



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA RIANNE DA ROCHA

**SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE
IMPRESSO PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E
DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM
AMOSTRAS DE LEITE**

Londrina
2023

LUANA RIANNE DA ROCHA

**SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE
IMPRESSO PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E
DETERMINAÇÃO
DE TETRACICLINAS EM AMOSTRAS DE LEITE**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Rocha, LUANA RIANNE DA ROCHA.

SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM AMOSTRAS DE LEITE / LUANA RIANNE DA ROCHA Rocha. - Londrina, 2023.
203 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Desenvolvimento de métodos analíticos - Tese. 2. Preparo de Amostra - Tese. 3. Eletroquímica - Tese. 4. Antibióticos - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

LUANA RIANNE DA ROCHA

**SÍNTESE DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO PARA PRÉ-
CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM AMOSTRAS DE
LEITE**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Roberto de Matos
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL

Prof. Dr. Arnaldo César Pereira
Universidade Federal de São João Del Rei – UFSJ

Londrina, 19 de maio de 2023

“Estamos sempre competindo. Em contexto e proporções diferentes, mas sempre competindo. O primeiro lugar, o maior número de likes, seguidores, streamings, (de artigos), de valores. Reduzimos a realização humana a números e resultados. Subjugamos o conceito de sucesso ao contexto raso da visibilidade. Da competição surge a inevitável comparação. Medimos quem somos com a régua dos outros. As medidas nunca são justas, pois a comparação não contempla as condições que nos diferem. Na sociedade dos números, a angústia e a ansiedade prevalecem. A ânsia de ter o que o outro tem assassina nossa paz. E sem paz, até nossas somas diminuem.”

Pe. Fábio de Melo

*Muitas pessoas passam a vida à procura do seu grande amor, e eu, por uma benção de Deus, encontrei o meu desde o dia em que nasci e pude chamá-lo de PAI. No dicionário da minha vida, saudade, amor e exemplo tem apenas um significado: V A L M I R!
Meu coração é seu, Paí!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley por ter sido professor, orientador e amigo durante essa jornada. São 7 anos juntos, sendo 1 de iniciação científica, 2 anos de mestrado e 4 anos de doutorado. Obrigada por acreditar e contribuir para meu crescimento profissional e pessoal, por incentivar a seguir mesmo nos momentos de maior desânimo. Feliz e grata pela nossa parceria em todos esses anos.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL), que foi “minha casa” ao longo dos últimos 10 anos. Obrigada UEL, pelos seus corredores pude crescer, aprender e ensinar, tanto na vida profissional quanto pessoal.

A CAPES, CNPq pelas bolsas fornecidas durante toda minha jornada acadêmica, desde a iniciação científica (2013-2016), o mestrado (2017-2019), e em especial, ao INCT de Bioanalítica pelo fomento durante o doutorado (2019-2022).

A todos os professores que passaram pela minha vida, em que pautada no conhecimento e no exemplo por eles transmitidos pude chegar até aqui. Em especial aos professores da UEL, que muitos se tornaram amigos para vida.

Aos laboratórios, técnicos e colaboradores parceiros, pela realização de algumas análises. Em especial as técnicas Dalva e Ana, pela amizade, auxílio, cumplicidade e bons cafés.

Ao meu pai, Valmir, por ser minha luz. Dono da minha maior saudade e do meu coração.

A minha mãe, Sueli, que mesmo longe me ensinou muito e faz parte da mulher que sou hoje.

Ao meu irmão, Renan, por ser minha metade de corpo, alma e coração, e principalmente, a certeza de que nunca estarei sozinha. E ao Pedro Henrique, meu irmão, príncipe da minha vida, que chegou para termos ainda mais certeza de que nosso pai nunca nos deixaria sozinhos.

Ao meu namorado, Jeferson, que em mais de 16 anos nunca mediu esforços para me fazer feliz e estar ao meu lado. Obrigada pelo amor incondicional, por tudo que vivemos e “vai por mim, igual nós dois não tem”. A Madonna é nosso maior amor e a família que estamos construindo me ajuda a nunca desistir.

A minha amiga Maiyara Prete, pois o doutorado sem ela não seria possível. Foi a força extra quando as minhas faltavam. Partilhamos muito conhecimento, muitas dúvidas e frustrações, muitas risadas e choros. Obrigada por dividir a bancada, a caneta, o lanche e a vida comigo.

Aos colegas e amigos do grupo LADEMA. Aos que passaram (muitos são amigos para vida toda – Jhessica, Tainara, Fábio Cajamarca, Alexandra, Juliana Casarin, entre tantos outros), aos que ficaram e aos que chegaram. Com vocês passei a maior parte dos meus dias. Todos de alguma fazem parte desse trabalho e da jornada trilhada até aqui. Em especial a Milena Prado (grande presente do doutorado), Felipe Gorla e Luciane Effting,

Aos colegas e amigos de laboratório dos grupos LAEEM e GMPC, que se fosse citar todos, levaria muitas linhas e correria o risco de esquecer de alguém. Levo todos e tudo que vivemos no coração. A caminhada da pós-graduação é muito difícil, mas compartilhar muito mais que a bancada de trabalho com vocês, deixou (de alguma forma) a trajetória mais leve.

Aos tantos amigos que fiz em Londrina e tornaram a trajetória mais divertida e prazerosa. Londrina é minha cidade do coração.

A minha família e meus amigos que ficaram no meu interior amado, Osvaldo Cruz-SP, obrigada por acreditarem em mim, perdoarem a minha ausência e me mostrarem que lar é onde nosso coração esta.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Essa é uma trajetória por vezes muito solitária. Na maior parte do tempo, é apenas você com seus medos, dúvidas, anseios, frustrações, conhecimento...e um computador. Mas o que realmente importa, são os bons momentos compartilhados com quem amamos e admiramos e, por isso, tenho tanto a agradecer.

E por último, mas propositalmente, A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por ter me dado forças, me amparado, me abençoado, protegido e guiado em todos os momentos. “És o meu alívio, a força e o ânimo que eu necessito para prosseguir. Se eu não desisti, o motivo, é porque sempre estive aqui, nos piores momentos dizendo que nunca desiste de mim...”. Sem a fé no amor Deles, não teria superado todas as dificuldades para chegar até aqui, e se cheguei, foi porque em muitos momentos fui carregada nos braços Deles. E mais, obrigada Senhor, por me cercar de tantas pessoas incríveis ao longo da vida.

“...este trabalho é a soma de vocês.
E se ele não é melhor,
É por falta de memória,
Mas não por falta de amigos...”
OBRIGADA!

ROCHA, Luana Rianne. **Síntese de polímero molecularmente impresso para pré-concentração e determinação de tetraciclinas em amostras de leite empregando sistema BIA com detecção amperométrica.** 2023. 189 f. Tese de Doutorado. (Pós-Graduação em Química). Doutorado em Química da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A tetraciclina (TC), um antibiótico de amplo espectro utilizados para o tratamento de infecções bacterianas em humanos e animais, bem como agente promotor de crescimento em animais, têm sido considerado um poluente emergente devido à presença de seus resíduos nos alimentos e no meio ambiente, podendo causar disfunções endócrinas, reprodutivas e metabólicas, além de resistência bacteriana em seres humanos. Devido à baixa concentração e complexidade das matrizes, se faz necessária uma etapa de preparação da amostra. Nesse sentido, a extração em fase sólida por impressão molecular (MISPE) se torna atraente devido à adsorção seletiva do o analito alvo pelo polímero, que permite a pré-concentração do analito e limpeza da matriz da amostra. Assim, no presente trabalho, foi desenvolvido um método analítico baseado na pré-concentração *off-line* de TC usando um polímero molecularmente impresso (MIP) e determinação amperométrica em sistema de análise de injeção em batelada (BIA) empregando um eletrodo impresso de carbono (SPCE) modificado com nanopartículas de ouro. Os parâmetros associados ao sistema BIA, bem como aqueles relacionados à modificação do sensor, foram otimizados para obter maior sinal analítico para TC. As variáveis do sistema BIA, como vazão e volume de injeção foram otimizados obtendo a melhor resposta com velocidade de $123,15 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$, enquanto o melhor desempenho do sensor foi obtido aplicando potencial de $1,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$ e usando $4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$ na modificação do eletrodo. Sob condições otimizadas de BIA e eletroanalítica, a determinação de TC foi realizada obtendo-se um limite de detecção de $3,53 \mu\text{mol L}^{-1}$. Com o objetivo de obter menores limites de detecção, bem como melhorar a seletividade do método desenvolvido, um novo polímero molecularmente impresso para TC foi sintetizado usando um método de síntese semi-covalente baseado em uma ligação específica termicamente reversível. Nesta síntese, o complexo molde-monômero foi sintetizado pela reação de isocianato de 3-isopropenil- α,α -dimetilbenzil com TC, onde a TC foi ligada a um grupo vinílico polimerizável por meio de uma ligação uretano termicamente reversível. A remoção da TC por uma simples reação térmica produziu sítios específicos de reconhecimento de tetraciclina na superfície do polímero. O polímero não impresso (NIP) foi sintetizado da mesma forma, sem a presença do molde. Os polímeros foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, adsorção/dessorção de nitrogênio, microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica e ponto de carga zero. Com base nos coeficientes de seletividade relativa (k'), o MIP apresentou maior seletividade para TC e alguns compostos estruturalmente semelhante pertencentes a família das tetraciclinas em relação ao NIP, mesmo tendo uma área específica menor ($183,21 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) que o NIP ($206,12 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), indicando que a maior capacidade de adsorção de TC pelo MIP se dá pela impressão química. Estudos de seletividade mostraram que o MIP tem maior seletividade para TC e compostos da família das tetraciclinas (oxitetraciclina e clorotetraciclina), quando comparado em relação ao NIP. Com base nos resultados obtidos no estudo de cinética

de adsorção, a porcentagem de remoção aumentou com o tempo, atingindo o equilíbrio de religação em 15 min para ambos os polímeros. Além disso, isotermas de adsorção mostraram capacidade de religação de TC de 76,74 mg g⁻¹ e 38,19 mg g⁻¹ para MIP e NIP, respectivamente. Após a etapa de caracterização, o polímero foi empregado no método MISPE com posterior detecção amperométrica em sistema BIA. O método apresentou faixa linear de 0,011 a 0,300 μmol L⁻¹, limite de detecção e quantificação de 0,003 e 0,011 μmol L⁻¹, respectivamente, e fator de pré-concentração de 214,8 vezes. A precisão intra-dia (n=6) e inter-dia (n=2) do método foi avaliada em termos de repetibilidade para as concentrações 0,03 e 0,10 μmol L⁻¹, obtendo-se desvios padrões relativos entre 1,71 e 3,78% para precisão intra-dia e, 2,81 a 4,38 para a inter-dia. A aplicabilidade do método foi demonstrada realizando análise de tetraciclina, bem como de oxitetraciclina e clorotetraciclina, em diferentes amostra de leite UHT e “*in-natura*”, com recuperações variando de 93 à 102%.

Palavras-chave: tetraciclina, extração em fase sólida, MISPE, BIA, síntese semi-covalente, detecção amperométrica.

ROCHA, Luana Rianne. **Synthesis of a molecularly imprinted polymer for preconcentration and determination of tetracyclines in milk samples with amperometric detection in a BIA system.** 2023. 189 f. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Química). Doutorado em Química da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Tetracycline (TC), a broad-spectrum antibiotics used for the treatment of bacterial infections in both humans and animals, as well as growth promotion agent in animals, has been considered emerging pollutant due to the presence of its residues in foodstuff and environment, which may can cause endocrine, reproductive, and metabolic dysfunction in addition to bacterial resistance in human beings. Due to the low concentration of antibiotic and the complexity of matrices, its mandatory to carry out a sample preparation of sample. In this sense, the molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) due to the selective adsorption of polymer for the target analyte, which allows the preconcentration of the analyte and clean-up of sample matrix. Thus, in the present work, an analytical method was developed based on the off-line preconcentration of TC using a molecularly imprinted polymer and amperometric determination in batch injection analysis system (BIA) using a modified screen-printed carbon electrode (SPCE) with gold nanoparticles. The parameters associated to the BIA system as well as those related to the modification of the screen-printed sensor were optimized in order to obtain a higher analytical signal for TC. The variables of BIA system, such as speed and injection volume were also optimized, obtaining the better response with speed of $123.15 \mu\text{L s}^{-1}$ and $200 \mu\text{L}$ injection volume, while the best sensor performance was obtained by applying a potential of 1.2 V vs Ag/AgCl and using $4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$ on the electrode modification. Under optimized BIA and electrochemical conditions, the determination of TC was performed yielding a detection limit of $3.53 \mu\text{mol L}^{-1}$. Aiming to obtain lower detection limits, as well as improve the selectivity of the developed method, a new tetracycline-imprinted polymer was synthesized using a semicovalent method based on a specific thermally reversible bond. In this synthesis, the template-monomer complex was synthesized by the reaction of 3-isopropenyl- α, α -dimethylbenzyl isocyanate with TC, where the template was bonded to a polymerizable vinyl group via a thermally reversible urethane bond. The removal of the template by a simple thermal reaction produced specific tetracycline recognition sites on the polymer surface. The non-imprinted polymer (NIP) was synthesized the same way, without the presence of the template. The polymers were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, nitrogen adsorption/desorption, scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis and determination of pointzero charge. Based on the relative selectivity coefficients (k'), the MIP showed higher selectivity towards TC and some structurally similar compounds belonging to the tetracyclines family (oxytetracycline and chlorotetracycline) in relation to NIP, even having a smaller specific area ($183.21 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) than the NIP ($206.12 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), indicating that the greatest adsorption capacity of TC by MIP is due to imprinted effect created during synthesis. Selectivity studies showed that MIP has greater selectivity for TC and compounds of the tetracycline's family, when compared to NIP. Based on the obtained results in adsorption kinetics study, the percent removal increased with time, reaching rebinding equilibrium in 15 min for both polymers. Moreover, adsorption isotherms showed TC-rebinding capacity of 76.74 mg g^{-1} and 38.19 mg g^{-1} for IPDMBI-MIP and IPDMBI-NIP,

respectively. Upon characterization step, the polymer was used in the MISPE method with subsequent amperometric detection in BIA system. The method analytical features provided an analytical curve ranging from 0.011 to 0.300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, limit of detection and quantification of 0.003 and 0.011 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, and preconcentration factor of 214.8-fold. The intraday (n=6) and interday (n=2) precision were evaluated in terms of repeatability for concentration of 0.03 and 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtaining relative standard deviations between 1.71 to 3.78% for intraday precision and 2.81 to 4.38% for interday precision. The applicability of the method was demonstrated by performing analysis of tetracycline and other compounds of the family, such as oxytetracycline and chlorotetracycline, in different milk samples, with recoveries varying from 93 to 102%.

Key words: Tetracycline, solid-phase extraction, MISPE, BIA, semi covalent approach, amperometric detection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática para as vias de entrada e saída dos resíduos de fármacos no ambiente.	36
Figura 2. Estrutura química geral para os antibióticos tetraciclínicos e seus pKas.	37
Figura 3. Estrutura química da 6-dioxi-6-dimetiltetraciclina.	38
Figura 4. Representação esquemática das etapas empregadas na extração em fase sólida (SPE).	49
Figura 5. Representação esquemática do processo de síntese de um MIP.	51
Figura 6. Diagrama esquemático da primeira célula BIA proposta por Wang e Taha em 1991, sendo (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo auxiliar, (C) eletrodo de referência, (D) ponteira da micropipeta, (E) orifício para introdução do eletrólito suporte, (F) barra magnética e (G) ponto de drenagem.	69
Figura 7. Representação esquemática do processo de injeção e aquisição do sinal analítico no sistema BIA.	70
Figura 8. Imagem de um eletrodo impresso de carbono com a descrição de seus componentes.	75
Figura 9. Representação esquemática do sistema eletroquímico utilizado nas medidas voltamétricas estacionárias.	76
Figura 10. (A) Fotos dos componentes e (B) representação esquemática do sistema BIA empregado nesta tese.	77
Figura 11. (A) Esquema representativo da síntese e (B) Proposta de reação para formação do complexo TC-IPDMBI.	80
Figura 12. (A) Representação esquemática do processo de síntese e (B) estrutura do polímero IPDMBA-MIP.	81
Figura 13. Representação do sistema de pré-concentração off-line para tetraciclina com posterior detecção no sistema BIA-AD.	93
Figura 14. Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo impresso de carbono não modificado na presença de diferentes concentrações de tetraciclina. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 2,50) e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	99
Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo impresso de carbono modificado com AuNPs (AuNPs/SPCE) na presença de diferentes concentrações de tetraciclina. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 2,50) e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	100

Figura 16. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos AuNPs/SPCE preparados pela eletrodeposição de AuNPs a partir de diferentes concentrações de HAuCl_4 . Condições experimentais: eletrólito suporte KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . 100

Figura 17. Amperogramas para diferentes concentrações de HAuCl_4 usados na eletrodeposição das AuNPs. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), vazão de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. 102

Figura 18. Diagrama de Nyquist observado para espectros de impedância eletroquímica nos eletrodos SPCE e AuNPs/SPCE em solução de $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Insert: circuito equivalente de Randles usado para ajuste dos dados experimentais. 103

Figura 19. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE em diferentes velocidade de varredura em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) relação linear entre I_p versus $u^{1/2}$. 105

Figura 20. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o AuNPs/SPCE em diferentes velocidade de varredura em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) relação linear entre I_p versus $u^{1/2}$. 105

Figura 21. Voltamogramas cíclicos empregando AuNPs/SPCE em solução de TC $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) diferentes valores de pH e (B) Dependência do pH com o potencial de pico anódico. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e empregado $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HAuCl_4 na eletrodeposição das AuNPs. 106

Figura 22. Mecanismo de oxidação eletroquímica para TC em (A) uma etapa ou (B) duas etapas. 109

Figura 23. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC em função de potenciais aplicados no sistema BIA usando AuNPs/SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. 111

Figura 24. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC em função da velocidade de injeção utilizadas no sistema BIA usando AuNPs/SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5) e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. 113

Figura 25. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC em função do volume de injeção utilizadas no sistema BIA usando AuNPs/SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5) e velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$. 114

Figura 26. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) em relação a seis eletrodos estudados. Condições experimentais: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC, eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de $1,2 \text{ V}$, velocidade de injeção de $123 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$. 115

Figura 27. Corrente anódica para injeções de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC empregando AuNPs/SPCE em relação ao número de injeções. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato

0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123 µL s⁻¹ e volume de injeção de 200 µL. 115

Figura 28. (A) Amperogramas para concentrações crescentes de TC, de 5 a 3000 µmol L⁻¹, e (B) Curva analítica para TC. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123 µL s⁻¹ e volume de injeção de 200 µL. 117

Figura 29. Espectros de FT-IR para TC, IPDMBI e TC-IPDMBI. 119

Figura 30. Fórmula estrutural para a tetraciclina e seus respectivos pKas. 121

Figura 31. Espectros de FT-IR para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. 123

Figura 32. Isotermas de adsorção-dessorção de gás nitrogênio para (A) TC-IPDMBI-MIP, (B) IPDMBA-MIP e (C) IPDMBI-NIP. 124

Figura 33. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com ampliações de 200, 3000, 15000, 30000 e 50000 vezes para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBI-NIP. 126

Figura 34. Curvas termogravimétricas TG (esquerda) e derivada DTG (direita) dos polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBI-NIP. Condições experimentais: vazão de N₂ a 20 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ a 900 °C. 128

Figura 35. Determinação do pH_{PCZ} para (A) IPDMBA-MIP e (B) IPDMBA-NIP em KCl 0,1 mol L⁻¹. Os pontos correspondem a média das replicatas (n=3) com seus respectivos desvios padrão (±DP). 131

Figura 36. (A) Distribuição das espécies da TC em função do pH. (B) Estrutura química da TC e (C) Estrutura química das espécies iônicas da TC associadas aos valores de pKa... 132

Figura 37. Efeito do pH e possíveis mecanismos de adsorção da tetraciclina usando os polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. Condições: 10 mg de material, 5 mL de TC 100 µmol L⁻¹, 2 minutos agitação. Leitura do sobrenadante no sistema BIA-AD: 200 µL amostra, 123 µL s⁻¹, 1,2 V, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5). Os pontos correspondem a média das replicatas (n=3) com seus respectivos desvios padrão (±DP). 134

Figura 38. Efeito do pH em meio tamponado (tampão BR 0,01 mol L⁻¹) na sorção de tetraciclina usando os polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. Condições: 10 mg de material, 5 mL de TCs 50 µmol L⁻¹, 2 minutos agitação. Leitura do sobrenadante no sistema BIA-AD: 200 µL amostra, 123 µL s⁻¹, 1,2 V, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5). Os pontos correspondem a média das replicatas (n=3) com seus respectivos desvios padrão (±DP). 138

Figura 39. Estrutura química das moléculas (A) oxitetraciclina (OTC), (B) clorotetraciclina (CTC), (C) paracetamol (PAR), (D) sulfadiazina (SDZ) e (E) sulfametazina (SMZ). 139

Figura 40. Parâmetro relacionado ao efeito de impressão (K_d), na adsorção binária para os sistemas (A) TC/PAR, (B) TC/SDZ, (C) TC/SMZ, (D) TC/OTC e (E) TC/CTC. Condições

experimentais: 10,0 mg de cada polímero, concentração de 1,0 mg L⁻¹ e agitação por 15 minutos..... 141

Figura 41. Percentagem de incremento na seletividade, relacionado ao efeito de impressão (k'), na adsorção binária dos sistemas TC/PAR, TC/SDZ, TC/SMZ, TC/OTC e TC/CTC. Condições experimentais: 10,0 mg de cada polímero, concentração de 1,0 mg L⁻¹ e agitação por 15 minutos. 142

Figura 42. Estudo da influência do tempo de contato da TC com os polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. 143

Figura 43. Modelos de cinéticos de adsorção (A) pseudo-primeira ordem e (B) pseudo-segunda ordem para IPDMBA-MIP e, (C) pseudo-primeira ordem e (D) pseudo-segunda ordem para IPDMBA-NIP. 146

Figura 44. Modelos de cinéticos de Elovich para IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. 147

Figura 45. Modelos de cinéticos de Difusão Intrapartícula para (A) IPDMBA-MIP e (B) IPDMBA-NIP. 148

Figura 46. Isotermas de adsorção de TC nos polímeros (A) IPDMBA-MIP e (B) IPDMBA-NIP e ajuste aos dados empregando os modelos não lineares de Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich para 1 e 2 sítios..... 149

Figura 47. Efeito da adsorção de TC em função da massa de adsorvente IPDMBA-MIP. Condições experimentais: foram percolados 20 mL de uma solução de 250 µmol L⁻¹ e o efluente foi analisado no sistema BIA-AD. 154

Figura 48. Percentagem de eluição de TC em função dos eluentes estudados..... 155

Figura 49. Efeito da vazão da mistura MeOH com HAc 0,5% na percentagem de eluição da TC. Volume da mistura utilizada: 5,0 mL..... 156

Figura 50. Efeito do volume da mistura MeOH com HAc 0,5% na percentagem de eluição da TC. Vazão utilizada: 2,0 mL min⁻¹..... 157

Figura 51. Efeito da vazão de pré-concentração na percentagem de adsorção de TC no IPDMBA-MIP. Condições experimentais: 20 mL de solução de 250 µmol L⁻¹ (pH 5,0) e eluição com 3,0 mL de MeOH com HAc 0,5%. 158

Figura 52. Amperogramas para pré-concentrações crescentes de TC, de 0,01 a 1,0 µmol L⁻¹ no cartucho IPDMBA-MIP, e (B) Curva analítica para etapa de pré-concentração de TC no cartucho IPDMBA-MIP. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 µL s⁻¹ e volume de injeção de 200 µL; 100 mg do IPDMA-MIP, 50 mL de solução de TC (pH 5,0), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min⁻¹, solução em pH 5,0 sem tampão e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5). 159

