG, T. Amperometric Sensor for Tetracycline Determination Based on Molecularly Imprinted Technique. **Procedia Environmental Sciences**, p. 249-257, 2013.

- [45] GUORUN, Q.; SULIAN, Z.; YUMIN, L.; X. WEI, AIBO, W.; DABING, Z. Metal ion mediated synthesis of molecularly imprinted polymers targeting tetracyclines in aqueous samples. **Journal of Chromatography B** 820, p. 3187-3193, 2009.
- [46] JING, T.; WANG, Y.; DAI, Q.; XIA, H.; NIU, J.; HAO, Q.; MEI, S.; ZHOU, Y. Preparation of mixed-templates molecularly imprinted polymers and investigation of the recognition ability for tetracycline antibiotics. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 2218-2224, 2010.
- [47] WONG, A.; SCONTRI, M.; MATERON, E. M.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 757, p. 250-257, 2015.
- [48] KUSHIWARA, R. T.; SILVA, M. R.; ANGELO, A. C. D.; TEIXEIRA, M. F. S. Construction of an electrochemical sensing platform based on platinum nanoparticles supported on carbon for tetracycline determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 228, p. 207-213, 2016.
- [49] FILIK, H.; AVAN, A. A.; AYDAR, S.; OZYURT, D.; DEMIRATA, B. Determination of tetracycline on the surface of a high-performance graphene modified screen-printed carbon electrode in milk and honey samples. **Current Nanoscience**, v. 12, ed. 4, p. 527-533, 2016.
- [50] YAKOULT, A. A.; EL-HADY, D. A.; A combination of β -cyclodextrin functionalized magnetic graphene oxide nanoparticles with β -cyclodextrin-based sensor for highly sensitive and selective voltammetric determination of tetracycline and doxycycline in milk samples. **RSC Advances**, v. 6, ed. 48, p. 41675-41686, 2016.
- [51] CERVINI P.; CAVALHEIRO E. T. G. Evaluation of the analytical potentialities of a composite electrode modified with molecularly imprinted polymers. **Analytical Letters** 42, p. 1940-1957, 2009.
- [52] PEREIRA, A.V.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Do voltammetry electrodes modified with MIPs really work? The role of large molecules: folic acid as a probe. **Analytical Methods** 6, p. 6658–6667, 2014.

[53] FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; GOMPERTS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCHIAN, H. P.; ORTIZ, J. V.; IZMAYLOV, A. F.; SONNENBERG, J. L.; WILLIAMS-YOUNG, D.; DING, F.; LIPPARINI, F.; EGIDI, F.; GOINGS, J.; PENG, B.; PETRONE, A.; HENDERSON, T.; RANASINGHE, D.; ZAKRZEWSKI, V. G.; GAO, J.; REGA, N.; ZHENG, G.; LIANG, W.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; THROSELL, K.; MONTGOMERY, JR., J. A.; PERALTA, J. E.; OGILIO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; ADAMO, C.; CAMMI, R.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; FOX, D. J. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

[54] OTHERSEN, O. G.; BEIERLEIN, F.; LANIG, H.; CLARK, T. Conformations and Tautomers of Tetracycline. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 13743-13749, 2003.

[55] STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods IV: Extension of MNDO, AM1, and PM3 to more main group elements. **Journal of Molecular Modeling**, v.10, p. 155-164, 2004.

[56] STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v.13, p. 1173-1213, 2007.

[57] CHAI, J.-D.; HEAD-GORDON, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.10, p. 6615-6620, 2008.

[58] VYDROV, O. A.; VAN VOORHIS, T. Benchmark assessment of the accuracy of several van der Waals density functionals. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v.8, p.1929-1934, 2012.

- [59] STEINMANN, S. N.; PIEMONTESE, C.; DELACHAT, A.; CORMINBOEUF, C. Why are the interaction energies of charge-transfer complexes challenging for DFT? **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, p. 1629-1640, 2012.
- [60] TENTSCHER, P. R.; AREY, J. S. Binding in radical-solvent binary complexes: benchmark energies and performance of approximate methods. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v.9, p. 1568-1579, 2013.
- [61] SCALMANI, G.; FRISCH, M. J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. **The Journal of Chemical Physics**, v. 132, p. 114110, 2010.
- [62] COUTINHO, K.; CANUTO, S. DICE: A Monte Carlo program for molecular liquid simulation, University of São Paulo, Brazil, version 2.9 (2003)
- [63] TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, 548, p. 11-19, 2005.
- [64] TAN, Y.; ZHOU, Z.; WANG, P.; NIE, L.; YAO, S. A study of a bio-mimetic recognition material for the BAW sensor by molecular imprinting and its application for the determination of paracetamol in the human serum and urine. **Talanta**, 55, p. 337-347, 2001.
- [65] RAMSTRÖM, O.; ANDERSSON, L. I.; MOSBACH, K. Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting. **Journal of Organic Chemistry**, 58, p. 7562-7564, 1993.
- [66] TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP ('Molecularly imprinted polymers') em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.
- [67] TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: Aplicações de MIP ('Molecularly imprinted polymers') no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, p. 1087-1101, 2005.

- [68] KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. (Eds.). Laboratory techniques in electroanalytical chemistry, New York: Marcel Dekker, 1996. p. 986.
- [69] FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, p. 392, 1988.
- [70] URINA
- [71] MARESTONI, L. D.; WONG, A.; FELICIANO, G. T.; MARCHI, M. R. R.; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Semi-empirical quantum chemistry method for pre-polymerization rational design of ciprofloxacin imprinted polymer and adsorption studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 109-118, 2016.
- [72] KAZEMIFARD, A. G.; MOORE, D. E. Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 689-696, 1997.
- [73] CHATTEN, L. G.; FLEISCHMANN, M.; PLETCHER, D. The anodic oxidation of some tetracyclines. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 102, p. 407-413, 1979.
- [74] DANG, X.; CHENGGUO, H.; WEI, Y.; CHEN, W.; HU, S. Sensitivity improvement of the oxidation of tetracycline at acetylene black electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Electroanalysis**, v. 16, n. 23, p. 1949-1955, 2004.
- [75] LOFTIN, K. A.; ADAMS, C. D.; MEYER, M. T.; SURAMPALLI, R. Effects of ionic strength, temperature and pH on degradation of selected antibiotics. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 378-386, 2008.
- [76] MILLER, J.; MILLER, J. Statistics for analytical chemistry, New York: Ellis Horwood, p. 233, 1993.
- [77] THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: The National Formulary, NF 24, 29 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 2098, 2006.
- [78] HARRIS, D. C; Quantitative Chemical Analysis, fourth ed. Freeman, p.62, 63, 1996.

8 ANEXOS

Figura B1. 21 conformações possíveis da tetraciclina geradas com base nos resultados de Othersen *et al.* e otimizadas com o método semiempírico PM3.

Tabela B1. Energia relativa (em kcal mol⁻¹) dos 21 isômeros da tetraciclina com os métodos PM3 e PM6*

Isômeros PM3			Isômeros PM6		
N1	2.9	4.0	N12	1.2	3.1
N2	-0.2	4.0	N13	2.4	3.0
N3	3.1	4.2	N14	0.3	2.2
N4	4.3	6.8	N15	2.4	3.0
N5	1.3	6.8	N16	2.0	5.1
N6	1.4	6.9	N17	4.2	2.2
N7	6.0	7.2	N18	3.4	5.1
N8	4.4	6.9	N19	6.0	5.1
N9	2.9	0.0	N20	9.2	8.0
N10	0.0	0.0	N21	8.6	9.9
N11	4.6	3.1			

***Comentários:** Como pode ser observado há uma grande dependência quanto ao método semiempírico utilizado. Por exemplo, examinando os resultados com o PM3 é possível observar que a estrutura **N2** demonstrou ser a mais estável. As conformações **N14** e **N10** apresentaram uma diferença de energia inferior a 0,5 kcal mol⁻¹, enquanto que as estruturas **N5** e **N6** demonstraram uma diferença próximo a 1 kcal mol⁻¹. Por outro lado, com o método

PM6 foram as conformações **N9** e **N10** que apresentaram os menos valores na análise das energias relativas.

Figura B2. Energia relativa (em kcal mol⁻¹) na fase gasosa (em parênteses) e no solvente (em colchetes) metanol com a metodologia wB97XD/6-31G(d)*.

***Comentários:** Analisando a Figura 2, foi possível observar que a conformação **N10** apresentou a maior estabilidade relativa na fase gasosa. No entanto, foi a conformação **N2** que apresentou o menor valor de energia, quando empregado o solvente metanol e, por isto, esta estrutura foi selecionada para as subseqüentes análises dos complexos formados, entre as tetraciclinas e diferentes monômeros, com o efeito do solvente metanol.