Figura 53. Curva analítica com etapa de pré-concentração de TC no cartucho IPDMBA-MIP incluindo o LQ como primeiro ponto. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 µL s⁻¹

¹ e volume de injeção de 200 μL ; 100 mg do IPDMA-MIP, 50 mL de solução de TC (pH 5,0), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min^{-1} , solução em pH 5,0 sem tampão e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). 162

Figura 54. Amperograma para injeção de diferentes amostras de leite submetidas ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. As amostras foram enriquecidas com 0,13 e 0,89 mg L^{-1} de TC. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 200 μL ; 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de 15,0 mL min^{-1} e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). 170

Figura 55. Cromatogramas das amostras de leites (A) M-1 Int. (B) M-2 Int., (C) M-1 Des. e (D) M-3 Z.L., submetidas ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. As amostras foram enriquecidas com 0,13 e 0,89 mg L^{-1} de TC. Condições experimentais: 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 (sem tampão), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min^{-1} e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). 170

Figura 56. Amperograma para injeção de diferentes amostras de leite submetidas ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. As amostras foram enriquecidas com (A) 0,13 mg L^{-1} e (B) 0,89 mg L^{-1} de cada tetraciclina. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 200 μL ; 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de 15,0 mL min^{-1} e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). 172

Figura 57. Cromatogramas das amostras de leites (A) leite integral Líder, (B) leite integral Batavo, (C) leite desnatado Líder, (D) leite zero lactose Parmalat e (E) leite "in-natura" saudável, submetidas ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. As amostras foram enriquecidas com 0,13 e 0,89 mg L^{-1} de cada tetraciclina. Condições experimentais: 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 (sem tampão), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min^{-1} e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). 173

Figura 58. Amperograma para injeção de padrões de oxitetraciclina, tetraciclina e clorotetraciclina, sem a etapa de pré-concentração, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 200 μL . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). 176

Figura 59. Amperograma para injeção de uma mistura ternária de padrões de tetraciclinas - oxitetraciclina, tetraciclina e clorotetraciclina – pré-concentrados nas concentrações de 0,13 e 0,89 mg L^{-1} de cada uma das TCs. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 200 μL . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). 176

Figura 60. Amperograma para injeção de amostra de leite “in-natura” não-saudável submetida ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de $123,2 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \text{ } \mu\text{L}$; 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de $15,0 \text{ mL min}^{-1}$ e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5). 177

Figura 61. Cromatogramas para amostra de “in-natura” não saudável, submetida ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. Condições experimentais: 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de $15,0 \text{ mL min}^{-1}$ e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5). .. 177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura e propriedades químicas para os principais antimicrobianos da classe das Tetraciclinas.	39
Tabela 2. Características texturais como área superficial específica, volume total e diâmetro de poros para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.	124
Tabela 3. Determinação da porcentagem molar de IPDMBA e EGDMA nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP a partir da análise elementar.....	130
Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para adsorção de TC nos polímeros IPDMBI-MIP e IPDMBI-NIP aplicando os modelos não-lineares de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, e os modelos lineares de Elovich e Difusão Intrapartícula. Dados: $Q_{e(\text{experimental})}$: 30,19 mg g ⁻¹ e 27,09 mg g ⁻¹ para IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP, respectivamente.	145
Tabela 5. Parâmetros calculados para os modelos não lineares de Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich para 1 e 2 sítios aplicados aos dados experimentais no estudo de isoterma de adsorção da TC nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.	151
Tabela 6. Comparação da capacidade adsorptiva de polímeros molecularmente impressos utilizados para adsorção de TCs descritos na literatura.	152
Tabela 7. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no método proposto com outros de métodos analíticos presentes na literatura para determinação de tetraciclina em diferentes tipos de amostras.	164
Tabela 8. Aplicação do método proposto em diferentes tipos e marcas de leite bovino empregando o IPDMBA-MIP no sistema BIA-AD e no método de referência, HPLC, para análise de tetraciclina (TC). Os dados correspondem a média de n=3.....	169
Tabela 9. Aplicação do método de pré-concentração MISPE empregando IPDMBA-MIP para análise multi-resíduo dos antibióticos tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) em amostras de leite pelo (A) método desenvolvido (BIA-AD) e (B) pelo método de referência (HPLC). Os dados correspondem a média de n=3.....	175
Tabela 10. Aplicação do método de pré-concentração MISPE empregando IPDMBA-MIP para análise de amostra de leite “in-natura” não saudável pelo método desenvolvido (BIA-AD) e pelo método de referência (HPLC). Os dados correspondem a média de n=3.	178

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Polímeros molecularmente impressos reportados na literatura para a adsorção de TCs em diferentes amostras. 53

Quadro 2. Valor nutricional (1 copo – 200 mL) e valor do pH de diferentes tipos de leite bovino (integral, desnatado, zero-lactose e “in-natura”). 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AIBN	2,2'-azo-bis-isobutironitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos
AR	Agente de Reticulação
BIA	Análise de Injeção em Batelada
BIA-AD	Análise de Injeção em Batelada com Detecção Amperométrica
BR	Britton-Robinson
CE	Contra Eletrodo
CTC	Clorotetraciclina
CV	Voltametria Cíclica
DC	Doxitetraciclina
DDD	Doses Diárias Definidas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTG	Derivada Termogravimétrica
EGDMA	Etileno Glicol Dimetacrilato
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
Epa	Potencial de pico anódico
ER	Eletrodo de Referência
ESI	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ET	Eletrodo de Trabalho
EtOH	Etanol
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
HAc	Ácido Acético

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Ipa	Corrente de pico anódico
IPDMBI	Isocianato de 3-isopropenil- α,α -dimetilbenzil
IPDMBI-MIP	Polímero Molecularmente Impresso de (Isocianato de 3-isopropenil- α,α -dimetilbenzil)
IPDMBI-NIP	Polímero Não Impresso de (Isocianato de 3-isopropenil- α,α -dimetilbenzil)
IR	Iniciador Radicalar
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Monômero Funcional
MIP	Polímero Molecularmente Impresso
MISPE	Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa
MIT	Tecnologia de Impressão Molecular
MM	Molécula Molde
NIP	Polímero Não Impresso
OTC	Oxitetraciclina
PCZ	Ponto de Carga Zero
pH	Potencial Hidrogeniônico
SP	Solvente Porogênico
SPCE	Eletrodo Impresso de Carbono
SPE	Extração em Fase Sólida
TC	Tetraciclina
TCs	Tetraciclinas
TGA	Análise Termogravimétrica
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1	ANTIBIÓTICOS COMO MICROCONTAMINANTES NO MEIO AMBIENTE.....	34
2.2	TETRACICLINAS.....	36
2.3	OS POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA TETRACICLINAS.....	50
2.4	ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA - BIA.....	68
3	OBJETIVO	73
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
4	PARTE EXPERIMENTAL	74
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	74
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	75
4.3	MODIFICAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO COM AS NANOPARTÍCULAS DE OURO, CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA BIA.....	78
4.4	SÍNTESE DO MIP E NIP.....	79
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL.....	82
4.5.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	82
4.5.2	Análise textural por Fisissorção de Gás N ₂ a 77 K.....	83
4.5.3	Análise Morfológica.....	83
4.5.4	Análise Térmica.....	84
4.5.5	Análise Elementar.....	84
4.6	EFEITO DO PH NA ADSORÇÃO DE TETRACICLINA.....	84
4.7	PONTO DE CARGA ZERO (PCZ).....	85
4.8	CINÉTICA DE ADSORÇÃO DA TETRACICLINA.....	85
4.9	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DA TETRACICLINA.....	88
4.10	ESTUDO DO EFEITO DE IMPRESSÃO QUÍMICA.....	91
4.11	SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TC.....	92
4.11.1	Estudo da Massa do Adsorvente IPDMBA-MIP na Adsorção de Tetraciclina.....	93
4.11.2	Estudo do Solvente de Eluição.....	93
4.11.3	Estudo da Vazão e Volume do Solvente de Eluição.....	94
4.11.4	Estudo da Vazão na pré-Concentração de Tetraciclina.....	94
4.12	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO.....	94
4.13	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE LEITE.....	95

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	98
5.1	AVALIAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM AUNPs/SPCE PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA.....	98
5.1.1	Influência da modificação do eletrodo impresso de carbono no comportamento eletroquímico da tetraciclina	98
5.1.2	Efeito do pH na eletrooxidação da tetraciclina empregando AuNPs/SPCE 105	
5.1.3	Estudo do potencial de eletrooxidação da tetraciclina empregando AuNPs/SPCE no sistema BIA-AD.....	111
5.1.4	Estudo dos parâmetros do sistema BIA-AD (volume e velocidade de injeção) para determinação de tetraciclina empregando AuNPs/SPCE.....	112
5.1.5	Estudo da reprodutibilidade do preparo do sensor AuNPs/SPCE e sua estabilidade e repetibilidade	114
5.1.6	Desempenho Analítico do Sensor AuNPs/SPCE na Determinação de Tetraciclina	116
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO TC-IPDMBI E DOS POLÍMEROS, IPDMBA-MIP E IPDMBA-NIP	119
5.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho.....	119
5.2.2	Análise Textural por Fisissorção de Gás Nitrogênio a 77 K.....	123
5.2.3	Análise Morfológica.....	125
5.2.4	Análise Térmica	127
5.2.5	Análise Elementar CHN.....	128
5.3	PONTO DE CARGA ZERO (PCZ) E EFEITO DO PH NA ADSORÇÃO DE TETRACICLINA	130
5.4	ESTUDO DO EFEITO DE IMPRESSÃO	138
5.5	CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE TETRACICLINA NOS POLÍMEROS IPDMBA-MIP E IPDMBA-NIP	142
5.6	ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE TETRACICLINA NOS POLÍMEROS IPDMBA-MIP E IPDMBA-NIP	148
5.7	OTIMIZAÇÃO DO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MISPE) PARA EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE TETRACICLINA.....	152
5.7.1	Estudo da Massa do Adsorvente IPDMBA-MIP na Pré-Concentração de Tetraciclina	152
5.7.2	Estudo do Solvente de Eluição na Pré-Concentração de Tetraciclina ..	154
5.7.3	Estudo da Vazão e Volume do Solvente de Eluição.....	155
5.7.4	Estudo da Vazão de Pré-Concentração de Tetraciclina	157
5.8	DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO MISPE	158
5.9	APLICAÇÃO DO MÉTODO MISPE-BIA-AD EM AMOSTRAS DE LEITE.....	168
6	CONCLUSÕES	180
7	REFERÊNCIAS	182

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos, devido às suas ações antimicrobianas eficazes e poucos efeitos colaterais adversos, são cada vez mais utilizados em medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas em humanos e animais, bem como promotor de crescimento na pecuária (CALIXTO; CERVINI; CAVALHEIRO, 2012; GUO et al., 2019; MUNTEANU et al., 2018). Estima-se que o consumo de antibióticos seja de 1 a 2225 toneladas por ano em todo o mundo. No Brasil, o consumo de antibióticos é de aproximadamente 22,75 Doses Diárias Definidas (DDD) por cada 1000 habitantes por ano (WHO, 2018). As tetraciclinas (TCs), incluindo tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), clorotetraciclina (CTC) e doxiciclina (DC), estão entre os antibióticos mais consumidos no mundo (EMA, 2019; FDA, 2019). Devido ao baixo custo e ampla atividade antimicrobiana contra doenças agudas causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, as TCs são comumente empregadas na prevenção e tratamento de várias doenças infecciosas na medicina humana e veterinária, além de ser bastante utilizada também na pecuária como aditivo alimentar para a promoção do crescimento animal (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

Devido à baixa absorção pelo sistema digestivo por humanos e animais, o uso excessivo e irracional de TCs pode deixar seus resíduos em alimentos de origem animal e no meio ambiente por excreção das substâncias pela urina e fezes, bem como pela descarga direta de produtos agrícolas e farmacêuticos, gerando riscos ao meio ambiente e à saúde humana e animal, pois pode levar ao desenvolvimento de bactérias resistentes à esses antibióticos, bem como à toxicidade crônica e aguda (ANTÓN-HERRERO et al., 2018; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020; PRIYA; RADHA, 2017). Para reduzir o risco do uso excessivo de TCs, órgãos de fiscalização mundiais como União Européia, *Codex Alimentarius*, *Food and Drug Administration* e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceram limites máximos de resíduos (LMR) para quantidade única ou total de TCs em alimentos de origem animal, por exemplo 300-600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para fígado de aves, bovinos e suínos; 200-400 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para ovos; 30-100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para leite (ANVISA, 2009, 2012, 2018; COMMISSION, 2015; EU, 2010;

MOREIRA et al., 2010). Portanto, é importante desenvolver métodos eficientes para determinação de resíduos de TCs em produtos alimentícios e amostras ambientais, dado que esses antibióticos podem ser considerados poluentes orgânicos emergentes altamente tóxicos, podendo causar disfunções endócrinas, reprodutivas e metabólicas, além da resistência bacteriana em humanos e animais.

Vários métodos analíticos, baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*, HPLC) - considerada a técnica oficial para análise de resíduos de TCs em produtos alimentícios pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)- atualmente estão disponíveis para a determinação de TCs. Os métodos analíticos são geralmente associados as etapas de pré-tratamento da amostra antes da análise instrumental devido à complexidade da matriz alimentar e ambiental, e a concentração relativamente baixa de TCs nessas amostras (ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$). Dentre os métodos de preparo de amostras, a extração em fase sólida (do inglês *solid-phase extraction*, SPE) é um dos mais utilizados devido à sua simplicidade, por possibilitar o uso de baixos volumes de solventes orgânicos, alta eficiência, alto fator de enriquecimento e fácil mecanização (ANDRADE-EIROA et al., 2016a; JARDIM, 2010).

Dentre os diversos materiais utilizados como adsorvente em SPE, os polímeros molecularmente impressos (do inglês *molecularly imprinted polymer*, MIP) têm sido amplamente empregados como adsorventes seletivos para a pré-concentração, detecção e separação de TCs, especialmente em matrizes complexas, devido a sua alta seletividade, baixo custo, fácil preparação e reutilização (FENG et al., 2016; MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021; NIU et al., 2016; WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2020). A síntese dos MIPs ocorre a partir da interação da molécula molde (MM) (*template*) com um monômero funcional (MF) via interações covalentes ou não covalentes, formando um complexo MM-MF. Posteriormente esse complexo é copolimerizado na presença de um agente de ligação cruzada no solvente porogênico, resultando em uma matriz polimérica altamente reticulada. A remoção da MM da matriz polimérica cria sítios de ligação específicos complementares a MM em tamanho, geometria e funcionalidades químicas (CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; ESTEBAN, 2019).

Nos últimos anos, vários MIPs têm sido empregados para a extração e pré-concentração de TCs de amostras alimentícias e ambientais. Cai e Gupta sintetizaram o primeiro MIP para TC reportado na literatura, utilizando ácido metacrílico como monômero funcional (CAI; GUPTA, 2004). Após este trabalho, muitos outros MIPs foram sintetizados por interação não covalente entre a molécula molde e o monômero funcional, usando preferencialmente o ácido metacrílico (MAA) (ABRÃO; MAIA; FIGUEIREDO, 2014; AGUILAR et al., 2020; FENG et al., 2016; PIZAN-AQUINO et al., 2020). Além disso, a síntese de MIPs para TC usando preferencialmente MAA, tem sido reportado na literatura em combinação com outros materiais para a impressão em superfícies suportes, como por exemplo as nanopartículas magnéticas (DAI et al., 2014a; GAO et al., 2020; LIAN et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2010), os *quantum dots* (KE; CHEN, 2020; YANG et al., 2018), ZnO (DU et al., 2020; ZHOU et al., 2016) e *metal-organic framework* (MOF) (MA et al., 2020; WANG et al., 2018).

Os MIPs também têm sido usados como modificadores de sensores eletroquímicos para a determinação voltamétrica de TC, a fim de conferir maior seletividade a esses sensores. Por possuírem propriedades não condutoras, os sensores eletroquímicos modificados com MIPs são associados com materiais que facilitem a transferência eletrônica como nanopartículas de platina suportadas em carbono para modificação de eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês, *glassy carbon electrode*) (KUSHIKAWA et al., 2016), nanopartículas de ouro (AuNPs) para modificação de eletrodo impresso de carbono (SPCE, do inglês *screen-printed carbon electrode*) (DEVKOTA et al., 2018), nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificados com AuNPs para modificar um GCE (MWCNTs-AuNPs) (WANG et al., 2011), grafeno para modificação de SPCE (FILIK et al., 2016) ou nanopartículas magnéticas para serem associadas com grafite em um eletrodo de pasta (ZEB et al., 2021). No entanto, embora esses sensores apresentem a cavidade impressa quimicamente e terem baixos limites de quantificação (na faixa de $\mu\text{mol L}^{-1}$), eles não têm alto poder de detecção para níveis de traços de TC em amostras de alimentos, como por exemplo para o leite cujo LMR permitido está na faixa de nmol L^{-1} .

Como citado anteriormente, até o presente momento, todos MIPs para TCs relatados na literatura foram sintetizados via interação não covalente entre a molécula molde e o monômero funcional. No entanto, sínteses via estratégia

semi-covalente não foram investigadas para polímeros impressos para TCs, o que poderia gerar vantagens ao polímero, especialmente no seu desempenho seletivo. Nesta estratégia de síntese, também conhecida como impressão semi-covalente com espaçador sacrificial, a molécula molde é ligado covalentemente ao monômero funcional. Após a clivagem térmica para remoção da molécula molde, será formado grupos funcionais residuais possibilitando a molécula molde a se religar ao polímero por meio de interações não-covalentes. Assim, a impressão semi-covalente é uma abordagem híbrida das estratégias de síntese para impressão molecular, no qual a impressão é covalente, enquanto a religação é de natureza não covalente (GRAHAM; CARLSON; EDMISTON, 2002; PRETE et al., 2019; WANG et al., 2009; ZHAN et al., 2013).

A impressão semi-covalente tem sido empregada para a síntese de materiais impressos para moléculas relativamente grandes e com um número limitado de grupos funcionais como por exemplo compostos aromáticos policlorados (LUBKE; WHITCOMBE; VULFSON, 1998), colesterol (EFFTING et al., 2022; WHITCOMBE et al., 1995a), propazina (CACHO et al., 2006), estrona (KI et al., 2002; KI; CHANG, 2006; WANG et al., 2009), bisfenol A (GÜNEY; GÜNEY, 2017), fenóis (QI et al., 2010) e *Orange II* (ZHAN et al., 2013). Entretanto, o emprego desse tipo de síntese para moléculas polifuncionalizadas, como as TCs ainda não foram explorados. Uma vantagem no uso dessa estratégia de síntese para esse tipo de molécula está na formação do complexo entre a molécula molde e o monômero funcional, que mantém a estrutura da molécula fixa durante toda a polimerização e, assim, após sua remoção por clivagem térmica, forma sítios de ligação mais uniformes.

Com base no exposto, a síntese de MIP via impressão semi-covalente ainda é incipiente e não foram encontrados estudos que descrevam esse tipo de síntese tendo como molécula alvo a tetraciclina. Assim, um novo MIP para TC foi sintetizado por meio da abordagem semi-covalente através da ligação termicamente reversível entre TC (molécula molde) e isocianato de 3-isopropenil- α,α -dimetilbenzil (IPDMBI) (monômero funcional). O polímero sintetizado foi usado como adsorvente em extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para determinação de TC. A determinação eletroquímica de TC neste estudo foi realizada utilizando AuNPs eletrodepositadas sobre eletrodos impresso de carbono (SPCE). A associação

de SPE à base de coluna com detecção eletroquímica torna-se interessante para obter um método com maior sensibilidade e seletividade devido à etapa de pré-concentração e *clean up*. Ainda, outro aspecto importante a ser considerado da associação do SPE com a detecção eletroquímica, é o baixo volume de eluente utilizado.

Em face da identificação e caracterização do problema, foi desenvolvido nessa tese uma nova abordagem analítica para determinar TC usando um método MISPE *off-line* com IPDMBA-MIP acoplado à determinação amperométrica em um sistema de análise por injeção em batelada (BIA), denominado MISPE-BIA-AD, usando eletrodo impresso de carbono modificado com AuNPs, denominado AuNPs/SPCE. O método desenvolvido foi aplicado para determinação de TC e compostos da família das TCS em amostras de leite.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTIBIÓTICOS COMO MICROCONTAMINANTES NO MEIO AMBIENTE

Entre os diversos grupos de fármacos existente, o grupo dos antibióticos são um dos mais importantes e mais utilizados, podendo ser origem de natural ou sintético, sendo estes compostos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de microorganismos, especialmente as bactérias (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010; KÜMMERER, 2009).

Os primeiros antibióticos eram de origem natural. Em 1928, Alexander Fleming descobriu a atividade antimicrobiana da penicilina, sendo introduzida como agente terapêutico em meados dos anos 1940 (NICOLAOU; MONTAGNON, 2008; PROJAN; SHLAES, 2004). Após o processo de industrialização e em decorrência da Segunda Guerra Mundial, houve um rápido avanço nos estudos, descobertas e desenvolvimentos de novos antibióticos. Entre as décadas de 1940-1960, os antibióticos naturais descobertos eram eficazes para o tratamento de bactérias *gram-positivas* e, neste período, entre os antibióticos que circulavam no mercado, apenas isoniazida, trimetropima e metronidazol eram de origem sintética (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010).

Nas décadas seguintes, com os avanços da ciência e tecnologia, foram inseridos no mercado mais antibióticos de origem sintética, eficazes para o tratamento de bactérias *gram-positivas* e *gram-negativas*. Nos últimos anos, devido ao aumento da incidência de resistência bacteriana, poucos antibióticos têm sido introduzidos no mercado terapêutico (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010).

Os antibióticos são comumente usados na medicina humana e veterinária e como promotores de crescimento animal (CALIXTO; CERVINI; CAVALHEIRO, 2012; GUO et al., 2019). Isso ocorre devido a toxicidade seletiva, característica comum de todos os antibióticos, sendo capazes de inibir o metabolismo de organismos patógenos sem causar danos significativos no organismo do hospedeiro ou em microorganismos distintos do patógeno (MADIGAN et al., 2016).

Os antibióticos são muito utilizados também como promotores de crescimento na pecuária, fazendo com que ocorra um aumento da produção de

leite em vacas leiteiras, bem como o aumento no número de filhotes em suínos, por exemplo. Isso ocorre, pois, os antibióticos provocam uma modificação da flora intestinal do animal, fazendo com que ocorra uma diminuição das bactérias sensíveis ao antibiótico administrado, causando assim, uma diminuição do gasto energético com a fermentação microbiana e direcionando essa energia para o crescimento. Desse modo, a produção de toxinas pelas bactérias a partir de aminoácidos é atenuada, e estes ficam disponíveis para o desenvolvimento do animal, acarretando numa diminuição da parede intestinal que garante uma maior absorção de nutrientes (GONZALES; CARVALHO MELLO; CAFÉ, 2012; TORRES; DREHER; SIMIONI, 2015).

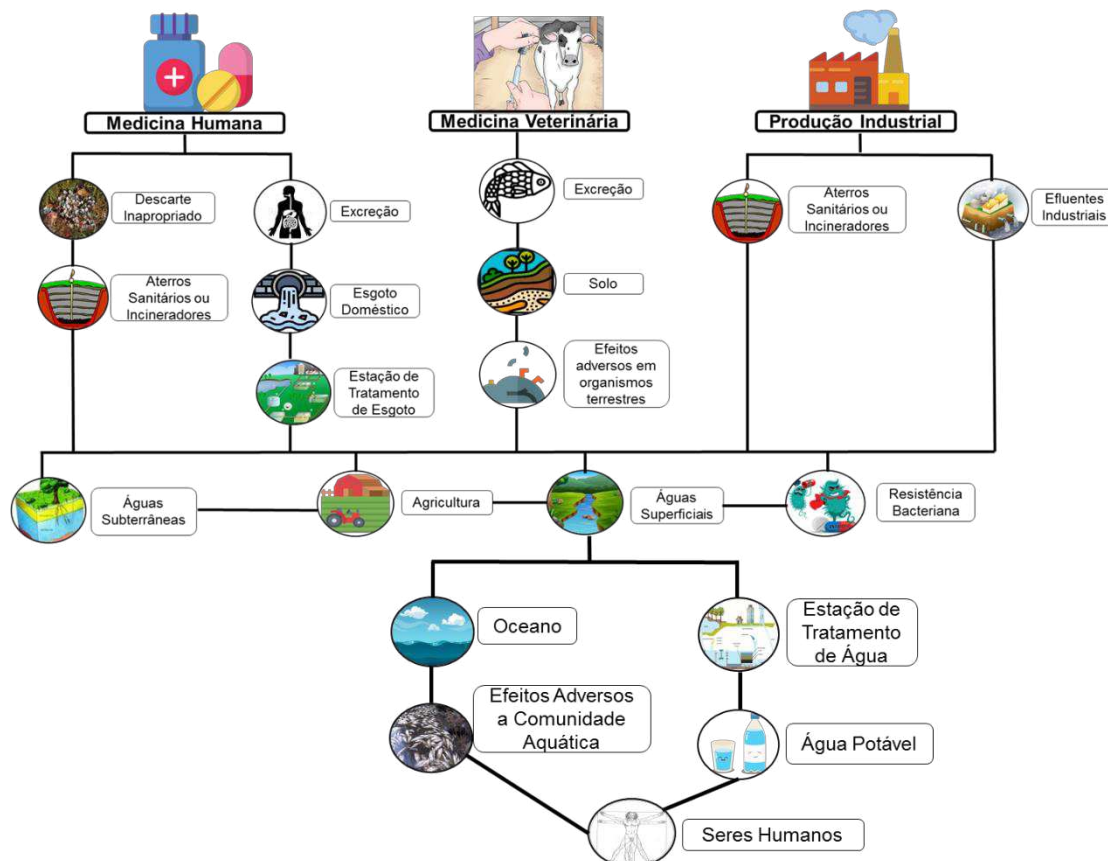
A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem avaliado o consumo de antibióticos ao redor do mundo, levando em conta o número de DDD por dia a cada 1000 habitantes. Em 2018, o órgão publicou seu estudo, onde foram avaliados 65 países, incluindo o Brasil, e foi estimado que o consumo de antibióticos variou de 4,4 a 64,4 DDD por dia a cada 1000 habitantes. Ou seja, um consumo de 1 à 2225 toneladas por ano (WHO, 2018). Segundo esse mesmo estudo, em 2016 a população brasileira consumiu 22,75 DDD de antibióticos por dia a cada mil habitantes, colocando o Brasil na 19ª posição do *ranking* de consumo de antibióticos, além de ser o que mais consome entre os países das Américas (WHO, 2018).

Os antibióticos, seus metabólitos e produtos de degradação chegam ao meio ambiente através de várias vias, sendo o seu destino e comportamento no meio ambiente ainda pouco claro. Ao longo dos últimos anos, vários estudos têm relatado a presença de antibióticos em ecossistemas aquáticos, águas superficiais, águas subterrâneas, águas marítimas, água potável, efluentes, bem como em matrizes terrestres como solos, biossolos, alimentos de origem animal, entre outros (DANNER et al., 2019; GOTHWAL; SHASHIDHAR, 2015; GRENNI; ANCONA; BARRA CARACCILO, 2018). A Figura 1 mostra um esquema representativo das possíveis rotas de descarte de antibióticos no ambiente.

O uso indiscriminado de antibióticos tanto na medicina humana quanto na veterinária e pecuária levou ao um aumento da resistência bacteriana, promovendo a seleção de variantes genéticas que aumentam a ocorrência de agentes patogênicos resistentes aos antibióticos, o que conseqüentemente causa sérios danos de saúde pública, mesmo sendo encontrados em baixos

níveis de concentração (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) (DANNER et al., 2019; HOMEM; SANTOS, 2011; SAHOO et al., 2010).

Figura 1. Representação esquemática para as vias de entrada e saída dos resíduos de fármacos no ambiente.



Fonte: Adaptado de Quadra et al., 2018 (QUADRA et al., 2018).

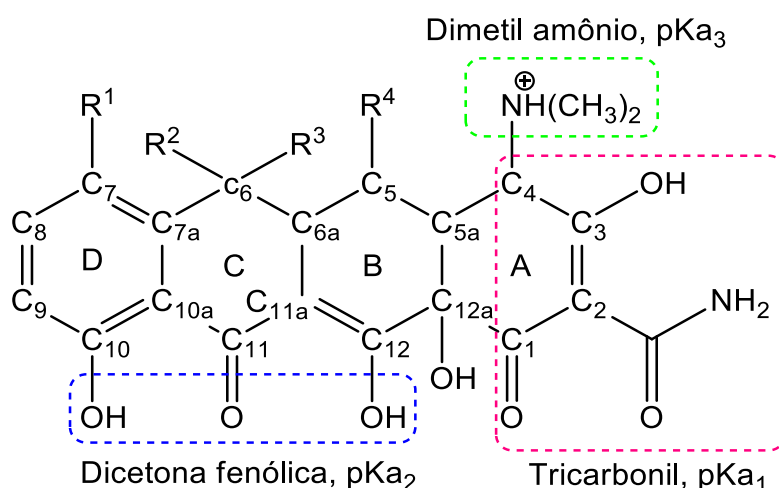
2.2 TETRACICLINAS

Os antibióticos tetraciclínicos compõem um grupo de antibióticos de origem natural, obtidos por fermentação de determinados fungos, ou de origem de semissintético, com uma ampla atividade bacteriostática, que exibem atividades contra infecções causadas por bactérias gram positivas e gram negativas (DAGHRIR; DROGUI, 2013). As primeiras tetraciclínas (TCs) descobertas foram a clorotetraciclina e a oxitetraciclina. Em 1948, a partir de culturas do *Streptomyces aureofaciens* deu origem a aureomicina (clorotetraciclina, CTC); em 1950, a terramicina (oxitetraciclina, OTC) foi descoberta a partir de culturas do *Streptomyces rimosus*; em 1953 a partir da desalogenação catalítica da clorotetraciclina foi obtida a estrutura básica da

tetraciclina (TC) (NELSON; HILLEN; GREENWALD, 2001). As TCs sintéticas, como a doxiciclina (DC), minociclina (MiC) e metaciclina (MC) são produzidas a partir da modificação dos radicais das moléculas de ocorrência natural (NELSON, 1998).

Estruturalmente, todas as TCs são caracterizadas por apresentarem uma estrutura química derivada de um hidronaftaceno, formando um núcleo tetracíclico linear com 4 anéis condensados denominados A, B, C, D, sendo que nestes anéis estão presentes grupos funcionais como grupo carboxilamida e vários outros grupos funcionais ionizáveis, um sistema tricarbonil, dicetona fenólica e dimetil amônio, sendo estes grupos funcionais responsáveis pelo seus pKas e pela carga aniônica, catiônica ou zeuteriônica (LORENZETTI et al., 2020; SÁNCHEZ-POLO et al., 2015), conforme mostra a Figura 2.

Figura 2. Estrutura química geral para os antibióticos tetraciclínicos e seus pKas.

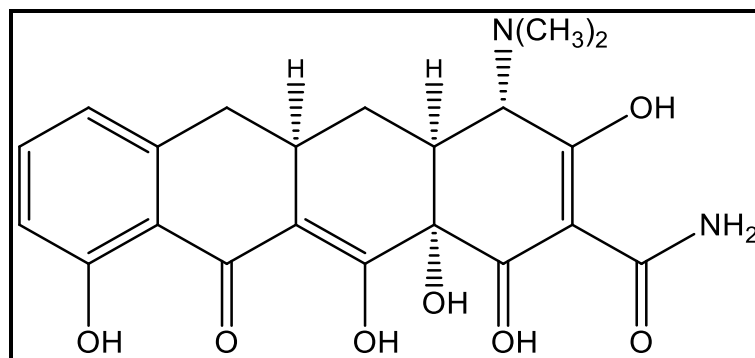


Fonte: Adaptado de (SÁNCHEZ-POLO et al., 2015; SANLI; SANLI; ALSANCAK, 2009).

A estrutura química e a presença de grupos funcionais estão diretamente relacionados com a ação biológica das TCs, uma vez que a presença destes grupos funcionais podem influenciar a permeabilidade da molécula pela membrana biológica, o que pode levar a absorção desses antibióticos pelas células bacterianas (ÖNAL, 2011). Em sua forma natural, a configuração do carbono C₄ (Figura 2) é fundamental para a atividade antimicrobiana, bem como a presença do grupo amida no carbono C₂, do sistema ceto-enólico nos carbonos C₁₀, C₁₁ e C₁₂ (Figura 2), além claro, do próprio núcleo tetraciclínico (CHOPRA; ROBERTS, 2001; PEREIRA-MAIA et al., 2010). A 6-dioxi-6-dimetiltetraciclina é

considerada como o farmacóforo mínimo por ser a tetraciclina com estrutura mais simples que exibe atividade antimicrobiana detectável, e sua estrutura é apresentada na Figura 3 (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

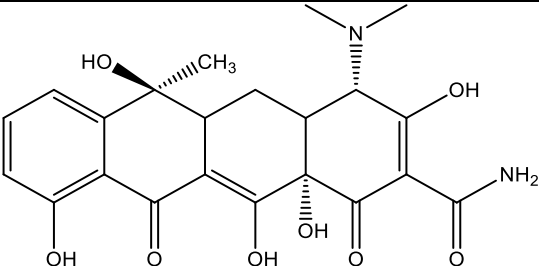
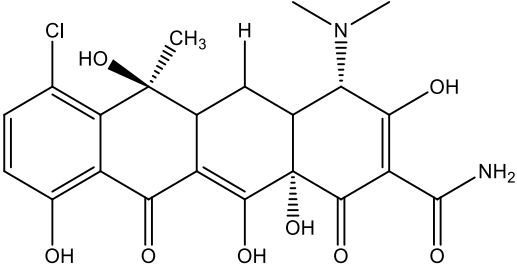
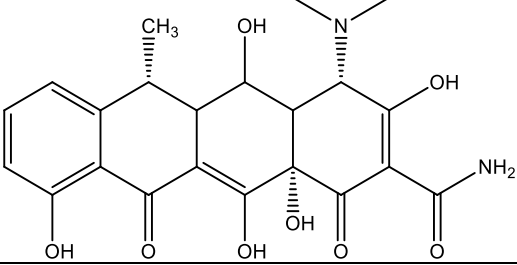
Figura 3. Estrutura química da 6-dioxi-6-dimetiltetraciclina.



Fonte: Adaptado de (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

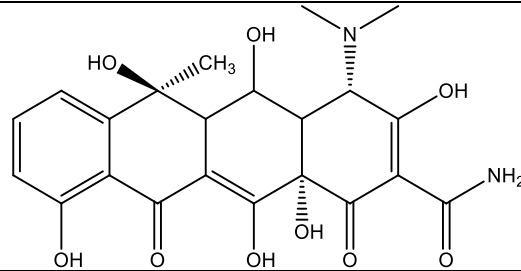
As TCs são substâncias anfóteras cristalinas de baixa solubilidade, geralmente disponíveis na forma de cloridratos que apresentam maior solubilidade, sendo estas soluções mais estáveis em soluções mais ácidas (NELSON; HILLEN; GREENWALD, 2001). Estes antibióticos penetram na célula bacteriana por meio do transporte ativo ou passivo, impedindo que o RNA transportador se fixe ao ribossomo aceptor e assim impeça a síntese proteica e evite a proliferação das bactérias no organismo vivo (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Além das propriedades antibióticas, este grupo apresenta outras propriedades como ionóforos, ação apoptose e angiogênese, anti-inflamatória, entre outras propriedades (D'EL REY DANTAS et al., 2019; NELSON; HILLEN; GREENWALD, 2001; PEREIRA-MAIA et al., 2010). Atualmente, 8 TCs são comercializadas para o tratamento de infecções bacterianas em humanos e na medicina veterinária, sendo que a mais comuns é a tetraciclina (TC), 2-(amino-hidroxi-metilideno)-4-dimetilamino-6,10,11,12a-tetrahidroxi-6-metil-4,4a,5,5a-tetrahidrotetraceno-1,3,12-triona, além da oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC) e doxiciclina (DC) (PEREIRA-MAIA et al., 2010), e suas estruturas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura e propriedades químicas para os principais antimicrobianos da classe das Tetraciclinas.

Antimicrobiano	Nome Sistemático	Estrutura Química	Valor de pKa	Fórmula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)
Tetraciclina (TC)	(4S,4aS,5aS,6S,12aR)-4-(dimetilamino)-1,6,10,11,12a-pentahidroxi-6-metil-3,12-dióxi-4,4a,5,5a-tetrahidrotetraceno-2-carboxamida*		pKa ₁ 3,3 pKa ₂ 7,7 pKa ₃ 9,7	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈	444,4
Clortetraciclina (CTC)	7-cloro-tetraciclina		pKa ₁ 4,5 pKa ₂ 7,8 pKa ₃ 9,8	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	478,8
Doxicilina (DC)	6-deoxi-5-hidroxi-tetraciclina		pKa ₁ 3,0 pKa ₂ 7,9 pKa ₃ 9,2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444,4

Oxitetraciclina
(OTC)

5-hidróxi-tetraciclina



pKa₁ 3,0
pKa₂ 7,9
pKa₃ 9,2

C₂₂H₂₄N₂O₉

460,4

*Nome segundo a IUPAC

Fonte: Adaptado de (PEREIRA-MAIA et al., 2010; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

Uma das principais características estruturais das TCs está no seu forte poder de quelação, uma vez que a formação de um quelato com um íons metálicos afeta diretamente o perfil farmacológico dos antibióticos tetraciclínicos (ÖNAL, 2011; PULICHARLA et al., 2017). A formação dos quelatos pelas TCs podem ocorrer em várias posições da molécula, devido à presença de grupos doadores como N e O e do sistema dicetona fenólico (Figura 2) que atua como um local primário de quelação (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

A ação antibacteriana das TCs ocorre devido a formação de um complexo dos átomos de O dos carbonos C₁₁ e C₁₂ (Figura 2) com íons Mg²⁺ que prejudica a síntese proteica por meio da ligação à subunidade 30S do ribossomo que é responsável por decodificar a informação genética (GUERRA et al., 2016). Curiosamente, um dos mecanismos mais comumente encontrados para a resistência bacteriana à TCs também ocorre por meio da quelação de metais, e esse mecanismo ocorre pela formação de complexos metálicos com íons metálicos divalentes, como por exemplo, a Pt²⁺ (GUERRA et al., 2016; LV et al., 2019; PEREIRA-MAIA et al., 2010). Devido a essa formação de compostos de coordenação, as TCs podem vir a ser empregadas no futuro da medicina clínica, para o tratamento de doenças infecciosas, como a COVID-19 que gerou uma pandemia e tem causado graves consequências pelo mundo todo (MOSTAFA, 2020; SODHI; ETMINAN, 2020). Estudos publicados recentemente por Sodhi e Etminan (SODHI; ETMINAN, 2020) e Mostafa (MOSTAFA, 2020) apontam que as propriedades quelantes das TCs com zinco pode causar uma limitação na capacidade de replicação do novo coronavírus dentro das células hospedeiras, o que ajuda a inibir a infecção por COVID-19 em humanos.

Desde sua descoberta na década de 1940 e sua utilização na terapia humana na década de 1950, estima-se que a produção mundial dos antibióticos tetraciclínicos seja em torno de milhares de toneladas anuais (DAGHRIR; DROGUI, 2013). Devido ao seu baixo custo e ampla atividade antimicrobiana, esses são amplamente utilizados na terapia humana para tratamentos de pneumonia, infecções clamidial, febre agudas ou acnes, por exemplo (BAHRAMI; L. MORRIS; H. POURGHOLAMI, 2011).

Na medicina veterinária, as TCs são os antibióticos veterinários mais consumidos no mundo (CHARUAUD et al., 2019), pois tem sido amplamente utilizadas para prevenção e tratamento de infecções respiratórias,

gastrointestinais, bacterianas e outras, bem como infecções sistêmicas (DAGHRIR; DROGUI, 2013). No último estudo publicado em Outubro de 2019 pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) em que avaliam 31 países europeus, em 2017 as TCs representaram 30,4% dos antimicrobianos vendidos nesses países, cerca de 2019 toneladas, sendo a classe de antibióticos mais vendida nesses países (EMA, 2019). Já nos Estados Unidos da América (EUA), segundo últimos estudos divulgados pela Administração de Alimentos e Drogas (FDA, do inglês *U.S. Food & Drug Administration*), as TCs foram os antimicrobianos mais vendidos para o uso em produção de alimentos de origem animal, representando cerca de 66% das vendas no país com mais de 3974 toneladas de TCs (FDA, 2019).

Os antibióticos tetraciclínicos são também muito empregados no setor agropecuário como promotores de crescimento de bovinos, suínos, ovinos, aves, entre outros, devido a sua incorporação na ração animal em doses subterapêuticas, visando promover um rápido ganho de peso e crescimento do animal (DANNER et al., 2019). Apesar de haver dados que apoiem o fato de que o uso das TCs como promotores de crescimento causem resistência bacteriana, reações alérgicas em humanos e animais, bem como mudanças na microflora ambiental e nas populações bacterianas, esta aplicação para as TCs tem seus aspectos positivos como a eficiência de absorção de nutrientes, uma maior receita comercial para os agricultores, entre outras (CHATTOPADHYAY, 2014; HAO et al., 2014).

Nos últimos anos, devido ao crescente uso abusivo de antibióticos tetraciclínicos, a possibilidade de contaminação do meio ambiente com tais compostos aumentou devido as diversas aplicações e descartes que esse tipo de substância tem. A ocorrência destes antibióticos no meio aquático e em alimentos de origem animal como mel, carnes, peixes, leites e ovos, tem recebido atenção especial, devido a sua contribuição para o aumento de infecções causadas por cepas resistentes. Após o consumo destas substâncias, cerca de 70 a 90% é excretada e lançado na forma ativa para o meio ambiente através de fezes e urina, contaminando assim solos, águas residuais, águas superficiais e por conta da lixiviação, águas subterrâneas, o que acarreta em um grande problema de saúde pública (CHEN et al., 2017b; DAGHRIR; DROGUI, 2013; DANNER et al., 2019; GAUDIN, 2017). A contaminação de águas de

consumo e alimentos de origem animal, podem causar ao consumidor problemas de saúde que variam desde as possíveis reações alérgicas, lesões hepáticas, dentes amarelados, distúrbios gastrointestinais, entre outros, além de poder provocar um aumento na resistência bacteriana (RODRIGUEZ et al., 2010; RODRÍGUEZ; PEZZA; PEZZA, 2016).

A presença de resíduos de TCs em amostras de origem animal como o leite, por exemplo, tem sido reportada na literatura. Kumar e colaboradores (KUMAR; PANDA; SHARMA, 2022) analisaram amostras de leite *in-natura* e pasteurizado (UHT). Segundo os autores, foi detectado a presença de OTC em 12 das 128 amostras de leite *in-natura*, enquanto para amostras de leite UHT, 2 das 45 amostras analisadas apresentaram resultado positivo. As concentrações de OTC encontrada nas amostras de ambos os tipos de leite variaram de 31,5 a 150,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que três amostras de leite *in-natura* continham resíduos de OTC acima do limite de tolerância do país (100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Mohebi e colaboradores (MOHEBI et al., 2020) analisaram 14 amostras de leite UHT e a OTC foi encontrada em 3 delas, nas concentrações de 15, 30 e 43 $\mu\text{g L}^{-1}$. Navrátilová e colaboradores (NAVRÁTILOVÁ; BORKOVCOVÁ; DRAČKOVÁ, 2009) encontraram resíduos de OTC em 50% das amostras de leite analisada.

Moudgil e colaboradores (MOUDGIL et al., 2019) analisaram 492 amostras de leite de fazendas leiteiras e, dividiram o estudo dessas amostras com base no tamanho da fazenda. Assim, das 164 amostras de leite analisadas de grandes fazendas, 8 (4,9%) foram positivas para resíduos de OTC, com concentrações variando entre 62,7 e 177,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que 3 amostras (1,8%) excederam o limite de tolerância estabelecido (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 2 (1,2%) para TC com concentrações entre 72,6 – 85,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, das 164 amostras de médias fazendas, 7 (4,3%) foram positivas para OTC, quantificadas na faixa 62,7 – 148,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que 2 excederam o limite de tolerância e 6 (3,7%) para TC, variando as concentrações entre 72,6–122,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, com 1 amostra com resíduo acima do tolerado. Da mesma forma, de pequenas propriedades leiteiras, 6 (3,7%) foram positivas para OTC, com concentrações determinadas entre 55,5–170,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com 3 dessas amostras acima do tolerado, enquanto TC foi encontrada em 5 (3,0%) amostras, com uma acima do tolerado. Os

autores também encontraram resíduos de OTC, com concentração de $77 \mu\text{g L}^{-1}$, em uma amostra de leite comercial.

A presença de resíduos de TCs em amostras de leite, por exemplo, decorrem principalmente do uso inadequado desses antibióticos, não respeitando as indicações do receituário e o período de carência para com os animais tratados (ESTEVÃO NETO et al., 2015) . Desse modo, a relação entre o uso de antibióticos na criação de animais de corte e a produção de leite, e a resistência antimicrobiana em humanos levou à um sério problema de saúde pública, visto que o tratamento de animais com esse tipo de medicamento pode causar a contaminação dos produtos alimentares derivados destes animais, bem como a uma contaminação do meio ambiente, que também pode ocorrer por outras fontes.

É importante ressaltar que o período de carência é o período necessário após a administração de TCs a uma vaca antes que o leite produzido por ela seja considerado seguro para consumo humano. Isso é fundamental para garantir que não haja resíduos detectáveis desses antibióticos no leite destinado ao mercado. A determinação do período de carência envolve uma avaliação cuidadosa da dose administrada, da via de administração e da taxa de metabolismo da vaca, levando em consideração a legislação e as diretrizes estabelecidas pelas agências reguladoras de alimentos. Para as TCs, esse período pode variar entre 96 e 120 horas, a depender das características do medicamento usado (ESTEVÃO NETO et al., 2015) .

Assim, devido relevância do monitoramento dos antibióticos, em especial as TCs, órgãos reguladores e do governo de diversos países estabeleceram níveis de tolerância ou limites máximos de resíduos (LMR) para presença destes compostos em diversos tipos de matrizes. Em outras palavras, os LMR são níveis de resíduos de TCs em alimentos e/ou águas que podem ser ingeridos diariamente, sem que causem algum dano toxicológico para a saúde humana (CHATTOPADHYAY, 2014)(MOTA et al., 2005).

O *Codex Alimentarius*, um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), é considerado uma referência mundial para produtores, processadores de alimentos e consumidores, estabelece que os LMR para as TCs em alimentos de origem animal são: $600 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para fígado

de aves, gados e suínos; 400 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para ovos; 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para músculo de aves, gados, suínos e peixes; e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para leite de vaca (COMMISSION, 2015).

Em países europeus, como a Rússia, por exemplo, a delimitação do teor de TC em mel não deve exceder 0,01 mg Kg^{-1} , conforme preconizado pela Regulamentação Técnico da União Aduaneira, TR CU 021/2011 (TR CU, 2011). A União Europeia (EU) preconiza que os limites seguros de resíduos de medicamentos veterinários em tecidos de animais que entram na cadeia alimentar sejam 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para músculo, 300 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para fígado, 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para rim, 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para leite e 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para ovos (EU, 2010).

A OMS estabelece que o limite máximo residual de TCs no leite é de 100 mg L^{-1} (MOREIRA et al., 2010). Nos EUA, a FDA determina que os limites máximos TC, OTC e CTC no leite é de 80, 30 e 30 mg L^{-1} , respectivamente, enquanto que o governo Chinês (GB 18406.3-2001) determina que em carnes é permitido 100 mg Kg^{-1} de TCs (MOREIRA et al., 2010).

No Brasil, os LMRs para TCs são regulados de acordo com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Segundo eles, são estabelecidos 1200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para carnes de bovinos, equinos, suínos e aves; 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para peixes; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para leite bovino e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para mel. Estes LMRs são adotados para TC, CTC e OTC de maneira individual ou para a combinação delas. Além disso, para o leite bovino o PNCRC inclui a DTC na combinação destes resíduos (MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2019). Ainda, o Programa Nacional de Análise de Resíduo de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), determina que o limite máximo residual aceitável para TCs no leite é de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ANVISA, 2009, 2012, 2018, 2022). Cabe salientar que no Brasil, conforme descrito no Art. 18 da Instrução Normativa n° 26 de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as TCs “são de uso exclusivo em produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo proibida a sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho animal ou como conservantes de alimentos para animais”, sendo então proibido o uso desses antibióticos como aditivo alimentar (MAPA, 2009).

Com base nas diretrizes e regulamentações imposta pelos países, a avaliação e monitoramento dos antibióticos tetraciclínicos, ajudam a garantir um uso e um descarte mais prudente desses medicamentos, o que por sua vez,

ajuda a reduzir os resíduos e a resistência bacteriana. Assim, o desenvolvimento de novos métodos analíticos com maior seletividade e sensibilidade para a detecção e quantificação de TCs em diferentes tipos de matrizes se faz necessário.

A *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* recomenda o uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção ultravioleta (UV) como o método oficial para a análise de resíduos de tetraciclina em alimentos de origem animal (AOAC, 2012a, 2012b). Devido as suas características estruturais, as TCs apresentam vários grupos cromóforos, exibindo uma intensa absorção na região UV entre 270 e 360 nm, tanto em meio ácido quanto neutro. Logo, o emprego de detectores de UV e de arranjo de diodo (DAD) são bastante comuns para a determinação dos antibióticos tetraciclínicos (CHERKASHINA et al., 2018; PEREIRA-MAIA et al., 2010; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; YU; MU; HU, 2012). Além disso, a presença de diferentes grupos funcionais nas estruturas das TCs permite que elas sejam retidas em sistemas cromatográficos com colunas de fase reversa (C8 e C18) através de mecanismos como formação de pares de íons, efeitos de competição, interação com grupos silanóis, entre outros (DENOBILO; DE SOUZA NASCIMENTO, 2004; ESTEBAN; RODRIGUES; NASCIMENTO, 2007).

Apesar dos avanços na sensibilidade para a instrumentação analítica para a determinação de TCs em matrizes complexas, como as alimentícias, e os métodos desenvolvidos apresentarem baixos limites de detecção (LD) (na faixa de ng L^{-1} à $\mu\text{g L}^{-1}$), esses resultados dependem, em sua grande maioria, à uma extração e preparação adequada da amostra antes das análises instrumentais. Ainda assim, muitos métodos não apresentam sensibilidade suficiente para detectar resíduos dos analitos de interesse visto que, em amostras ambientais e alimentícias, encontram-se em baixas concentrações. Assim, torna-se necessário o envolvimento de etapas de isolamento e pré-concentração do analito de interesse, pois a não remoção de compostos interferentes pode prejudicar sua determinação e quantificação.

Quando se trata de amostras alimentícias como o leite, a precipitação de proteínas é uma etapa importantíssima do preparo de amostra para TCs pois elas possuem uma característica de se ligarem facilmente com proteínas. A precipitação de proteínas ocorre facilmente com a adição de agentes

precipitantes ou ácidos fortes, podendo ser feita usando solvente orgânicos como acetona (FILIK et al., 2016), acetonitrila (ACN) (AGUILERA-LUIZ et al., 2008; GARRIDO FRENICH et al., 2010) ou metanol (MeOH) (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; LIU et al., 2013) ou com a mistura de solventes orgânicos com compostos ácidos, como ácido trifluoroacético (FENG et al., 2016; NIKOLAIDOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2008), ácido tricloroacético (WANG et al., 2016), ácido fórmico (PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2016), ácido acético (GAO et al., 2017; XUE et al., 2016), como também com o uso de tampões como EDTA-McIlvaine (CHEN et al., 2009; GAO et al., 2020; JING et al., 2009; LU et al., 2020; LV et al., 2014a, 2012, 2014b), tampão citrato (HU et al., 2008) e tampão succinato de sódio (HELLER et al., 2006). Entretanto, a precipitação de proteínas acaba retirando apenas as proteínas da matriz, deixando para trás outros compostos que também pode interferir na análise, sendo necessário métodos de preparo de amostras mais eficientes e seletivos.

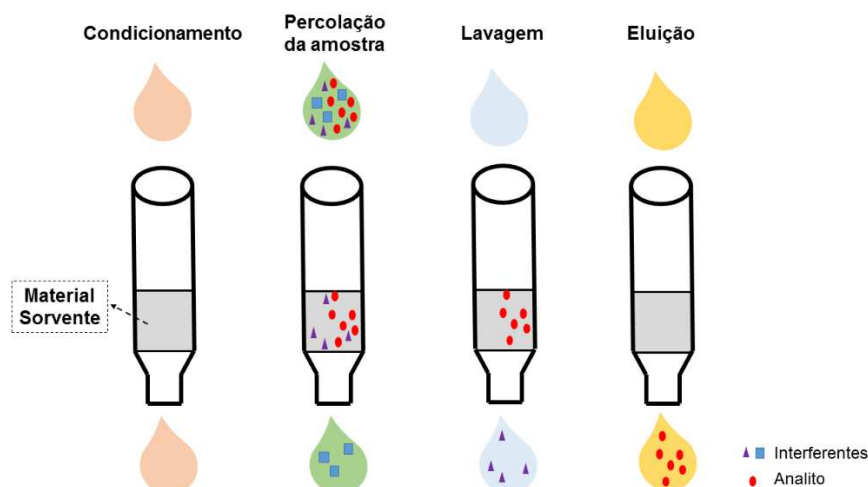
Na literatura há uma vasta variedade de métodos de extração, *clean-up* e pré-concentração para análise de resíduos de TCs aplicados em diferentes tipos de amostras, sendo as mais empregadas: extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), extração com solvente (SE do inglês *Solvent Extraction*), extração com líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *Ultrasonic-Assisted Extraction*), extração em fase sólida magnética (MSPE, do inglês *Magnetic Solid-Phase Extraction*), micro-extração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso (MISPE, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer Solid-Phase Extraction*), micro extração em fase sólida dispersiva (DSPME, do inglês *Dispersive Solid-Phase Microextraction*), QuEChERS, entre outros (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

A SPE é o mais popular e um dos mais importantes para a extração e/ou pré-concentração de TCs em diferentes tipos de amostras, especialmente as mais complexas. Isso porque a SPE permite a limpeza da amostra, pré-concentrar elevados volumes de amostra, reduzir o volume de solvente utilizado, além de possibilitar uma extração seletiva do analito, uma regeneração da fase sólida e ser facilmente combinada com diferentes técnicas de detecção (WEN, 2019).

A SPE envolve o equilíbrio de partição sólido-líquido, sendo baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão (JARDIM, 2010). O procedimento típico da SPE, ilustrado na Figura 4, envolve 4 etapas:

1. Condicionamento ou ativação do material adsorvente com solvente adequado, visando um melhor empacotamento deste material e deixá-lo em condições físico-químicas adequadas para promover as interações responsáveis pela retenção do analito (JARDIM, 2010; POOLE, 2002; WAN IBRAHIM et al., 2014);
2. Percolação da amostra sob gravidade, vácuo, bombeamento ou sistemas automatizados. Nesta etapa ocorre a retenção do analito e as vezes de outros componentes da matriz no material adsorvente, por meio de mecanismos que incluem interações de Van Der Waals, ligações de Hidrogênio, dipolo-dipolo, troca catiônica ou aniônica e até mesmo pela exclusão por tamanho. Durante esta etapa o analito é pré-concentrado no adsorvente, e dependendo do tipo de amostra, diferentes volumes podem ser percolados, sendo possível a passagem de grandes volumes de amostra que possibilitam fatores de pré-concentração elevados (JARDIM, 2010; POOLE, 2002; WAN IBRAHIM et al., 2014);
3. Limpeza/lavagem da coluna, utilizando solvente apropriado para retirada de impurezas, possibilitando uma purificação do extrato (JARDIM, 2010; POOLE, 2002);
4. Eluição do analito, desfazendo a interação analito-adsorvente por meio de um solvente adequado (JARDIM, 2010; POOLE, 2002; WAN IBRAHIM et al., 2014).

Figura 4. Representação esquemática das etapas empregadas na extração em fase sólida (SPE).



Fonte: Adaptado de (LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015).

Para o uso da SPE como etapa de preparo de amostra, além de se levar em consideração as características do analito e matriz, parâmetros como escolha e tipo do material adsorvente, volume da amostra e solvente para eluição também devem ser considerados. A literatura apresenta inúmeros trabalhos que utilizam a SPE para extração/pré-concentração de TCs de diferentes tipos de amostras, em que OASIS HLB – adsorvente universal polimérico de fase reversa hidrofílico-lipofílico-balanceado, constituído por N-vinilpirrodilona e divinilbenzeno - é considerado o adsorvente mais empregado (ÖNAL, 2011). Em geral, a ligação entre esse adsorvente e esses analitos ocorrem devido a forças de Van Der Waals, interações não polares, ligações de Hidrogênio, entre outras (ANDRADE-EIROA et al., 2016a, 2016b).

Mamani e colaboradores (VARGAS MAMANI; REYES REYES; RATH, 2009) desenvolveram um método para extração de TCs, sulfonamidas e cloranfenicóis de amostras de leite bovino para posterior determinação por HPLC-DAD. O preparo da amostra envolveu a precipitação das proteínas do leite com tampão McIlvaine e ácido tricloroacético em MeOH, seguido da SPE usando cartuchos de OASIS HLB. Diferentes autores também estudaram a extração de TCs utilizando cartuchos de SPE com C₁₈ (FRITZ; ZUO, 2007; SAMANIDOU; NIKOLAIDOU; PAPADOYANNIS, 2007; SANTOS et al., 2007). Entretanto, o uso de cartuchos HLB são mais recomendados para extração e pré-concentração de TCs, devido a sua estabilidade em diferentes valores de pH e solventes, boa

capacidade de retenção de compostos polares e hidrofóbicos (ANDRADE-EIROA et al., 2016a, 2016b).

Nos últimos anos, tem-se buscado o desenvolvimento de adsorventes para SPE com reconhecimento específico para TCs, visando uma melhoria dos resultados e uma maior seletividade devido à complexidade das matrizes, como as alimentícias, por exemplo. Dentre esses novos adsorventes desenvolvidos podemos citar *metal-organic framework* (MOF) (ARABSORKHI; SERESHTI; ABBASI, 2019), *zeolite imadazole framework-8* (ZIF-8) (LIU; CHEN; DING, 2017; YANG; YANG; YAN, 2013), sorventes baseados em carbono/grafeno (DE FARIA et al., 2017; SUN et al., 2015; WEI; WU; ZHU, 2017; WU et al., 2017; XU et al., 2016), nanopartículas magnéticas (CASTILLO-GARCÍA; AGUILAR-CABALLOS; GÓMEZ-HENS, 2015; HUANG et al., 2017; IBARRA et al., 2011) e, especialmente os polímeros molecularmente impressos (FENG et al., 2016; NIU et al., 2016; WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2020).

2.3 OS POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS PARA TETRACICLINAS

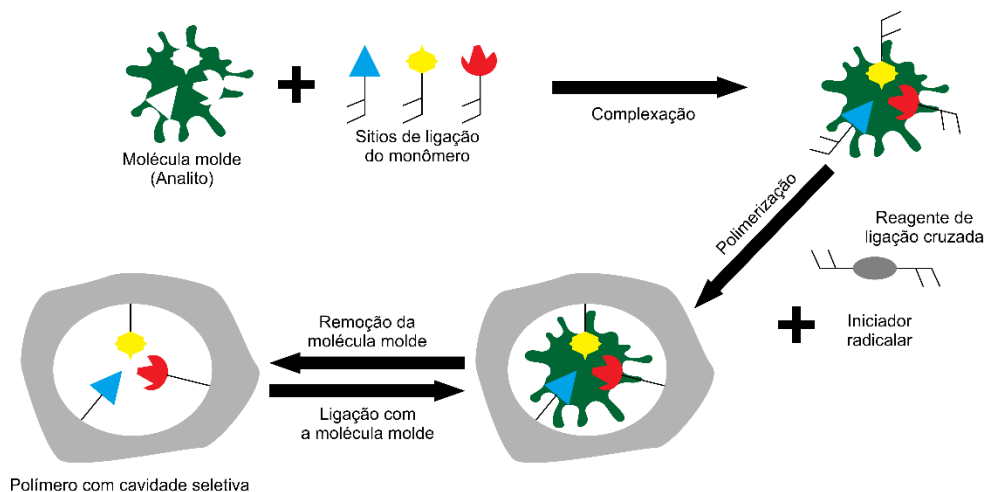
Os MIPs são materiais sintéticos poliméricos que apresentam sítios de reconhecimento seletivo que são produzidos durante a sua síntese polimérica. Estes materiais passaram a chamar a atenção devido a apresentarem vantagens como seletividade, simplicidade de preparo, robustez, facilidade de armazenamento, entre outras vantagens (CHEN et al., 2016). Assim, a busca por novos materiais adsorvente com sítios seletivos de reconhecimento tornou-se de grande interesse para a comunidade científica em geral.

O conceito de impressão molecular passou a ser estudado a partir de 1940, quando Linus Pauling postulou a teoria da formação de anticorpos, em que a cadeia polipeptídica do anticorpo se molda ao redor do antígeno, criando uma configuração seletiva para este antígeno (PAULING, 1940; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005). Posteriormente, com base na interação seletiva antígeno-anticorpo, os cientistas introduziram a tecnologia de impressão molecular (MIT, do inglês *Molecularly Imprinting Technology*) para sintetizar materiais sintéticos com uma estrutura rígida tridimensional ao redor de uma molécula molde, com capacidade para mimetizar os materiais biológicos

e que mantivessem a seletividade e especificidade. Assim, a MIT foi reconhecida como um método que poderia fornecer uma ligação específica à molécula molde por meio de sítios de ligação em um Polímero Molecularmente Impresso (MIP, do inglês *Molecularly Imprinting Polymer*) (CHEN et al., 2016).

De um modo geral, a síntese de um MIP pode ser resumida em três etapas, que consiste primeiramente da formação de um complexo entre molécula molde (MM) e monômero funcional (MF) por meio de ligações covalentes ou não-covalentes. Em seguida, um agente de reticulação (AR) e um iniciador radicalar (IR) são adicionados para estabilizar os sítios de ligação e iniciar a polimerização. Assim, o complexo MM-MF é polimerizado, de modo que uma rede polimérica se forme ao redor da MM. Por fim, após a obtenção do polímero, a MM é removida da matriz polimérica, gerando cavidades tridimensionais com sítios de reconhecimento em termos de tamanho, forma e disposição de grupos funcionais para se ligarem à espécie química que serviu de molde (CHEN et al., 2016; TURIEL; ESTEBAN, 2019). A Figura 5 apresenta uma representação esquemática do processo geral de síntese de um MIP.

Figura 5. Representação esquemática do processo de síntese de um MIP.



Fonte: Adaptado de (CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; ESTEBAN, 2019).

A reação de polimerização na síntese dos MIPs envolve a combinação da MM, MF, AR, IR e solvente porogênico (SP) e, portanto, a combinação deles afeta características como seletividade, capacidade adsortiva, bem como no seu desempenho para aplicações específicas. A escolha e combinação dos reagentes apropriados é um passo importante no processo de impressão

molecular para que se obtenha um material com as características desejadas (CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005). O Quadro 1 mostra os reagentes e suas combinações para a síntese de diferentes MIPs usados na adsorção de tetraciclinas.

Quadro 1. Polímeros molecularmente impressos reportados na literatura para a adsorção de TCs em diferentes amostras.

MM	MF	IR	AR	SP	Outros reagentes empregados	Estratégia de Polimerização	Amostra/ Preparo de Amostra	Método Analítico	Ref.
1 mmol OTC	3 mmol MAA	0,15 mmol AIBN	7 mmol EGDMA	48 mL MeOH	7,5 mmol de HEMA + 0,5 mmol de glicerol metacrilato	Precipitação	Água do lago (MG); MISPE	HPLC-DAD	(ABRÃO; MAIA; FIGUEIREDO, 2014)
0,1 mmol TC	0,7 mmol MAA	80 mg persulfato de sódio	4,9 mmol EGDMA	30 mL MeOH	N/A	Precipitação	Leite; DSPME	LVSS-CE	(AGUILAR et al., 2020)
0,511 mmol TC	6,09 mmol MAA	27 mg AIBN	50,56 mmol EGDMA	15 g MeOH	N/A	<i>Bulk</i>	N/A	UV-VIS	(CAI; GUPTA, 2004)
1,16 mmol TC	9,28 mmol MAA	1,02 mmol AIBN	46,41 mmol EGDMA	13,33 mL ACN	N/A	<i>Bulk</i>	Carne de porco; MISPE	HPLC-UV	(CARO et al., 2005)
1,16 mmol OTC				13,33 mL DMSO					
2 mmol OTC	20,0 mmol MAA	0,1 g AIBN	N.I.	100 mL EtOH:H ₂ O (9:1, v/v)	120 mmol estireno + 20 mmol divinilbenzeno	Impressão em superfície	Ovo e carne de galinha; MSPD	LC-MS/MS	(CHEN et al., 2009)
0,03 mmol TC	2,4 mmol MAA	0,15 mmol EBiB, 0,1 mmol CuCl, 0,1 mmol PMDETA	14,4 mmol EGDMA	20 mL H ₂ O com 0,3 g Tween 20	80 mg Fe ₃ O ₄ -KH570	ATREP	Carne de porco; MSPE	HPLC-UV	(DAI et al., 2012)

0,75 mmol TC	0,3 mmol MAA	10 mg AIBN	1,2 mmol EGDMA	50 mL ACN	150 mg V-MHNTs	Precipitação	N/A	UV-VIS	(DAI et al., 2014a)
0,5 mmol TC	1,0 mmol MAA	15 mg AIBN	8,0 mmol EGDMA	60 mL ACN	100 mg Fe ₃ O ₄	Precipitação	N/A	HPLC-UV	(DAI et al., 2014b)
CTC ¹	MAA ¹	40 mg AIBN	0,3 mmol EGDMA	7 mL Clorofórmio	N/A	Precipitação	Leite, ovo e carne de porco; MISPE	HPLC-DAD	(FENG et al., 2016)
1 mmol TC	8 mmol MAA	0,1 g AIBN	20 mmol EGDMA	100 mL EtOH com 0,4 polivinilpirrolidona	0,5 g Fe ₃ O ₄ COOH	Impressão de superfície	Leite; MSPE	LC-MS/MS	(GAO et al., 2020)
55,6 mg TC	71,1 mg AA	12,4 mg AIBN	1,24 mL TRIM	11,2 mL Acetona	Fibras silatadas	Copolimerização múltipla	Ração e músculo de frango, leite; SPME	HPLC-UV	(HU et al., 2008)
0,75 mmol TC	6 mmol MAA	30 mg AIBN	3 mL TRIM	65 mL MeOH:ACN (30:35, v/v)	N/A	Precipitação	Lagosta, pato, mel, ovo; MISPE	LC-MS/MS	(JING et al., 2009)
OTC:CTC (1:1, mol/mol)	6 mmol MAA	30 mg AIBN	3 mL TRIM	60 mL MeOH:ACN (30:35, v/v)	N/A	Precipitação	Lagosta, leite e mel; <i>online</i> MISPE	HPLC-UV	(JING et al., 2010)
TC ²	MAA ²	AIBN/CDB ₃	EDMA ²	ACN	Polietileno glicol-1200	Precipitação-RAFT	N/A	HPLC-UV	(LIU et al., 2014a)
0,25 mmol TC	3,0 mmol AA	0,25 mmol BPO	30 mmol EGDMA	50 mL MeOH	100 mg Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -MPS	Impressão de superfície	Leite/ MSPE	HPLC-UV e DPV	(PIZAN-AQUINO et al., 2020)

0,4 mmol TC	1,2 mmol MAA	120 mg AIBN	10 mmol EGDMA	12 mL ACN + 4 mL MeOH	0,4 mmol HEMA / Fibras silatadas	Bulk – Impressão de superfície	Leite, carne de frango e peixe / SPME	HPLC-UV	(LU et al., 2020)
0,580 mmol TC	4,64 mmol MAA	N.I	23,2 mmol EGDMA	7 mL DMF	A solução foi colocada em uma fonte gama (Co-60)	N.I.	N/A	UV-VIS	(AKBULUT SÖYLEMEZ, 2021)
2,8 mmol TC	12,2 mmol MAA	0,7 mmol AIBN	50 mmol EGDMA	25 mL ACN:Álcool Benzoíla (3:2, v/v)	N/A	N.I	N/A/ SPE	UV-VIS	SUEDE E et al., 2004)

MM: molécula molde; MF: monômero funcional; IR: iniciador radicalar; AR: agente reticulante; SP: solvente porogênico; N.I.- não informado; N/A- Não se aplica; TC- Tetraciclina; MAA- ácido metacrílico; EGDMA- etileno glicol dimetacrilato; MeOH- Metanol; ACN- Acetonitrila; DMSO- Dimetilsulfóxido; AIBN- 2,2-Azobisisobutironitrila; OTC- Oxitetraciclina; MeOH- Metanol; EtOH- etanol; MISPE- Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa; HPLC-DAD- HPLC-UV- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjo de Diodo; LVSS-CE- Eletroforese Capilar de Empilhamento de Amostras de Grande Volume; UV-Vis- Espectroscopia Ultravioleta-Visível; HPLC-UV- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Ultravioleta; LC-MS/MS- Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas; MSPD- Dispersão da Matriz em Fase Sólida; ATREP- Polimerização Radicalar em Emulsão por Transferência Atômica; MSPE- Extração em Fase Sólida Magnética; Fe₃O₄-KH570- Nanopartículas magnéticas modificadas com γ-metacriloxipropiltrimetoxissilano (KH-750); V-MHNTs- Nanotubos magnéticos de *halloysite* modificados com vinil; CTC- Clorotetraciclina; AA- Acrilamida; TRIM- trimetilpropano trimetacrilato; SPME- Microextração em fase sólida; EDMA- etileno dimetacrilato; CDB- cumil ditiobenzoato; RAFT- Polimerização Radicalar Controlada por Transferência tipo Adição-Fragmentada; HEMA- 2-hidroxietil metacrilato; BPO- Peróxido de Benzoíla; DMF – Dimetilformamida; GMA – Glicidilmetacrilato;

¹ Diferentes proporções de Molécula Molde (MM): Monômero funcional (MF) foram estudadas, sendo a melhor 1:4 (MM:MF).

² TC/MAA/EDMA estão na proporção molar 1:8;40.

³ AIBN/CDB estão na proporção molar 1:2.

A MM, também chamada de *template*, é o analito alvo para o qual se deseja formar a cavidade seletiva, embora em alguns casos, a cavidade seletiva pode ser formada para um grupo ou família na qual a molécula pertence (BARROS; CUSTODIO; RATH, 2016). Apesar de a maioria das publicações envolverem apenas uma molécula como MM, estudos recentes têm relatado o uso de um ou mais moléculas como MM na síntese de MIPs, formando cavidades seletivas para dois tipos de analitos distintos ou para uma classe de substâncias (GAMA; BOTTOLI, 2017; QU; ZHU, 2017; TANG et al., 2016; XU et al., 2018). Jing e colaboradores (JING et al., 2010) reportaram a síntese de um MIP usando OTC e CTC como moléculas molde, gerando um polímero com alta capacidade de reconhecimento molecular para a classe das TCs. A escolha da MM se baseia em três características principais: não conter grupos que se envolvam ou participem da polimerização, ser estável sob as condições de polimerização (temperaturas elevadas ou exposição à luz UV) e, principalmente, conter grupos funcionais capazes de interagir com o MF (TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2010a, 2019).

O MF, geralmente composto por uma unidade de reconhecimento e por uma unidade polimerizável, possui uma dupla-funcionalidade: ter a função de formar um complexo com a MM e posteriormente incorporá-la na rede polimérica ao participar do processo de polimerização por meio da sua unidade polimerizável. A escolha do MF é uma etapa crucial para o sucesso da impressão da MM na matriz polimérica, e sua seleção está intimamente relacionada às características da MM. A força das interações entre a MM e o MF afeta características do MIP como afinidade, estabilidade e seletividade. Isso porque, uma maior estabilidade no complexo MM-MF faz com que as cavidades do polímero formado sejam nada ou pouco afetadas por outras espécies além da MM, conferindo uma maior uniformidade dos sítios de ligação e conseqüentemente, resultando em uma maior seletividade do MIP (ASHLEY et al., 2017; CHEN et al., 2016; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2019).

Como pode ser visto no Quadro 1, o MIP sintetizado por Hu e colaboradores (HU et al., 2008) foi o primeiro MIP reportado na literatura empregando um MF diferente do MAA. Nesse trabalho, os autores avaliaram os MIPs sintetizados usando MF com características ácidas, básicas e neutras como é o caso dos MF ácido metacrílico (MAA), 4-vinilpiridina (4-VP) e

Acrilamida (AA), respectivamente. Os autores concluíram que o MIP usando AA como MF apresentou melhor homogeneidade e estrutura morfológica, além de apresentar a maior capacidade adsorptiva em comparação com os demais. Pizan-Aquino e colaboradores (PIZAN-AQUINO et al., 2020) reportam a síntese de um MIP magnético (M-MIP) para TC também usando o AA como MF e, neste caso, foi escolhido por análise computacional. Para fins de comparação, os autores sintetizaram um MIP usando MAA. Os autores concluíram que o M-MIP sintetizado com o MF AA apresentou maior magnetização de saturação quando comparado com o M-MIP de MAA, bem como uma maior adsorção da TC neste material, indicando que o M-MIP (AA) ofereceu os melhores recursos.

Entretanto, uma vez que a TC apresenta características anfóteras, o principal e mais utilizado MF na síntese de MIPs para TCs é o MAA. Isso porque, o MAA apresenta grupos aceptores de elétrons, como a carbonila, e doadores (hidroxila) de ligação de hidrogênio, capazes de interagir com a TC que possui também grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, logo, espera-se que a interação entre esses reagentes promova vários locais de ligação de Hidrogênio. Além disso, o MAA possui a capacidade de fazer ligações de natureza iônica, pois apresenta o grupo COOH ionizável, sendo considerado um ácido fraco ($pK_a = 4,7$), possibilitando a interação com as TCs que apresenta vários graus de ionização em solução aquosa.

Outro fator importante que afeta as características do MIP é a proporção entre MM e MF. Devido as interações entre MM e MF serem governadas por um processo de equilíbrio, geralmente utiliza-se um excesso de MF em relação a MM para garantir a formação do maior número possível de sítios específicos através da formação do complexo MM-MF. No entanto, vale ressaltar que estudos de proporção entre estes dois reagentes devem ser feitos, pois quantidades excessivas de MF podem aumentar a quantidade de sítios de ligação não-específicos diminuindo a seletividade do MIP (ASHLEY et al., 2017; CHEN et al., 2016; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2019). Feng e colaboradores (FENG et al., 2016) avaliou a razão molar entre MM e MF nas proporções 1:4, 1:6 e 1:10 (MM:MF) em relação a capacidade adsorptiva de cada material sintetizado. Os autores concluíram que houve um efeito mínimo sobre a capacidade adsorptiva e a menor proporção (1:4) foi selecionada. O grau de reticulação na ligação da TC com o material sintetizado também foi avaliado por

Cai e Gupta (CAI; GUPTA, 2004), em que os autores concluíram que com uma alta reticulação, ou seja, uma alta quantidade do AR (entorno de 80% de EGDMA) tem-se uma maior adsorção, pois segundo eles, é necessário que o polímero apresente uma estrutura rígida para manter a impressão molecular.

A escolha do SP empregado durante a síntese polimérica tem um papel fundamental pois, este deve fornecer a solubilização do meio, favorecendo o processo de polimerização, mas sem formar fortes interações intermoleculares com o MF e a MM que possam interferir no processo de formação do complexo (MM-MF, pré-polimerização). Além disso, o SP tem influência direta nas características morfológicas do material, pois deve favorecer a criação de poros no polímero. Assim, a escolha adequada do SP no complexo pré-polimerização favorece a formação de um polímero macro ou microporoso, pois este solvente não deve provocar interferências na interação MM-MF pois caso isso ocorra, pode haver a formação de pequenas quantidades e com pouca seletividade dos sítios de reconhecimento. Dessa forma, a baixa afinidade entre o SP e o MF poderá resultar na formação de poros maiores que favorecem a transferência de massa do analito aos sítios seletivos, enquanto um SP com alta afinidade pelo MF pode causar interferências na interação MM-MF resultando em partículas pequenas e poucos poros (CHEN et al., 2016; CORMACK; ELORZA, 2004; PARLAPIANO et al., 2021; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2019).

Normalmente, os SP mais empregados em sínteses de MIPs são metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), etanol (EtOH), dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), entre outros. Esses solventes podem ser classificados entre apolares, polar apróticos ou polar próticos. A polaridade dos porógenos pode afetar o interação entre a MM e o MF e, portanto, as propriedades de adsorção de MIPs (CHEN et al., 2016). Como podemos observar no Quadro 1, os SP mais empregados na síntese de MIPs para TC são MeOH e ACN. Entretanto, cabe saliente que também é comum durante a síntese de MIPs o uso de uma mistura de SP, tal como pode ser visto no Quadro 1 em que o uso de misturas como MeOH:ACN (JING et al., 2009, 2010) e EtOH:H₂O (CHEN et al., 2009) são reportadas.

Aguilar e colaboradores (AGUILAR et al., 2020) avaliaram o efeito da polaridade do SP durante a síntese de um MIP para TC, usando a ACN como

solvente polar aprótico e o MeOH como solvente polar prótico, em diferentes proporções (4:0, 3:1, 2:2, 1:3 e 0:4) variando de MeOH para ACN. Os autores observaram que a polaridade afeta o modo de interação do complexo MM-MF, bem como a adsorção da TC diminuiu com a diminuição da polaridade. Os autores associam estes resultados a relação entre os fatores de impressão dos MIPs obtidos e a constante dielétrica dos SP, uma vez que a constante dielétrica do MeOH (33,0) é menor que da ACN (37,5), escolhendo o MeOH como o SP por apresentar os melhores resultados. Para Liu e colaboradores (LIU et al., 2014a) a ACN como SP produz partículas mais uniformes e com bom tamanho, favorecendo a adsorção. No trabalho reportado por Jing e colaboradores (JING et al., 2009) os autores empregam uma mistura de MeOH:ACN (30:35, v/v) como SP. Para os autores, uma porção maior de um solvente menos polar favorece a formação de ligações de Hidrogênio entre a TC e o MF (MAA).

O AR, também chamado de agente de ligação cruzada (do inglês *cross-linker*), tem como finalidade controlar a morfologia da matriz polimérica, estabilizar os sítios de ligação e dar estabilidade mecânica à matriz polimérica para manter sua capacidade de reconhecimento molecular. O tipo e quantidade de AR podem afetar a seletividade e a capacidade de ligação do MIP. Assim, a quantidade de AR no polímero deve ser alta, afim de manter um maior grau de reticulação e conseqüentemente manter a estabilidade dos sítios de reconhecimento formados (CHEN et al., 2016; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; SANTOS et al., 2012; TURIEL; ESTEBAN, 2019; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2019).

Assim como os MF, os AR também apresentam em sua estrutura um ou mais grupos vinílicos, de modo que os mono-vinilidos geralmente formam cadeias mais lineares e os multi-vinilados (bi-, tri-, etc) formam cadeias mais ramificadas com diferentes arranjos moleculares. Dentre os AR, o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e o trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) são os mais utilizados nas sínteses de MIPs em geral.

Jing e colaboradores (JING et al., 2009) utilizaram TRIM e EGDMA em diferentes quantidades para avaliar a influência do AR na síntese dos MIPs. Os autores concluíram que o MIP sintetizado usando 3 mL de TRIM foi o que apresentou os melhores resultados em termos de fator de impressão e

capacidade adsorptiva, uma vez que o TRIM é um AR trivinilado, podendo favorecer a formação de estruturas porosas no polímero que o EGDMA.

A revisão da literatura sobre MIP para TCs permitiu evidenciar que o EGDMA, um AR bivinilado, é o AR mais empregado na síntese de MIPs para TC, e possivelmente esse fato está atrelado a sua capacidade térmica e mecânica altamente estáveis que possibilita a formação de materiais mais estáveis e com rápida transferência de massa. Vale ressaltar também as altas proporções em relação ao MF que são utilizadas desse reagente (CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; ESTEBAN, 2019). Aguilar e colaboradores (AGUILAR et al., 2020) avaliaram o efeito da proporção de EGDMA como AR na síntese do MIP. Em condições previamente otimizadas para a proporção entre MM:MF (1:7), o estudo envolvendo a proporção de EGDMA foi avaliado em 3 condições diferentes, sendo elas 1:7:25, 1:7:50 e 1:7:75 (MM:MF:AR). Os autores reportaram que não obtiveram o MIP sintetizado na proporção 1:7:25 devido a baixa quantidade de AR que não facilitou o processo de polimerização. Para o MIP com a maior proporção de EGDMA, 1:7:75, houve uma diminuição considerável na porcentagem de remoção de TC em relação ao MIP sintetizado na proporção 1:7:50, atribuindo este fato de que o alto grau de reticulação do polímero pode afetar a interação entre MM/grupos funcionais, diminuindo então a capacidade de ligação do MIP. Assim, o MIP sintetizado na proporção 1:7:50 apresentou os melhores resultados.

Em uma reação de polimerização, após a adição do AR, é acrescentado um IR ao meio reacional. O IR, que geralmente possui ligações fracas com baixa energia de dissociação, sofre quebra de ligação em sua estrutura gerando radicais capazes de dar início à reação de polimerização. Assim, a função do IR é gerar radicais livres capazes de possibilitar o início e a manutenção da reação de polimerização. Comumente, as sínteses dos MIPs envolvem reações de polimerização por radicais livres, foto e/ou eletropolimerização, em que o IR pode ser ativado por processos térmicos ou fotoquímicos. Portanto, a escolha do IR deve ser criteriosa, baseada nas características dos demais reagentes pois estes podem ser termo e/ou fotossensíveis. Além disso, deve-se remover o oxigênio do ambiente da síntese polimérica, pois este leva à um excesso de radicais livres que podem prejudicar a reação polimérica; essa remoção pode ser feita purgando gás inerte (como por exemplo nitrogênio e argônio) ou utilizando banho

ultrassom. Os peróxidos e os azo-compostos são amplamente utilizados como IR, sendo o 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) o mais comumente utilizado em sínteses poliméricas via radicais livre (CHEN et al., 2016; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; SANTOS et al., 2012; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005).

A popularidade do uso do AIBN como IR em sínteses de MIPs em geral, também é facilmente observado para a síntese de MIPs para TCs, sendo o principal e mais utilizado IR. Pizan-Aquino e colaboradores (PIZAN-AQUINO et al., 2020) consideram o AIBN um reagente caro e altamente explosivo e, por isso, utilizaram pela primeira vez o peróxido de benzoíla (BPO) como IR em uma síntese de MIP para TC.

Com o aprimoramento da ciência e da tecnologia MIT, foi possível descrever que as interações existentes entre *template* e o MF durante a síntese do MIP são estabelecidas por ligações covalente, não-covalente e semi-covalente. Wuff e Sarhan (WUFF; SARHAN, 1972) no início da década de 1970 introduziram a abordagem da ligação covalente reversível existente entre MM e MF. Para isso, os autores sintetizaram um polímero orgânico para separação enantiomérica de misturas racêmicas de ácido glicérico, utilizando o 2,3-o-p-vinilfenil borônico como MF que continha grupos funcionais capazes de se ligarem seletivamente a MM. Entretanto, devido a essa ligação covalente entre MM e MF ser uma ligação forte, tornou-se difícil a remoção da MM da matriz polimérica, necessitando de clivagem da ligação para a remoção ser completa (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; WUFF; SARHAN, 1972).

Para os MIPs sintetizados com uma abordagem covalente, tem-se a formação de uma ligação covalente reversível entre a MM e o MF durante a formação do complexo entre eles. A MM é removida por clivagem das ligações covalentes formadas, e estas são reinstauradas após a religação a MM. Os MIP formados com esse tipo de abordagem apresentam sítios de ligação mais homogêneos e estáveis, e conseqüentemente, mais seletivos. Entretanto, o uso desse tipo de abordagem torna-se bastante limitado devido a ligação covalente resultar em ligação e dissociação lenta, dificultando a extração da MM, sendo necessário, em muitos casos, procedimentos drásticos de hidrólise (ASHLEY et al., 2017; CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.;

KUBOTA, 2005; TURIEL; ESTEBAN, 2019; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2010b).

Por outro lado, tem-se a abordagem da ligação não-covalente em MM e MF, de modo que a remoção da MM da matriz polimérica pudesse ocorrer por meio de uma lavagem simples, com alterações do pH, força iônica, solvente ou algum outro parâmetro (ARSHADY; MOSBACH, 1981; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008). A abordagem não-covalente, baseada nas interações relativamente fracas como ligação de Hidrogênio, ligações iônicas, van Der Waals, entre outras, entre a MM e o MF e possui uma rápida cinética de ligação e remoção da MM. A síntese de MIPs com esse tipo de abordagem é a mais comum devido à sua simplicidade e disponibilidade de uma ampla variedade de MF com capacidade de interagir com diferentes moléculas que podem ser usadas como MM. No entanto, MIPs sintetizados com esse tipo de abordagem podem apresentar uma baixa seletividade devido as interações fracas entre MM e MF, quando comparado aos polímeros sintetizados pela abordagem covalente. Além disso, o polímero apresenta uma maior heterogeneidade dos sítios de ligação devido ao excesso de MF livre que pode ser incorporado aleatoriamente na matriz polimérica, além de sofrer uma influência maior da polaridade do SP empregado na polimerização (ASHLEY et al., 2017; CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; ESTEBAN, 2019; VASAPOLLO et al., 2011).

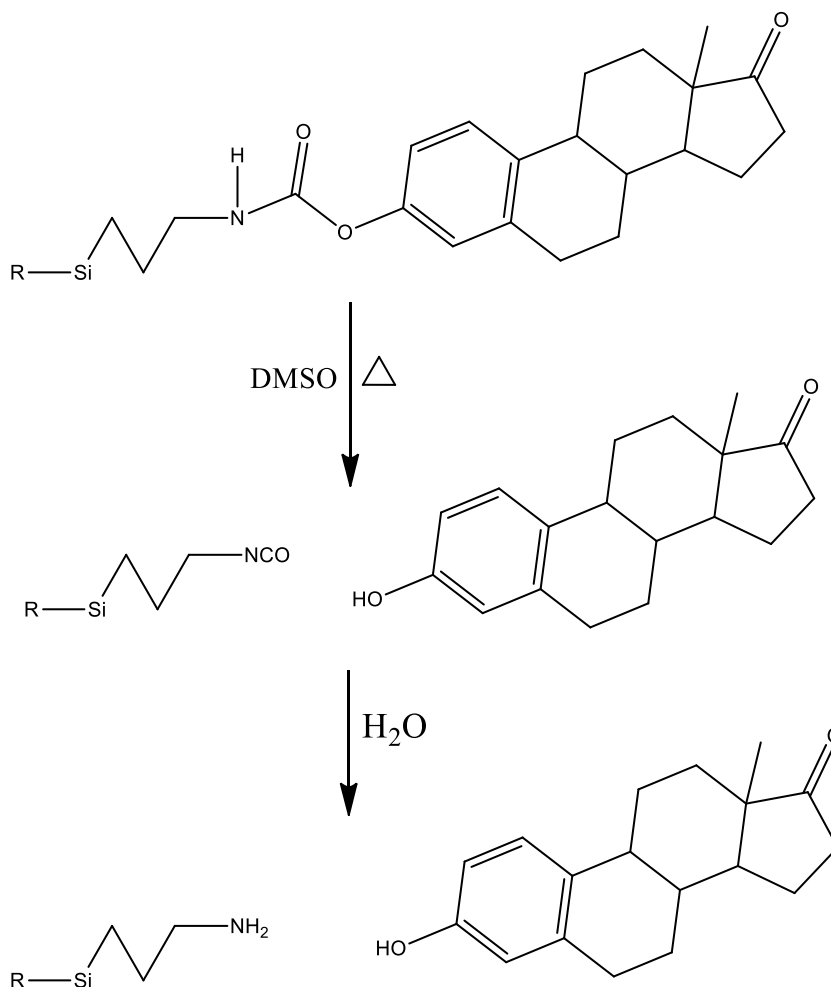
A revisão da literatura resumida no Quadro 1, nos permite observar que todos os MIPs reportados na literatura para TCs foram sintetizados a partir de uma abordagem não-covalente. Isso porque, como dito anteriormente, o principal MF utilizado nessas sínteses é o MAA, que interage com as TCs por ligação de hidrogênio, ou seja, ocorre uma ligação não-covalente entre a MM e o MF.

A fim de aliar as principais vantagens apresentadas pelas abordagens covalente e não-covalente, um duplo modo de ligação, conhecido como abordagem semi-covalente, foi introduzido por Whitcombe e colaboradores (1995) (WHITCOMBE et al., 1995b), que sintetizaram um polímero impresso para colesterol que se ligava covalentemente ao MF (éster 4-vinilfenilcarbonato) durante a polimerização. Após a remoção da molécula da estrutura polimérica por uma clivagem com hidrólise básica, sítios de reconhecimento não-covalentes

eram formados, sendo possível então a síntese de MIPs empregando ligações covalentes e não-covalentes (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; WHITCOMBE et al., 1995b). Portanto, nesse tipo de síntese, estabelece-se que a polimerização seja mediada por ligação covalente, garantindo uma maior seletividade ao MIP, enquanto a religação do analito durante a utilização do material ocorra por interações não-covalentes, o que facilita o processo de eluição do analito. Uma das principais vantagens desse tipo de abordagem para síntese de MIPs se dá devido a menor proporção entre MM e MF ser necessária (geralmente 1:1 ou 1:2) quando comparado com a síntese não-covalente em que as proporções variam de 1:4 a 1:8, resultando no aumento da seletividade devido a diminuição de sítios não-específicos causados pelo excesso de MF (BELTRAN et al., 2010; CHEN et al., 2016; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2019).

Os isocianatos vem sendo bastante empregado como MF em sínteses de MIPs por abordagem semi-covalente para diferentes MM. Do Ki e colaboradores (KI et al., 2002) preparam partículas de sílica esféricas molecularmente impressas para estrona. Para essa síntese, os autores empregaram a estrona como MM e o isocianato de 3-(trietoxisilil)propila (ICPTS) como MF. Assim, a reação para formação do complexo MM-MF ocorreu pela reação entre o grupo isocianato do MF com o grupo fenol da MM, formando uma ligação uretana estável a temperatura ambiente, mas que em altas temperaturas pode sofrer uma clivagem facilmente. Para essa clivagem térmica, os autores usaram uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e água a 180 °C, pois o DMSO em alta temperatura favorece a quebra da ligação uretana e assim, o grupo isocianato dissociado é convertido à um grupo amino na presença de água, conforme esquema a seguir. Wang e colaboradores também sintetizaram um MIP para estrona, empregando a mesma rota sintética para o complexo MM-MF, com a diferença neste caso o MIP foi sintetizado sob nanopartículas magnéticas (WANG et al., 2009)

Esquema 1. Esquema da reação de clivagem térmica entre um grupo fenol e um grupo isocianato.



Adaptado de (KI et al., 2002).

A estrona também foi escolhida por Do Ki e Chang (KI; CHANG, 2006) como a MM para a síntese de nanocápsulas molecularmente impressa. Neste trabalho, o complexo Estrona-Vinil foi sintetizado usando outro isocianato, o 3-isopropenil- α,α -dimetilbenzil (IPDMBI). No trabalho de Do Ki citado anteriormente, os autores não informaram a proporção molar entre a MM e o MF. Por outro lado, neste novo trabalho os autores descrevem a proporção molar entre Estrona e IPDMBI como sendo 1:1. Os isocianatos também foram empregados na síntese de MIPs semi-covalentes para Bisfenol A (GÜNEY; GÜNEY, 2017), colesterol (EFFTING et al., 2022), ambos empregando o ICPTS como MF e com rota sintética semelhante.

Além dos exemplos citados anteriormente, a abordagem semi-covalente também foi empregada para a síntese de materiais molecularmente impressos

para moléculas como compostos aromáticos policlorados (LUBKE; WHITCOMBE; VULFSON, 1998), colesterol (WHITCOMBE et al., 1995a), propazina (CACHO et al., 2006), fenóis (QI et al., 2010) e *Orange II* (ZHAN et al., 2013).

Uma característica em comum observada nesses trabalhos está no tipo de MM utilizada: geralmente moléculas grandes e com número limitado de grupos funcionais. Logo, a estratégia de síntese semi-covalente vem sendo empregada para moléculas com poucos locais de interação com o monômero funcional e, nestes casos, a impressão química via síntese não-covalente pode não ser muito eficiente. Nesse sentido, a síntese via semi-covalente também é chamada de impressão química sacrificial, pois um grupo de ligação entre a MM e o MF tem a função de anexar a MM ao MF durante a formação do polímero e atuar como espaçador sacrificial entre o MM e a funcionalidade ligada ao polímero, permitindo que a parte da molécula que não possui grupos funcionais capazes de interagir com o MF possa ser impressa na matriz polimérica devido ao volume ocupado, bem como evitar aglomeração estérica na etapa de religação não-covalente (KIRSCH et al., 2004; QI et al., 2010).

Vale ressaltar que até o presente momento, a literatura não reporta MIPs sintetizados via semi-covalente para moléculas polifuncionalizadas, como as TCs, sendo uma alternativa para mitigar a formação de sítios heterogêneos durante a síntese.

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para a síntese de MIPs. A escolha dessa estratégia é influenciada pelas características que cada uma delas apresenta em função da finalidade pretendida para o uso do MIP em diferentes áreas. Como observado no Quadro 1, as metodologias mais empregadas para a síntese dos MIPs para TCs são *bulk* e polimerização por precipitação. Essas metodologias também são amplamente empregadas na síntese de MIPs em geral, além de outras metodologias como polimerização por suspensão, impressão em superfície, sol-gel, emulsão, entre outros também podem ser adotados (CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; ESTEBAN, 2019).

A polimerização em *bulk*, ou em massa, é o primeiro e mais empregado método de polimerização para síntese de MIPs, devido a sua simplicidade de operação. Basicamente, a síntese por esse método ocorre em sistema

homogêneo, envolvendo a mistura de todos os reagentes (MM, MF, SP, AR e IR) e, por meio de estímulos térmico ou fotoquímicos, inicia-se a reação de polimerização. Ao final, obtém-se uma massa polimérica que necessita de pós-tratamentos que incluem moagem e peneiramento para obtenção de partículas menores, seguido da lavagem com solvente para retirada da MM. Apesar de ser bastante popular, o método apresenta algumas desvantagens como poucos locais de reconhecimento específicos, provocando uma cinética de ligação lenta e baixa capacidade de ligação, além de que os materiais apresentam matriz heterogêneas devido à falta de controle sobre o processo de polimerização com esse método. Ainda, a necessidade da etapa de moagem pode causar a destruição de sítios e os materiais podem apresentar partículas com tamanhos e formas diferentes (CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; TURIEL; ESTEBAN, 2019).

A polimerização por precipitação, análogo ao método de polimerização em *bulk*, utiliza volumes superiores do SP (de 2 a 10 vezes mais) a fim de impedir a formação da massa polimérica. Esse método baseia-se no crescimento de cadeias poliméricas, que ao atingir um determinado comprimento durante a reação, tornam-se insolúvel no SP e conseqüentemente precipitam. O AR proporciona rigidez suficiente para impedir que as partículas coalesçam, dispensando o uso de outros agentes estabilizantes. Ainda, a agitação constante durante o processo pode favorecer a formação de partículas mais homogêneas. Ao final, obtém-se um material com tamanho e partículas mais uniformes e tem-se um maior rendimento em relação a polimerização em *bulk* (CHEN et al., 2016; TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, 2005; VASAPOLLO et al., 2011; WULFF, 2013).

A revisão da literatura para MIPs para TCs nos permitiu inferir também que a grande maioria das sínteses desses materiais ocorrem via radicais livres. Aliás, esse mecanismo é o principal e mais utilizados em sínteses de polimerização em geral, em que a quebra de uma dupla ligação da unidade manométrica é convertida em um radical de propagação ativo (DAOUD ATTIEH et al., 2017). Entre as principais vantagens desse tipo de polimerização é que esta pode ocorrer em condições brandas de reação, como pressão e temperatura ambiente, por exemplo. Em contrapartida, aspectos como o crescimento rápido da cadeia polimérica e a reação de terminação irreversível

mostram-se como limitações pois afetam o grau de distribuição do peso molecular da estrutura do material sintetizado (BEYAZIT et al., 2016; CORMACK; ELORZA, 2004).

Diante do exposto, vimos que os inúmeros MIPs reportados para TCs foram sintetizados por uma abordagem não covalente, empregando o MAA como principal e mais utilizado MF para essas sínteses, visto que ele interage com as TCs por ligações de hidrogênio. Entretanto, pôr as TCs apresentarem diferentes grupos funcionais, a síntese via abordagem não covalente pode gerar diferentes sítios de interação e, por consequência, diferentes conformações de interação MF e template gerando sítios com impressão química não homogêneos.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi sintetizar um novo MIP para TC empregando a abordagem semi-covalente através da ligação termicamente reversível entre TC (MM) e isocianato de 3-isopropenil- α,α -dimetilbenzil (IPDMBI) (MF). A reação para formação do complexo MM-MF ocorreu pela reação entre o grupo isocianato do MF com o grupo hidroxila da TC, formando uma ligação uretana estável a temperatura ambiente, mas que sofre clivagem térmica em altas temperaturas. A clivagem térmica ocorreu empregando uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e água a 160 °C, pois o DMSO em alta temperatura favorece a quebra da ligação uretana e o grupo isocianato dissociado é convertido à um grupo amino na presença de água, permitindo que na religação com a TC possam ocorrer ligações hidrogênio.

Cabe salientar que até o presente momento, não há relatos na literatura sobre o uso deste tipo de abordagem de síntese para moléculas polifuncionalizadas e, portanto, esse é o primeiro trabalho da literatura a avaliar a impressão química semi-covalente para TC.

O novo polímero sintetizado foi usado como adsorvente em extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para determinação de TC em amostras alimentícias. Uma das principais vantagens em empregar o MISPE como preparo de amostra é obter um elevado fator de pré-concentração pois permite que elevados volumes de amostras possam ser pré-concentrados. Assim, o material sintetizado foi caracterizado por diversas técnicas e aplicados em experimentos de MISPE para determinação de TCs em amostras alimentícias como o leite.

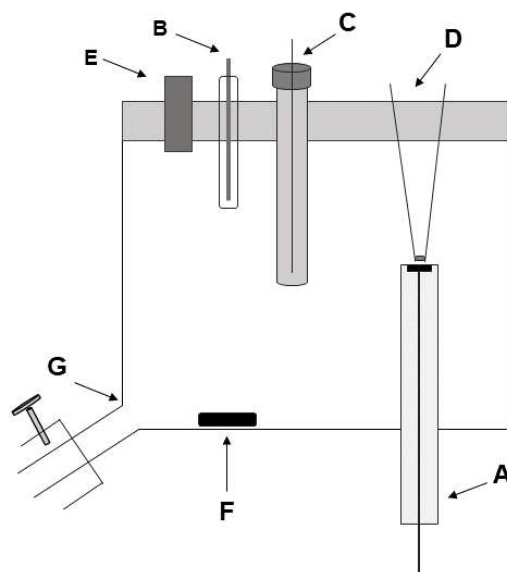
2.4 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA - BIA

Impulsionada pela crescente necessidade de realização de teste rápidos e seguros e, em algumas situações, obtenção de resultados em tempo real, a execução de análises *in situ* tornou-se crucial na área da química analítica. Reduzir os custos e superar os desafios associados ao transporte das amostras para o laboratório representa uma considerável dificuldade nesse campo de análise. Assim, o avanço de sistemas cada vez mais automatizados, com frequência analítica elevada e custos de análise reduzidos, mantendo, ao mesmo tempo, elevada precisão e exatidão, tem evoluído em consonância com a demanda por novas metodologias eficientes.

Nesse sentido, no início da década de 90, Wang e Taha (WANG; TAHA, 1991) propuseram um novo sistema baseado na análise por injeção em batelada (BIA, do inglês *Batch Injection Analysis*) para a realização de testes rápidos. Considerada um método relativamente jovem, o BIA tem ganhado popularidade na última década, sendo considerado uma alternativa aos métodos de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*). Ambos os sistemas, FIA e BIA, se baseiam no transporte hidrodinâmico do analito até a superfície do eletrodo de trabalho. No entanto, o princípio do sistema BIA consiste na injeção de pequenas quantidades de amostra com o auxílio de uma micropipeta diretamente sobre a superfície do detector, formando um arranjo *wall-jet*, que está imerso em um grande volume de solução (HAŠŠO; ŠVORC, 2022)

O sistema BIA inicialmente foi utilizado com detecção amperométrica e seu conceito pode ser explicado conforme Figura 6 que mostra um esquema da primeira montagem do sistema BIA. Assim, o sistema consiste em uma célula de acrílico, em que o eletrodo de trabalho (A) é fixado na base da célula. A ponteira da micropipeta (D) é fixada no orifício da tampa da célula em posição oposta ao eletrodo de trabalho, de modo que as injeções sejam feitas com a mesma distância entre a ponteira e a superfície do eletrodo. Na tampa superior da célula, há outros dois orifícios para acomodação dos eletrodos de referência (C) e auxiliar (B). O orifício (E) foi utilizado para inserção do eletrólito suporte, que foi mantido sob agitação (F), além de um ponto de drenagem (G) na base da célula (HAŠŠO; ŠVORC, 2022; WANG; TAHA, 1991).

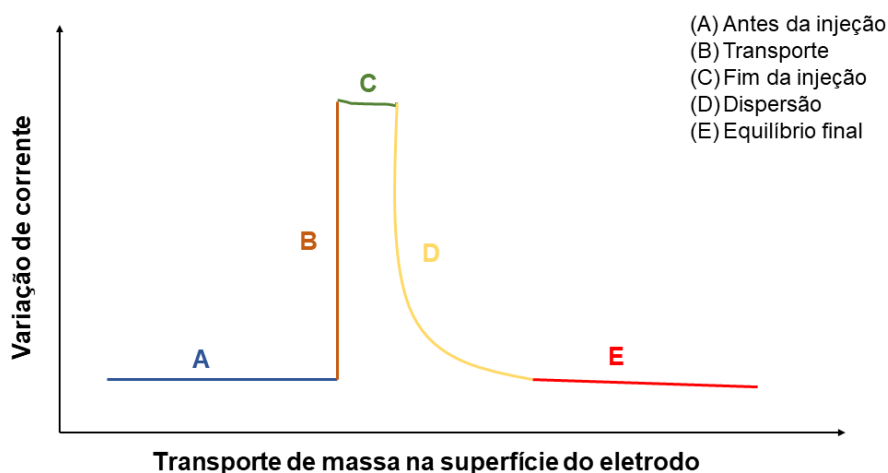
Figura 6. Diagrama esquemático da primeira célula BIA proposta por Wang e Taha em 1991, sendo (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo auxiliar, (C) eletrodo de referência, (D) ponteira da micropipeta, (E) orifício para introdução do eletrólito suporte, (F) barra magnética e (G) ponto de drenagem.



Fonte: Adaptado de (WANG; TAHA, 1991).

Similar ao sistema FIA, a passagem do analito pela superfície do eletrodo resulta em um sinal transiente (pico), o qual se obtém uma resposta proporcional de altura de pico de acordo com a concentração do analito, que pode ser explicada a cada etapa de injeção. A Figura 7 representa o processo de injeção e aquisição da resposta analítica no sistema BIA com detecção amperométrica. Assim, no ponto A, observa-se uma corrente constante antes da injeção, atribuída a corrente gerada a partir do eletrólito suporte, indicando que não há reação de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução. Após a injeção, o analito é transportado por convecção para a superfície do eletrodo e um rápido aumento de corrente é observado (B) devido ao processo redox do analito nesta superfície. À medida que a injeção é feita, o pico é formado até atingir um platô (C), no qual permanece por um curto intervalo de tempo. Em seguida, o analito é disperso no grande volume de solução presente e ocorre uma queda do sinal analítico (D) até atingir o equilíbrio e a linha de base seja retomada (E). Essa queda do sinal analítico ao final da injeção ocorre devido a mudança do transporte convectivo para o transporte difusional, sendo que este fenômeno pode ser acelerado com o uso de agitação mecânica ou magnética presente no interior da célula (HAŠŠO; ŠVORC, 2022; QUINTINO; ANGNES, 2004; RESENDE; SILVA; PEREIRA, 2020).

Figura 7. Representação esquemática do processo de injeção e aquisição do sinal analítico no sistema BIA.



Fonte: Adaptado de (HAŠŠO; ŠVORC, 2022; RESENDE; SILVA; PEREIRA, 2020).

Assim como em sistemas FIA, o fenômeno de passivação do eletrodo em sistema BIA é menor quando comparado com sistemas eletroquímicos estacionários, devido ao menor tempo de contato entre o analito e a superfície do eletrodo de trabalho (QUINTINO; ANGNES, 2004). Além disso, após a injeção ocorre uma alta diluição do volume injetado no grande volume de solução da célula, que permite diminuir a contaminação do eletrodo de trabalho e a realização de inúmeras análises sem que haja alterações na linha de base ou efeito de memória entre as medidas e, nem a necessidade de manipulação dos eletrodos e lavagem da célula utilizada (RESENDE; SILVA; PEREIRA, 2020).

Nos primeiros estudos, a reprodutibilidade dos resultados empregando o sistema BIA era mais baixa, em parte devido ao uso de pipetas manuais. Assim, a precisão das análises dependia da habilidade do operador em garantir a consistência na velocidade de injeção. Com a evolução da instrumentação analítica, a introdução das micropipetas eletrônicas com volume e velocidade de injeção programadas possibilitou uma grande melhoria dos resultados obtidos. É importante ressaltar que estes parâmetros (volume e velocidade de injeção) devem ser otimizados (QUINTINO; ANGNES, 2004; RESENDE; SILVA; PEREIRA, 2020). No entanto, devido ao custo elevado das micropipetas eletrônicas, estas não são facilmente encontradas em laboratórios de pesquisa,

podendo ser substituída por seringas manuais ou pipetas comuns. Nesses casos, para corrigir eventuais erros de variação de volume e velocidade de injeção, o uso de um padrão interno é necessário (GIMENES et al., 2012).

Ambos os sistemas BIA e FIA apresentam vantagens como rapidez, simplicidade, boa repetibilidade e sensibilidade, além de possibilitar trabalhar com baixos volumes de amostra e reagentes. Entretanto, o sistema BIA, quando comparado ao FIA, apresenta algumas limitações em procedimentos de derivatização e pré-tratamentos ou diluições *on-line* da amostra, além das possibilidades de automatização serem limitadas (HAŠŠO; ŠVORC, 2022; QUINTINO; ANGNES, 2004; STEFANO et al., 2016).

Apesar dessas limitações quando comparado aos sistemas FIA, o sucesso crescente dos sistemas BIA consiste em alguns fatores, como: o princípio hidrodinâmico da célula eletroquímica e seu arranjo “*wall-jet*”; possibilidade de injeções consecutivas da amostra e sem necessidade de diluição prévia, uma vez que a força iônica da solução se mantém praticamente inalterada, pois um pequeno volume de amostra é injetado em um grande volume de eletrólito suporte; menor geração de resíduos. Além disso, ao contrário do FIA, o sistema BIA elimina alguns problemas relacionados aos sistemas de fluxos como, por exemplo, uso de bombas e válvulas, visto que esses equipamentos possuem um custo elevado e ainda geram ruídos, bolhas e, em alguns casos, vazamentos constantes (HAŠŠO; ŠVORC, 2022; RESENDE; SILVA; PEREIRA, 2020; TORMIN et al., 2014; WANG; CHEN, 1994).

O sistema BIA também apresenta menor problema com lixiviação do material usado como modificador na superfície do eletrodo e/ou do analito como geralmente ocorre no sistema FIA, devido a ausência de soluções carregadoras em tempo integral, o que também contribui para a melhora da sensibilidade da análise já que há um menor efeito de dispersão da amostra. A simplificação e a robustez dos equipamentos, aliadas à facilidade de desenvolvimento de métodos analíticos portáteis, possibilitam a criação de procedimentos que podem ser usados para análises em campo ou no local específico de interesse (HAŠŠO; ŠVORC, 2022; RESENDE; SILVA; PEREIRA, 2020; TORMIN et al., 2014; WANG; CHEN, 1994).

A literatura reporta a associação do sistema BIA com diferentes técnicas de detecção, tais como calorimétricas, espectrofotométricas, potenciométricas,

voltamétricas e amperométricas. Assim como para o FIA, a amperometria é a técnica eletroquímica de maior associação com o BIA para a determinação de uma ampla variedade de analitos e em diferentes tipos de amostra (RESENDE; SILVA; PEREIRA, 2020). Para a determinação de tetraciclinas, segundo nossas pesquisas, há apenas dois trabalhos que empregam o sistema BIA em seus estudos.

No trabalho feito Faria e colaboradores (FARIA et al., 2019), os autores fazem uma comparação entre os métodos desenvolvidos usando um eletrodo modificado de óxido de grafeno reduzido (rGO) associados aos sistemas BIA e FIA para a determinação de TC em amostras de leite e formulações farmacêuticas. Ambos os métodos analíticos desenvolvidos apresentaram alta precisão, baixo LD, sendo de $1,17 \text{ mmol L}^{-1}$ para o FIA e $0,038 \text{ mmol L}^{-1}$ para o BIA, além de elevada frequência analítica e, precisão e exatidão adequada. No entanto, o método desenvolvido com o sistema BIA proporcionou maior sensibilidade e menor LD quando comparado ao método desenvolvido com o sistema FIA. Os autores atribuem os melhores resultados do método com BIA principalmente à alta velocidade de injeção do sistema.

Já no trabalho recentemente publicado por Lopes e colaboradores (LOPES et al., 2023), os autores fabricaram eletrodos de grafite e ácido polilático (Gr-PLA) impressos em 3D e acoplaram estes eletrodos no sistema BIA com detecção amperométrica para determinação de tetraciclina em amostras farmacêuticas, água de torneira e leite. Para diminuir problemas de efeito de memória durante as análises, os autores empregaram agitação e aplicação de potencial adicional como estratégia, o que conferiu desempenho analítico adequado ao método. O método desenvolvido por eles apresentou faixa linear de $0,5\text{-}50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LD de $0,19 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando valores de recuperação nas amostras na faixa de 92 a 117%.

3 OBJETIVO

Sintetizar, caracterizar e avaliar o desempenho do poli(1-(3-isopropifenil)- α,α -dimetilamina) (IPDMBA-MIP) como material adsorvente em extração em fase sólida (SPE) para a pré-concentração de Tetraciclina (TC) com posterior detecção eletroquímica em sistema de injeção em batelada (BIA), empregando um sensor eletroquímico modificado em nanopartículas de ouro (AuNPs), visando aplicação do método em amostras de leite.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito e concentração das AuNPs utilizadas para a modificação do eletrodo, bem como o potencial de oxidação da TC no eletrodo modificado usado no sistema BIA;
- Otimizar os parâmetros do sistema BIA, como velocidade e volume de injeção;
- Avaliar o desempenho analítico do sensor;
- Sintetizar o polímero impresso via estratégia semi-covalente com tetraciclina utilizando o IPDMBI como monômero funcional para a ligação covalente;
- Caracterizar o IPDMBA-MIP sintetizado empregando as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura e fisiossorção de gás N₂ a 77 K;
- Avaliar o efeito do pH na adsorção de TC no IPDMBA-MIP em meio aquoso;
- Avaliar a capacidade de adsorção do IPDMBA-MIP por meio de modelos cinéticos e isothermas de adsorção;
- Avaliar o efeito de impressão do polímero sintetizado em relação ao material controle IPDMBA-NIP (polímero sintetizado na ausência da molécula molde);
- Avaliar o desempenho do IPDMBA-MIP como adsorvente para pré-concentração de TC em meio aquoso;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de leite.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

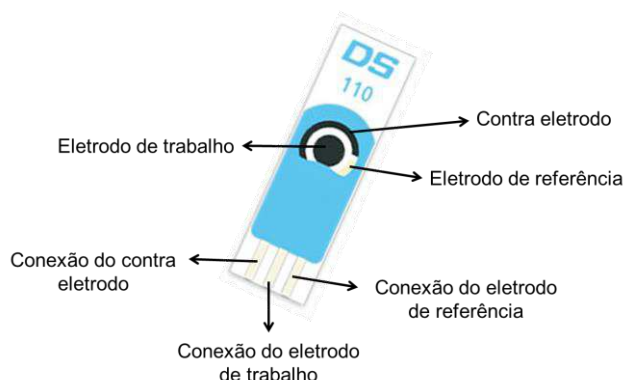
Todos os reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico ou HPLC. Tetraciclina.HCl (TC, $\geq 98,0$ %), clorotetraciclina.HCl (CTC, $\geq 98,0$ %), oxitetraciclina (OTC, $\geq 98,0$ %), ácido tetracloroáurico triidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99,9$ %), isocianato de 3-isopropenil- α, α -dimetilbenzil (IPDMBI, $\geq 95,0$ %), Tetrahidrofurano (THF, $\geq 99,0$ %), Etilenoglicol Dimetacrilato (EGDMA, $\geq 98,0$ %), 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN, $\geq 98,0$ %), hexacianoferrato de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\geq 99,0$ %), ácido oxálico ($\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$, $\geq 98,0$ %) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA) e utilizados sem purificação prévia. Metanol (MeOH , $\geq 99,9$ %) foi adquirido da Panreac® (Barcelona, Espanha) enquanto dimetilsulfóxido (DMSO, $\geq 99,0$ %) foi adquirido da Synth (Diadema, Brasil) e acetonitrila (ACN, $\geq 99,0$ %) da J. T. Baker®. A solução de tampão fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$) foi preparada a partir do sal fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\geq 99,0$ %) adquirido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA). Ácido bórico (H_3BO_3 , $\geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich), ácido acético (HAc, $\geq 99,8$ %, Sigma-Aldrich) e ácido fosfórico (H_3PO_4 , $\geq 85,0$ %, Merck®) foram usados para o preparo do tampão Britton-Robinson (BR) pela mistura de volumes apropriados da solução padrão de cada componente e, o pH final da solução foi ajustado com NaOH 50,0 % (m/v), de acordo com o desejado. O tampão EDTA-McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ foi preparado a partir da mistura de 334 mL de solução de ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹ e 209 mL de uma solução de hidrogeno fosfato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,0 ajustado com NaOH ou HCl, quando necessário), e então dissolução de 20,17 g de ácido etilenodiamino acético nesta solução. Todas as soluções utilizadas neste estudo foram preparadas com água ultrapura (18,2 MΩ cm) proveniente do sistema ELGA® PURELAB Maxima (Woodridge, IL, USA). Para evitar qualquer risco de contaminação, todas as vidrarias e plásticos utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram mantidas em solução de HNO₃ 10 % (v/v) por 24 horas e depois lavadas com água deionizada antes do uso.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Foram utilizadas micropipetas volumétricas de volumes variáveis com capacidade máxima de 20, 50, 200, 1000 e 5000 μL , sendo que todas continham ponteiros descartáveis de polietileno. Todas as pesagens foram feitas utilizando balança analítica (Marte, Modelo AY220), com precisão de $\pm 0,1$ mg. As medidas de pH das soluções foram feitas com um pHmetro Metrohm® pH827 lab digital (Herisau, Switzerland). Para separação das fases em solução, uma centrífuga QUIMIS® modelo 0222T2 (Diadema, São Paulo, Brasil) foi utilizada.

As medidas eletroquímicas envolvendo TCs foram realizadas empregando um potenciostato/galvanostato Palm Instruments BV® PalmSens (Houten, Netherlands), controlado pelo software Palm Instruments BV® PSTrace 5.3 (Houten, Netherlands) e equipado com um cabo conector para conectar o eletrodo impresso ao potenciostato. Todos os experimentos foram realizados utilizando eletrodos impressos de carbono (SPCEs) comerciais, consistindo de um arranjo em que os três eletrodos estão depositados em uma mesma placa de cerâmica de alumina, modelo DRP-110CNT da DropSens (Oviedo, Espanha). A placa com dimensões de 3,4 x 1,0 x 0,05 cm apresenta um disco de 4 mm de diâmetro (área geométrica) composto de tinta de carbono como eletrodo de trabalho (ET), um contra eletrodo (CE) de tinta de carbono e um eletrodo pseudo-referência de prata como eletrodo de referência (ER), conforme Figura 8.

Figura 8. Imagem de um eletrodo impresso de carbono com a descrição de seus componentes.

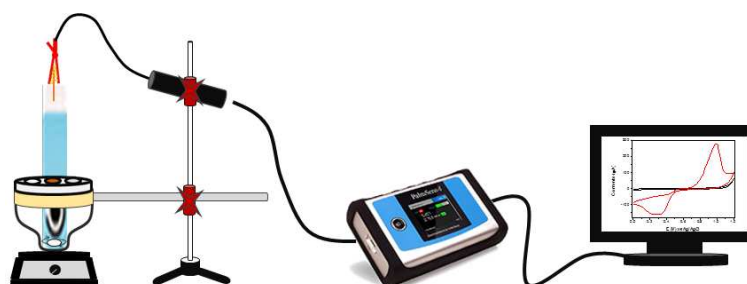


Fonte: Adpatado de (METROHM DROPSSENS, [s.d.]

Nas medidas voltamétricas estacionárias com o SPCE modificado com AuNPs (AuNPs/SPCE) foi utilizado uma célula eletroquímica de vidro, com

capacidade para 15,0 mL equipada com uma tampa de Teflon[®], conforme mostra a Figura 9. Foi empregado um sistema de agitação inserindo-se uma barra magnética dentro da célula, além de um agitador magnético (Modelo 751, Fisatom[®], São Paulo, Brasil).

Figura 9. Representação esquemática do sistema eletroquímico utilizado nas medidas voltamétricas estacionárias.



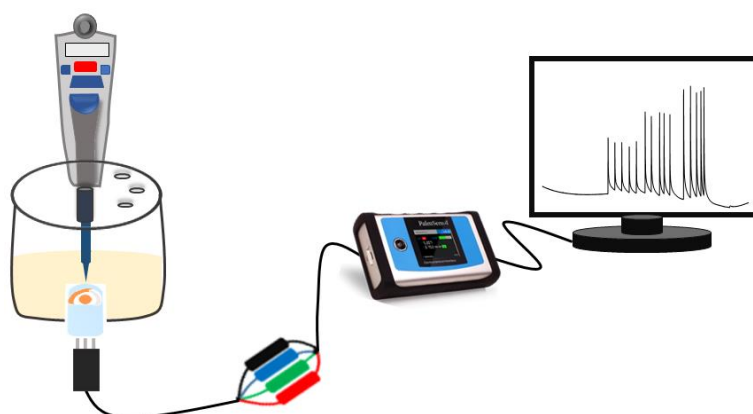
Fonte: A própria autora.

Para as medidas eletroquímicas dinâmicas com o sistema BIA, utilizou-se uma célula de polipropileno, em formato cilíndrico com capacidade de 150,0 mL, com dimensões de 8,0 cm de diâmetro interno e 6,0 cm de altura. Uma tampa também de polipropileno foi firmemente encaixada no topo do cilindro, e um orifício central foi feito na tampa e na base da célula. O AuNPs/SPCE é posicionado na base da célula com o auxílio de um *O-ring* (anel de borracha) que limita a região dos três eletrodos (ET, CE e pseudo-ER) em contato com o eletrólito suporte e evita vazamentos. No orifício central da tampa da célula é feito a inserção da micropipeta eletrônica para injeção das soluções, a qual é posicionada em uma configuração “*wall-jet*” (em oposição) a superfície do eletrodo, com uma distância de 2 mm entre a ponteira e a superfície do eletrodo, conforme Figura 10. Injeções de soluções padrões ou amostras foram feitas empregando uma micropipeta eletrônica Eppendorf[®] Multipipete E3, a qual permite injeções de 10,0 a 700,0 μL , usando uma ponteira do tipo Combitip[®] de 1,0 mL, em uma velocidade de injeção programável de 15,5 a 403,2 $\mu\text{L s}^{-1}$ (tendo 8 tipos de *speed*). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

Figura 10. (A) Fotos dos componentes e (B) representação esquemática do sistema BIA empregado nesta tese.



(A)



(B)

Fonte: A própria autora.

Análises cromatográficas foram realizadas a fim de identificar quais antibióticos tetracíclicos presentes nas amostras. Para isso, foi empregado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu LC-20AD/T LPGE KIT com detector de arranjo de diodos (DAD) (Tóquio, Japão) equipado com uma coluna cromatográfica Kinetex core-shell C18 (Phenomenex®, 250 mm x 4,6 mm de diâmetro, tamanho de partícula de 5 μm), protegida por uma coluna guarda (Phenomenex®, 4,0 mm x 3,0 mm, tamanho de partículas de 5 μm), operando isocriticamente a temperatura de 40 °C, com injeção manual de 20 μL e fluxo de

1,0 mL mim^{-1} . A fase móvel constituiu-se de ácido oxálico 0,01 mol L^{-1} e ACN (77,5:22,5; v/v). O comprimento de onda para detecção foi fixado em 360 nm.

4.3 MODIFICAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO COM AS NANOPARTÍCULAS DE OURO, CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA E OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA BIA

As AuNPs foram eletrodepositadas na superfície do SPCE por voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry, CV*), em uma janela de potencial de 0,0 a 1,1 V com velocidade de varredura de 50,0 mV s^{-1} por 10 ciclos, usando 4,0 mmol L^{-1} de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em KCl 0,1 mol L^{-1} (DEVKOTA et al., 2018).

A área eletroativa dos eletrodos SPCE não modificado e AuNPs/SPCE foram determinadas empregando CV com base na Equação de Randles-Sevick (Equação (1)) utilizando uma solução de hexacianoferrato de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} (ASADOLLAHI-BABOLI; MANI-VARNOSFADERANI, 2014).

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad \text{Equação (1)}$$

em que I_p é a corrente de pico anódica e catódica (A), A é a área eletroativa do eletrodo (cm^2), n é o número de elétrons envolvidos na reação redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ (1), C_0 é a concentração da solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1,0 $\mu\text{mol cm}^{-3}$), $v^{1/2}$ é a raiz quadrada da velocidade de varredura (V s^{-1}) e D_0 é o coeficiente difusional ($7,60 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (BARD; FAULKNER, 1980; KONOPKA; MCDUFFIE, 1970; ROCHA et al., 2020). Assim, variou-se a velocidade de varredura (VV) de 10,0 a 100,0 mV s^{-1} , e a partir da relação linear entre a raiz quadrada da velocidade de varredura e a corrente, foi possível determinar a área eletroativa de ambos os eletrodos.

Os experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato Palm Instruments BV® PalmSens (Houten, Netherlands) e um notebook com o software Palm Instruments BV® PStace 4.4 (Houten, Netherlands), com uma solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . As medidas foram feitas com variação de frequência de 100,0 KHz a 10,0 mHz, com potencial de 105,0 mV,

correspondente ao potencial de meia onda calculado para sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, e amplitude de potencial de 10,0 mV.

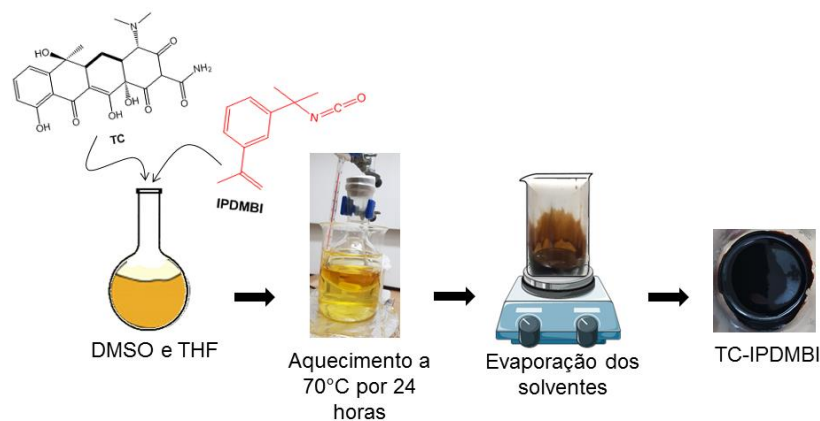
Estudos iniciais do comportamento voltamétrico da TC foram feitos utilizando CV em uma janela de potencial de 0,0 a 1,4 V, com uma velocidade de varredura de $100,0 \text{ mV s}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5) como eletrólito suporte. O efeito do pH do eletrólito suporte, 2,5 a 7,5, foi estudado usando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando CV de 0,0 a 1,2 V.

Os parâmetros relacionados ao sistema BIA com detecção amperométrica (BIA-AD), incluindo potencial de oxidação, volume injetado e velocidade de injeção foram otimizados. O potencial de oxidação foi estudado de 0,5 a 1,4 V. O volume de injeção foi estudado de 10 a 700 μL , enquanto a velocidade de injeção foi estudada de $15,5$ a $403,2 \mu\text{L s}^{-1}$. Os estudos foram realizados usando uma solução padrão de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5). Cabe salientar que, a escolha de cada parâmetro do sistema BIA-AD foi pautada na melhor resposta analítica em termos de corrente (μA) em um estudo univariado.

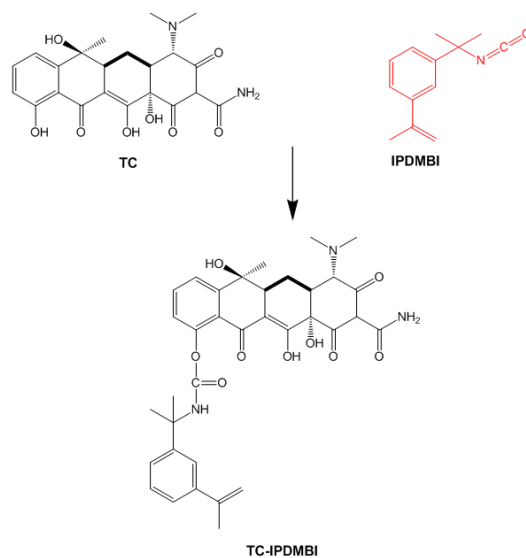
4.4 SÍNTESE DO MIP E NIP

Primeiramente, foi realizado a síntese do composto TC-IPDMBI, tendo como finalidade a formação de um complexo entre a molécula molde (TC) e monômero funcional (IPDMBI), segundo procedimento sugerido por Ki e Chang (KI; CHANG, 2006) com algumas modificações. Assim, 2,0 mmol (0,96 g) de TC (MM) foram dissolvidos em 10,0 mL de DMSO em um balão de fundo redondo de 150,0 mL. A mistura foi mantida em ultrassom por 30 segundos para completa dissolução. Em seguida, foram adicionados 2,0 mmol (420,0 μL) de IPDMBI e 30,0 mL de THF. O frasco foi selado e mantido em banho de óleo por 24 horas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, os solventes foram evaporados em chapa de aquecimento a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e um líquido viscoso foi obtido. A Figura 11 apresenta as etapas da síntese e uma representação esquemática da ligação TC-IPDMBI.

Figura 11. (A) Esquema representativo da síntese e (B) Proposta de reação para formação do complexo TC-IPDMBI.



(A)



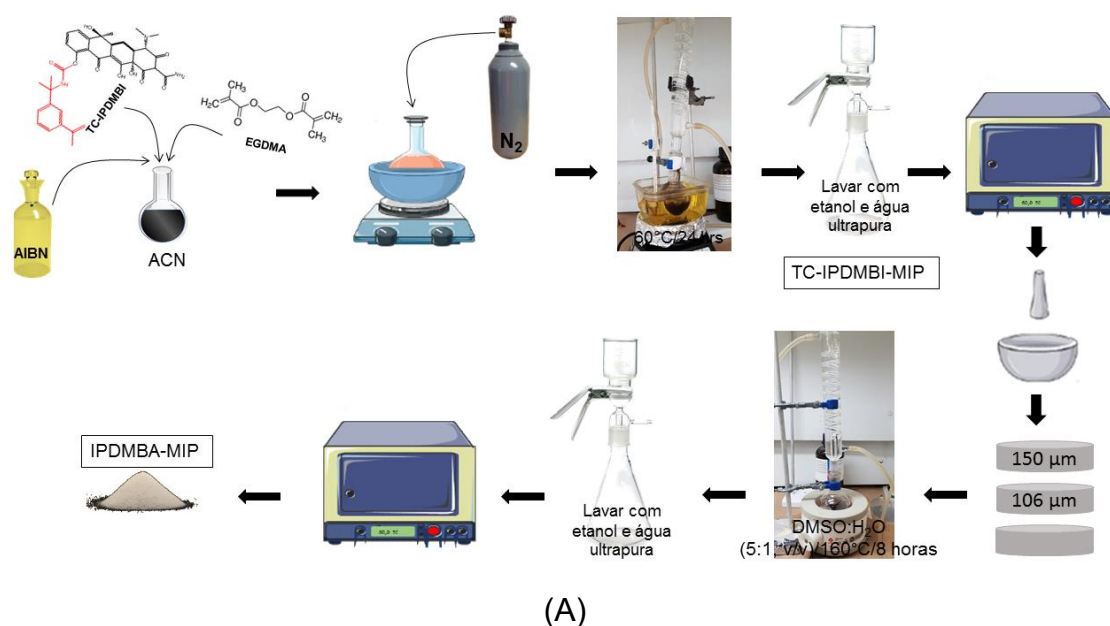
(B)

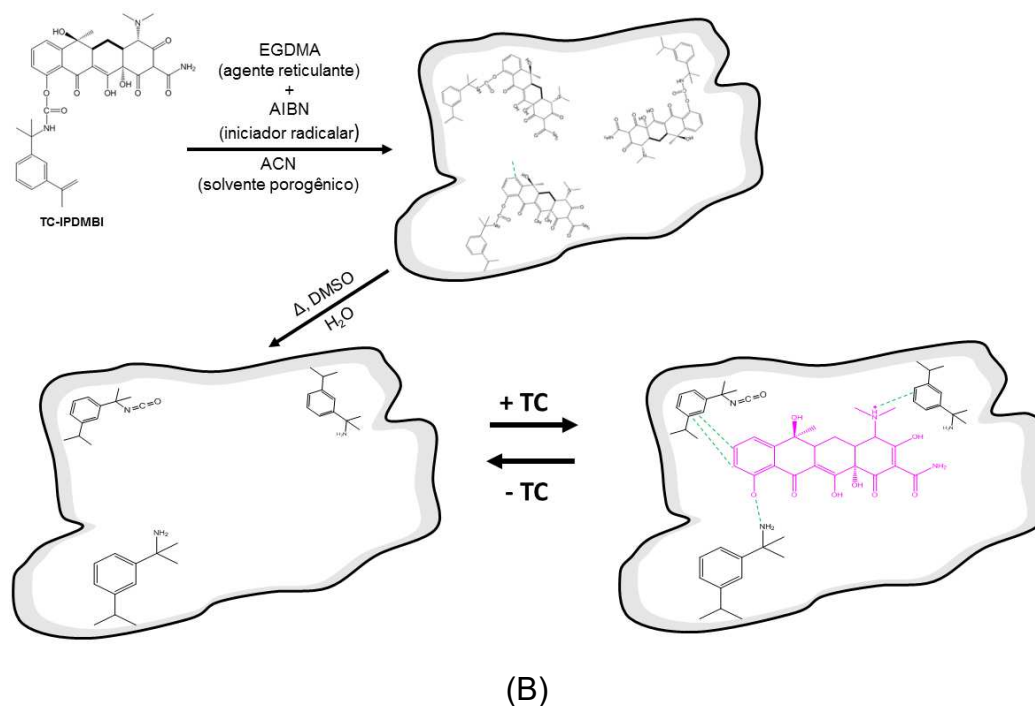
Fonte: A própria autora.

Para a síntese do MIP foi empregada a polimerização por precipitação, em que 0,8 g do produto TC-IPDMBI foi dissolvido em 10,0 mL de ACN em um balão de fundo redondo de 100,0 mL. Em seguida, foram adicionados 25,0 mmol (4,81 mL) do agente de ligação cruzada EGDMA, 50,0 mg do iniciador radicalar AIBN e 20,0 mL de ACN. Agitou-se manualmente a mistura e gás nitrogênio foi borbulhado na solução por 10 minutos. O frasco foi então selado e mantido em banho de óleo por 24 horas a 60 °C sob agitação magnética. O material polimérico obtido denominado TC-IPDMBI-MIP foi filtrado a vácuo, lavado com etanol e água ultrapura e depois seco em estufa a 60 °C por 48 horas. O polímero foi macerado, peneirado e com as partículas entre 106-150 µm foi feita a

clivagem para extração da molécula molde (TC) com uma solução mista de DMSO e água 5:1 (v/v), aquecida a 160 °C durante 8 horas. O produto obtido denominado IPDMBA-MIP foi novamente filtrado a vácuo e lavado com etanol e água ultrapura e depois seco em estufa a 60 °C por 48 horas. O polímero controle (NIP) foi preparado pelo mesmo procedimento, sem a etapa de ligação entre a MM e o MF, adicionando apenas o IPDMBI e assim, obtendo-se um pó branco como produto final (IPDMBA-NIP). A representação esquemática da síntese e possível estrutura do polímero IPDMBA-MIP esta apresentada na Figura 12.

Figura 12. (A) Representação esquemática do processo de síntese e (B) estrutura do polímero IPDMBA-MIP.





Fonte: A própria autora.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

O polímero impresso com TC (TC-IPDMBA-MIP), o polímero após a remoção da TC (IPDMBA-MIP) e o polímero controle (IPDMBA-NIP) foram caracterizados a fim de se compreender os diferentes aspectos relacionados ao processo de polimerização e seus efeitos nas propriedades térmicas, morfológicas, texturais, entre outros, desses materiais.

4.5.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A fim de avaliar qualitativamente os principais grupos funcionais presentes nos materiais sintetizados e seus precursores, foram obtidos espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), empregando um espectrofotômetro infravermelho módulo ATR (Reflexão Total Atenuada) acoplado do modelo Bruker® Vertex 70 com acessório de refletância Platinum ATR. Os espectros foram obtidos no intervalo de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e usando 16 scans. As análises foram realizadas no

Laboratório de Química Prébiótica (LQP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.5.2 Análise textural por Fisissorção de Gás N₂ a 77 K

Os materiais poliméricos foram caracterizados quanto as suas propriedades texturais como área superficial específica, diâmetro médio e volume total dos poros. Tais propriedades foram calculadas por meio de isotermas de sorção física de gás nitrogênio a 77 K, empregando um equipamento Quantachrome® Nova 1200e (Boyton Beach, FL, USA). Para estas análises, 100,0 mg dos materiais foram aquecidos a 120 °C durante 4 horas sob vácuo para eliminação de água adsorvida. Posteriormente, foi realizado o processo de adsorção e dessorção de gás nitrogênio. O modelo matemático multipontos BET (Brunauer, Emmet e Teller) foi usado para calcular a área superficial específica, e o modelo BJH (Barret, Joyner, Halenda) foi usado para determinar o diâmetro médio e volume total dos poros. Cabe salientar que todos os valores foram calculados a partir da massa seca dos materiais. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuários do Departamento de Química da UEL.

3.5.3 Análise Morfológica

Características morfológicas dos materiais sintetizados foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura empregando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips® FEI Quanta-200 (FEI Company, Scientific and Technical Instruments, Oregon, USA). Para estas análises, as amostras foram dispersas em fita dupla face de carbono e revestidos com uma fina camada de ouro de 30 nm utilizando o equipamento Bal-Tec Med 020 Sputtern Coatter Leica® (Wetzlar, Alemanha). As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises (LMEM) na Central Multiusuária da UEL.

3.5.4 Análise Térmica

A análise termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG) permitem avaliar a estabilidade térmica dos materiais poliméricos. Assim, aproximadamente 10,0 mg de cada polímero foram submetidos a aquecimento que variou de 30 °C até 900 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL min⁻¹, empregando o equipamento PerkinElmer® TGA 4000 (Massachusetts, USA). As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (LABSPEC), na Central Multiusuária da UEL.

3.5.5 Análise Elementar

A porcentagem molar de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente nos polímeros foi determinada usando um Analisador Elementar Perkin Elmer® 2400 Series II (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuários do Departamento de Química da UEL.

4.6 EFEITO DO PH NA ADSORÇÃO DE TETRACICLINA

A influência do pH na adsorção de TC no material IPDMBA-MIP foi estudada na faixa de pH de 3,0 a 9,0, os quais foram ajustados com soluções de HCl (0,01 e 0,1 mol L⁻¹) e NaOH (0,01 e 0,1 mol L⁻¹). O estudo foi realizado também utilizando tampão BR 0,01 mol L⁻¹. Em um tubo Falcon®, foram adicionados 10,0 mg do material IPDMBA-MIP e 10,0 mL de uma solução de TC 100,0 µmol L⁻¹ em diferentes valores de pH (na presença e na ausência de tampão), o qual foi agitado por 2 minutos em sistema auxiliado por vórtex. Os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, a solução foi centrifugada a 3200 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de PTFE 0,45 µm e injetados diretamente no sistema BIA-AD, em que 200 µL de cada amostra foram injetados a uma velocidade de injeção de 123 µL s⁻¹, com um potencial de aplicação de 1,2 V em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5). O valor reportado para este estudo corresponde à média de n=3 com seu respectivo DP.

4.7 PONTO DE CARGA ZERO (PCZ)

Para este estudo, seguiu-se a metodologia empregada por Suquila e colaboradores (2018) com algumas modificações (SUQUILA; OLIVEIRA; TARLEY, 2018). Assim, 20,0 mg de material (IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP) foram pesados e adicionados em um tubo falcon de 15,0 mL. Aos tubos, foram adicionados 10,0 mL de uma solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH, em uma faixa de 3,00 a 12,00, ajustados com soluções de HCl e NaOH 0,01 mol L⁻¹. Os tubos foram mantidos em agitação por 24 horas. Após este período, novamente foi feita a leitura do pH da solução. A determinação do pH_{PCZ} é dada pela diferença entre a quantidade de íons H⁺ ou OH⁻ adsorvidos pelos materiais a partir da diferença entre o pH inicial e final da solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (BABÍĆ et al., 1999; CARNEIRO et al., 2013). Assim, construiu-se gráficos de pH_{inicial} versus pH_{final} para cada material, sendo o pH_{PCZ} o valor no qual o pH_{final} se mantém constante independentemente do pH_{inicial}, ou seja, valor no qual a superfície do material se comporta como tampão (FREITAS; CÂMARA; MARTINS, 2015; GUILARDUCI et al., 2006). O valor reportado para este estudo corresponde à média de n=3 com seu respectivo desvio padrão (DP).

4.8 CINÉTICA DE ADSORÇÃO DA TETRACICLINA

Estudos em batelada foram realizados para avaliar o efeito do tempo de contato no qual a TC atinge o equilíbrio no processo adsorptivo nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. Para tanto, 10,0 mg de polímero foram pesadas e adicionadas em tubos falcon (15,0 mL). Aos tubos foram adicionados 10,0 mL de uma solução de TC 100,0 µmol L⁻¹ em pH 5,0. Os tubos foram agitados em diferentes tempos variando de 30 s a 60 minutos utilizando um homogeneizador de solução. Em seguida, as misturas foram centrifugadas, filtradas com membrana de PTFE 0,45 µm e injetados no sistema BIA-AD, em que 200 µL de cada amostra foram injetados a uma velocidade de injeção de 123 µL s⁻¹, com um potencial de aplicação de 1,2 V em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5). A

quantidade de TC adsorvida (Q_t , mg g^{-1}) nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP foi calculada de acordo com a Equação (2):

$$Q_t = \frac{(C_i - C_f) \times V}{m} \quad \text{Equação (2)}$$

em que Q_t é a quantidade de analito adsorvido por grama de adsorvente (mg g^{-1}), C_i é a concentração inicial do analito (mg L^{-1}) e C_f é a concentração do analito no sobrenadante (mg L^{-1}) após a agitação, m é a massa do sorvente (g) e V é o volume da solução (L) utilizado (CASARIN et al., 2018; FREITAS et al., 2019; PRETE; TARLEY, 2019).

A fim de avaliar o processo de adsorção, foi aplicado aos dados cinéticos os modelos cinéticos não lineares de pseudo-primeira ordem (PPO) e pseudo-segunda ordem (PSO) e os modelos lineares de Elovich e difusão intrapartícula (LI; ZHANG, 2013; MA et al., 2019; PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009; WU; TSENG; JUANG, 2009a; YU; MA; HAN, 2014; ZANG et al., 2019).

O modelo não linear de pseudo-primeira ordem (PPO), também conhecido como modelo de Langergren, pressupõe que a taxa de adsorção é proporcional ao número de sítios ativos livres presente no material adsorvente e a diferença da concentração de saturação. Assim, com este modelo admite-se uma homogeneidade de energia dos sítios ativos, podendo predizer que o adsorvato liga-se apenas a um sítio ativo na superfície do adsorvente, por um processo de fisissorção (PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009). Normalmente, o modelo de PPO ajusta-se melhor a tempos iniciais de adsorção, pois assume-se que no início da adsorção há uma quantidade de sítios ativos livres maior que no equilíbrio (NASCIMENTO et al., 2020; OLIVEIRA; SEGATELLI; TARLEY, 2016; PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009). O modelo cinético não linear de PPO é descrito pela Equação (3), bem como sua forma linearizada representada pela Equação (4). (LAGERGREN, 1898):

$$Q_t = Q_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Equação (3)}$$

$$\log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad \text{Equação (4)}$$

em que Q_e (mg g^{-1}) e Q_t (mg g^{-1}) são a quantidade de adsorvato adsorvidas por grama de adsorvente no equilíbrio e no tempo t , respectivamente, e k_1 é a constante da taxa de sorção de pseudo-primeira ordem (min^{-1}).

O modelo cinético não linear de pseudo-segunda ordem (PSO) abrange o comportamento do processo cinético em toda a faixa de tempo de contato, considerando a quimissorção como etapa limitante do processo. O modelo de PSO considera que a velocidade de ocupação dos sítios de adsorção é proporcional ao quadrado de sítios ativos, além de admitir que os sítios ativos possuem diferentes energias de adsorção (HO; MCKAY, 1999; MA et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009). O modelo cinético não linear de PSO é descrito pela Equação (5) e pela forma linearizada (Equação (6)):

$$Q_t = \frac{Q_e^2 k_2 t}{k_2 Q_e (t + 1)} \quad \text{Equação (5)}$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad \text{Equação (6)}$$

em que, Q_e (mg g^{-1}) e Q_t (mg g^{-1}) são a quantidade de adsorvato sorvidas por grama de adsorvente no equilíbrio e no tempo t , respectivamente, e k_2 é a constante da taxa de sorção de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

O modelo linear de Elovich considera que a superfície do material é energeticamente heterogênea, sendo complementar ao modelo de PSO. Este modelo caracteriza-se por descrever a cinética de adsorção em duas etapas, em que a etapa rápida está relacionada com a quantidade de sítios ativos livres, pois nos primeiros tempos de contato a adsorção ocorre rapidamente na camada externa do adsorvente, enquanto a etapa lenta refere-se a processos de difusão do analito para o interior e exterior dos poros do adsorvente (AZIZIAN, 2004; NASCIMENTO et al., 2020; QIU et al., 2009; WU; TSENG; JUANG, 2009b). O modelo de Elovich pode ser representado pela Equação (7):

$$Q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t \quad \text{Equação (7)}$$

em que α representa a taxa de adsorção inicial ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$), β é a constante relacionada com a extensão da superfície e a energia de ativação (g mg^{-1}) e Q_t (mg g^{-1}) é a quantidade de adsorvato sorvida por grama de adsorvente no tempo t .

O modelo cinético de difusão intrapartícula assume que a etapa limitante da taxa de adsorção é dada pela difusão interna, pois esta é considerada lenta frente às demais etapas. Geralmente, este modelo apresenta uma

multilinearidade, indicando que diferentes processos de adsorção podem estar ocorrendo no material, pois em uma primeira etapa tem-se o adsorvato difundindo-se da solução para a camada externa do adsorvente, seguido por uma difusão intrapartícula que seria a etapa limitante e por fim, a última etapa demonstrando a fase de equilíbrio do processo (CLAUSEN; PIRES; TARLEY, 2014; NASCIMENTO et al., 2020; NAZARI; ABOLGHASEMI; ESMAIELI, 2016; OLIVEIRA; SEGATELLI; TARLEY, 2016). O modelo de difusão intrapartícula, descrito em um único estágio, é expresso pela Equação (8):

$$Q_t = k_{id}t^{1/2} + C \quad \text{Equação (8)}$$

em que k_{id} é a constante de difusão intrapartícula ($\text{mol g}^{-1} \text{min}^{1/2}$) e C a espessura da camada limite (mg g^{-1}). A partir desse modelo, pode-se inferir ainda que além da difusão intrapartícula, outros processos também controlam a velocidade de sorção (NASCIMENTO et al., 2020; PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009).

4.9 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DA TETRACICLINA

As isotermas de adsorção foram construídas a partir de experimentos em batelada. Assim, aos tubos falcon (15,0 mL) foram adicionadas 10,0 mg de polímero (IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP) e 10,0 mL de solução de TC com concentrações que variaram de 10,0 a 3000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (4,44 mg L^{-1} a 1,33 g L^{-1}) em pH 5,0. Os tubos foram agitados durante 15 minutos utilizando um homogeneizador de solução. Em seguida, as misturas foram centrifugadas, e os sobrenadantes foram filtrados com membrana de PTFE 0,45 μm e injetados no sistema BIA-AD em que 200,0 μL de cada amostra foram injetados a uma velocidade de injeção de 123 $\mu\text{L s}^{-1}$, com um potencial de aplicação de 1,2 V em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5). Os dados experimentais foram ajustados aos modelos não lineares de Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich para um e dois sítios de interação, descritos a seguir (BERGMANN; MACHADO, 2015; CASARIN et al., 2018; PRETE et al., 2019). A quantidade de TC adsorvida em cada material foi calculada de acordo com a Equação (9):

$$Q_e = \frac{(C_i - C_f) \times V}{m} \quad \text{Equação (9)}$$

em que Q_t é a quantidade de analito adsorvido por grama de adsorvente (mg g^{-1}), C_i é a concentração inicial do analito (mg L^{-1}) e C_f é a concentração do analito no sobrenadante (mg L^{-1}) após a agitação, m é a massa do sorvente (g) e V é o volume da solução (L) utilizado (CASARIN et al., 2018; FREITAS et al., 2019; PRETE; TARLEY, 2019).

O modelo de Langmuir, um dos mais utilizados para representar processos adsorptivos, confere os pressupostos de que a adsorção máxima ocorra em monocamada com saturação da superfície do adsorvente. Assim, o modelo assume a existência de um número fixo e energeticamente equivalentes de sítios específicos de adsorção e, em cada um destes sítios apenas uma molécula é adsorvida, não havendo assim, interação entre as moléculas adsorvidas (BERGMANN; MACHADO, 2015; CASARIN et al., 2018; LANGMUIR, 1918; PRETE et al., 2019). A Equação (10) representa o modelo de Langmuir:

$$Q_e = \frac{K_L \times b \times C_{eq}}{(1 + K_L \times C_{eq})} \quad \text{Equação (10)}$$

em que K_L (L mg^{-1}) é a constante de Lagmuir relacionada com a afinidade adsorvato-adsorvente, b (mg g^{-1}) é a capacidade máxima de adsorção ou número de sítios disponíveis na monocamada do adsorvente e Q_e (mg g^{-1}) e C_{eq} (mg L^{-1}) representam a concentração em equilíbrio na fase sólida e líquida, respectivamente.

O modelo de Freundlich considera a formação de múltiplas camadas com uma distribuição não uniforme de adsorção. Logo, o modelo sugere que a superfície do adsorvato é energeticamente heterogênea e que a adsorção ocorre em múltiplas camadas. Além disso, assume que a concentração do adsorvato na superfície do adsorvente aumenta com o aumento da concentração do adsorvato e permite interações entre as moléculas adsorvidas (AGARRY; OGUNLEYE, 2014; BERGMANN; MACHADO, 2015; CASARIN et al., 2018; PRETE et al., 2019). O modelo de Freundlich é representado pela Equação (11):

$$Q_e = K_F \times C_{eq}^{1/n} \quad \text{Equação (11)}$$

em que Q_e (mg g^{-1}) e C_{eq} (mg L^{-1}) representam a concentração em equilíbrio na fase sólida e líquida, respectivamente, K_F ($\text{mg}^{-1} \text{L}$) é a constante de Freundlich que indica a capacidade de adsorção e n é um parâmetro empírico relacionado a heterogeneidade da superfície do adsorvente e com a intensidade de adsorção. Uma análise da magnitude do expoente $1/n$ fornece indícios se a isoterma é favorável ou não. Assim, valores na faixa de $1 < n < 10$ indicam adsorção favorável (AGARRY; OGUNLEYE, 2014; NASCIMENTO et al., 2020).

Dentre os modelos de isotermas mais utilizados, destaca-se também o modelo híbrido de Langmuir-Freundlich para um e dois sítios de adsorção, os quais predizem que a superfície do material é formada por diferentes sítios de ligação. A combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich para um sítio, também conhecido como Equação de Sips (Equação (12)), assume que os sítios são energeticamente homogêneos. Em baixas concentrações de adsorvato, esse modelo se reduz ao de Freundlich, enquanto que em concentrações elevadas de adsorvato o modelo prediz uma capacidade de adsorção em monocamadas, característica do modelo de Langmuir (AGARRY; OGUNLEYE, 2014; CASARIN et al., 2018; PRETE et al., 2019).

O modelo de Langmuir-Freundlich para dois sítios de adsorção (Equação (13)) assume que o material adsorvente possui sítios de ligação energeticamente heterogêneos em sua superfície, com maior ou menor afinidade pelo adsorvato, de modo que em baixas concentrações, o adsorvato interage com sítios de maior afinidade, enquanto que em concentrações elevadas, o adsorvato interage com os sítios de menor afinidade (BERGMANN; MACHADO, 2015; CASARIN et al., 2018; PRETE et al., 2019).

$$Q_e = \frac{b \times (K \times C_{eq})^n}{1 + (K \times C_{eq})^n} \quad \text{Equação (12)}$$

$$Q_e = \frac{b_1 \times (K_1 \times C_{eq})^{n_1}}{1 + (K_1 \times C_{eq})^{n_1}} + \frac{b_2 \times (K_2 \times C_{eq})^{n_2}}{1 + (K_2 \times C_{eq})^{n_2}} \quad \text{Equação (13)}$$

Nas Equações 12 e 13, Q_e (mg g^{-1}) e C_{eq} (mg L^{-1}) representam a concentração em equilíbrio na fase sólida e líquida, respectivamente, K_1 e K_2 (L mg^{-1}) refere-se à constante de Langmuir-Freundlich para um ou dois sítios de ligação, b_1 e b_2 (mg g^{-1}) é a capacidade máxima de adsorção e n_1 e n_2 é um

parâmetro empírico relacionado a heterogeneidade da superfície do adsorvente e com a intensidade de adsorção.

Diferentes modelos de isotermas podem concordar, em maior ou menor extensão, com os dados experimentais. Parâmetros que estimam a concordância entre os valores experimentais e os preditos podem ser empregados para avaliar a qualidade dos ajustes. Para tais fins, comumente são empregados os parâmetros de coeficiente de determinação (R^2) e o qui-quadrado (χ^2). Quanto melhor a adequação do modelo aos dados experimentais, ou seja, quanto mais próximo os dados experimentais estiverem dos valores previsto pelo modelo, melhor será o ajuste. Assim, quanto mais baixo o valor de χ^2 e mais próximo de um o valor de R^2 , mais os dados experimentais se ajustam ao valor obtido pelo modelo (HO, 2004, 2006; NASCIMENTO et al., 2020).

4.10 ESTUDO DO EFEITO DE IMPRESSÃO QUÍMICA

Para avaliar o efeito de impressão química do IPDMBA-MIP em relação a TC, foram realizados estudos de adsorção em soluções binárias, contendo o analito (TC) e a molécula interferente. A impressão para a TC foi estudada frente a outras substâncias como: paracetamol (PAR), sulfametazina (SMZ) e sulfadiazina (SDZ) e para as moléculas análogas CTC e OTC. Para este estudo, 10,0 mg dos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP foram pesadas e adicionadas em tubos falcon (15,0 mL) e agitadas por 15 minutos com 5,0 mL de uma solução binária (TC:molécula interferente), ambos na concentração de 1,0 mg L⁻¹. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de PTFE 0,45 µm e injetados diretamente no sistema cromatográfico.

A partir desse estudo é possível determinar os coeficientes de distribuição (K_d), seletividade (k) e seletividade relativo (k'). O coeficiente de distribuição (K_d) é obtido pela Equação (14):

$$K_d = \left(\frac{C_i - C_f}{C_f} \right) \times \frac{V_s}{\text{massa polímero}} \quad \text{Equação (14)}$$

em que, C_i e C_f é a concentração inicial e a concentração final no sobrenadante (mL g⁻¹), V_s é o volume da solução (5,0 mL). Com os valores de K_d é possível

calcular o coeficiente de seletividade (k). Este coeficiente é definido como a razão entre o K_d do analito e o K_d do interferente, nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP (Equação (15)). Posteriormente, o coeficiente de seletividade é definido como a razão entre o k do polímero impresso pelo k do polímero não impresso, conforme Equação (16).

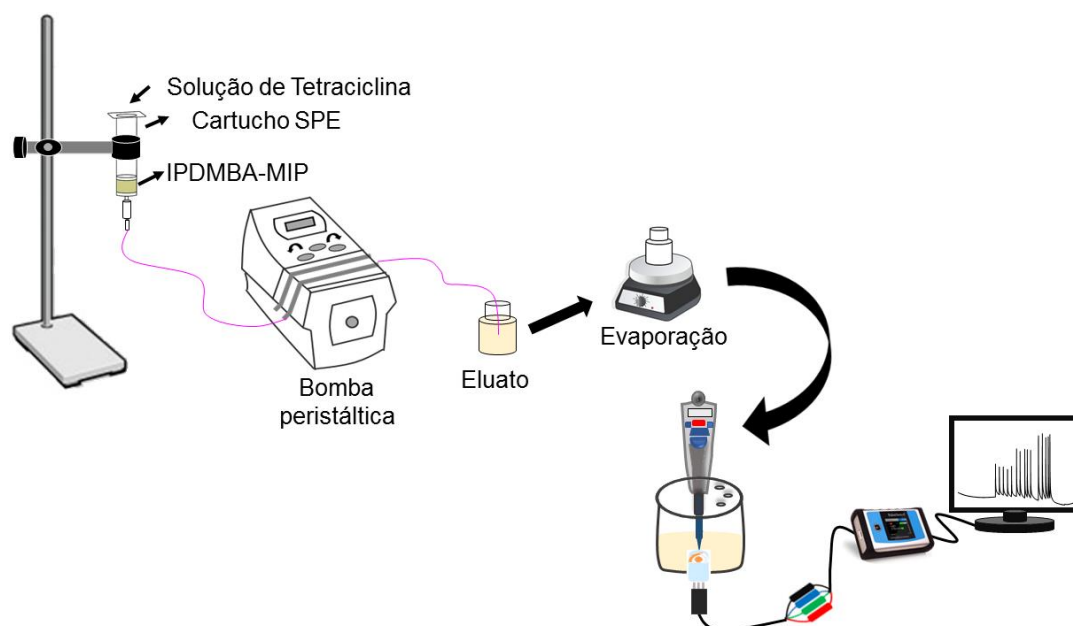
$$k = \frac{k_d(\text{analito})}{k_d(\text{interferente})} \quad \text{Equação (15)}$$

$$k' = \frac{k_{\text{impresso}}}{k_{\text{não impresso}}} \quad \text{Equação (16)}$$

4.11 SISTEMA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TC

Para a aplicação do método MISPE em condições otimizadas, 100,0 mg do IPDMBA-MIP foi usado para preencher um cartucho de SPE de 20,0 mL (14,0 x 1,5 cm d. i.) da Allcrom® com fritz de 20 μm (Allcrom®) em cada extremidade. Previamente, a coluna foi condicionada com água ultrapura, seguido da percolação de 50 mL de solução de TC em pH 5,0, com uma vazão de pré-concentração de 15 mL min^{-1} . A TC foi eluída com 3,0 mL de metanol contendo 0,5% de ácido acético com uma vazão de 2 mL min^{-1} . Para propulsão das soluções, foi utilizada uma bomba peristáltica GILSON Minipuls Evolution (Middleton, Wi, EUA), equipada com tubos Tygon®. O eluato foi evaporado em chapa de aquecimento a 50 °C, recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5) e injetado no sistema BIA-AD. Na Figura 13 está apresentado a etapa de pré-concentração *off-line* com posterior detecção no sistema BIA-AD.

Figura 13. Representação do sistema de pré-concentração *off-line* para tetraciclina com posterior detecção no sistema BIA-AD.



Fonte: A própria autora.

4.11.1 Estudo da Massa do Adsorvente IPDMBA-MIP na Adsorção de Tetraciclina

O cartucho (14,0 x 1,5 cm d. i.) de SPE de 20,0 mL foi preenchido com diferentes massas do IPDMBA-MIP, a saber 50,0, 100,0 e 200,0 mg. Inicialmente o cartucho foi condicionado com 10,0 mL de água ultrapura e, em seguida, foram percolados 20,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em pH 5,0. O efluente foi recolhido e injetado diretamente no sistema BIA-AD.

4.11.2 Estudo do Solvente de Eluição

Para a preparação do cartucho de IPDMBA-MIP, 100,0 mg do polímero foram inseridos em um cartucho de SPE de 20,0 mL (14,0 x 1,5 cm d. i.). Inicialmente o cartucho foi condicionado com 10,0 mL de água ultrapura e, em seguida, foram percolados 20,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em pH 5,0, com vazão de 2,0 mL min^{-1} . Foram avaliados como solventes de eluição MeOH, ACN, acetona e MeOH com HAc 0,5% utilizando alíquotas de 5,0 mL. Cabe salientar que para análise dos eluatos da coluna, estes foram evaporados à 50 °C em chapa de aquecimento, recuperados em 5,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5) e injetados no sistema BIA-AD.

4.11.3 Estudo da Vazão e Volume do Solvente de Eluição

Em um cartucho de SPE de 20,0 mL (14,0 x 1,5 cm d. i.), 100 mg de IPDMBA-MIP foram inseridos, condicionado com 10,0 mL de água ultrapura e, em seguida, foram percolados 20,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em pH 5,0, com vazão de 2,0 mL min^{-1} . Foram utilizados 5 mL da mistura MeOH com 0,5% de HAc para eluir o analito adsorvido na coluna. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, vazões de eluição de 0,5 a 5,0 mL min^{-1} foram estudadas.

Após a otimização da vazão do solvente de eluição, estudou-se também o efeito do volume do eluente, variando de 0,5 a 5,0 mL, necessário para uma eluição quantitativa de TC. Cabe salientar que para análise dos eluatos da coluna de cada estudo, estes foram evaporados à 50 °C em chapa de aquecimento, recuperados em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5) e injetados no sistema BIA-AD.

4.11.4 Estudo da Vazão na pré-Concentração de Tetraciclina

Para o estudo da vazão de pré-concentração de TC, 100,0 mg do polímero foram inseridos em um cartucho de SPE de 20,0 mL (14,0 x 1,5 cm d. i.) e condicionado com 10,0 mL de água ultrapura e, em seguida, foram percolados 20,0 mL de uma solução de 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em pH 5,0, nas vazões 2,0; 5,0; 10,0 e 15,0 mL min^{-1} . Foram utilizados 3,0 mL da mistura MeOH com 0,5% de HAc para eluição de TC com vazão de 2,0 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado à 50 °C em chapa de aquecimento, recuperados em 3,0 mL tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5) e injetados no sistema BIA-AD.

4.12 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO

O desempenho analítico do método proposto para a pré-concentração de TC foi avaliado a partir do cálculo de parâmetros analíticos, tais como linearidade da curva analítica, limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente), fator de pré-concentração (FPC), precisão e exatidão, empregando o polímero IPDMBA-MIP no método MISPE *off-line* com posterior detecção em sistema BIA-AD sob as condições otimizadas.

Os limites de detecção (LD, do inglês, Limit of Detection) e quantificação (LQ, do inglês, Limit of Quantification) foram calculados de acordo com a recomendação da IUPAC. O LD é definido como a menor concentração de analito passível de ser detectada pelo método proposto, enquanto o LQ é a menor concentração de analito medida com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais. Assim, LD e LQ podem ser calculados segundo as expressões $LD=(3 \times DPb/m)$ e $LQ=(10 \times DPb/m)$, em que DPb é o desvio padrão de dez medidas do branco e m é o coeficiente angular da curva analítica (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003; LONG; WINEFORDNER, 1983).

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade interdia ($n=2$) e intradia ($n=6$) pré-concentrando soluções de tetraciclina nas concentrações de 0,03 e 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e calculando o desvio padrão relativo (%DRP) para as medidas. O fator de pré-concentração (FPC) foi calculado por meio da razão do coeficiente angular da curva analítica obtida com a etapa de pré-concentração e o coeficiente angular da curva analítica sem a etapa de pré-concentração.

4.13 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE LEITE

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto em amostras reais, foram analisadas 4 amostras de leite bovino UHT, sendo 2 integrais (M-1Int. e M-2 Int.), 1 desnatado (M-1 Des.) e 1 zero lactose (M-3 Z.L.), adquiridos em mercados na cidade Londrina/PR e em duas amostras de leite *in-natura*, sendo uma "saudável" e outra "não-saudável", fornecidos por pecuarista local. O valor do pH e o valor nutricional das amostras de leite UHT reportado pelos fabricantes foram resumidas no Quadro 2 com o intuito de comparar a composição dos leites, uma vez que a composição da matriz pode influenciar na pré-concentração e determinação da TC no método MISPE *off-line* com determinação no sistema BIA-AD (MISPE-BIA-AD).

Quadro 2. Valor nutricional (1 copo – 200 mL) e valor do pH de diferentes tipos de leite bovino (integral, desnatado, zero-lactose e “in-natura”).

Valor nutricional – porção de 200 mL (1 copo)	M-1 Int.	M-2 Int.	M-1 Des.	M-3 Z.L	“in-n” s.	“in-n” n.s.
Carboidratos (g)	10	9,0	9,4	4,5	-	-
Proteínas (g)	6,2	6,0	6,3	3,0	-	-
Gorduras totais (g)	6,1	6,0	0	1,0	-	-
Gorduras saturadas (g)	4,2	3,6	0	0,6	-	-
Gorduras trans (g)	0	0	0	0	-	-
Fibra alimentar (g)	0	0	0	0	-	-
Sódio (mg)	129	130	143	65	-	-
Cálcio (mg)	216	210	240	105	-	-
pH	6,65	6,61	6,65	6,63	6,63	6,81

M: Marca; Int.: Integral; Des.: Desnatado; Z.L.: Zero-Lactose; “in-n” s.: “in-natura” saudável; “in-n” n.s.: “in-natura” não-saudável.

A extração foi realizada de modo sequencial, em que 5,0 mL de amostra foram adicionados em tubo cônico de falcon (50,0 mL) e foram adicionados 10,0 mL de tampão EDTA-McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0). A mistura foi mantida em banho ultrassônico por 15 minutos, centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de falcon (50,0 mL) limpo. O processo de extração se repetiu mais 5x com o resíduo, e os sobrenadantes foram combinados e o pH foi ajustado para 5,0. Em seguida, 50 mL do sobrenadante final foi submetido a pré-concentração no método MISPE *off-line* e analisadas no sistema BIA-AD, ambos em condições previamente otimizadas. Para fins comparativos, foram feitas leituras das amostras no sistema cromatográfico e, neste caso, as amostras foram ressuspensas na fase móvel. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As amostras foram fortificadas, adicionando volumes apropriados de solução padrão de TC e da mistura das TCs (TC, OTC e CTC), de modo que nos 5 mL de amostra usado para extração, as amostras contenham as concentrações equivalentes a 133 e 889 µg L⁻¹ (0,3 e 2 µmol L⁻¹). Cabe salientar que estas concentrações foram escolhidas com base nos LMR permitidos no Brasil e nos principais órgãos reguladores do mundo. Segundo a OMS e a FDA,

o LMR para TCs no leite varia de 30 a 100 mg L⁻¹ (0,067 a 0,225 mmol L⁻¹), enquanto a ANVISA estabelece um limite de 0,1 mg L⁻¹ (0,225 μmol L⁻¹) (ANVISA, 2018; MOREIRA et al., 2010). Importante ressaltar que, uma vez que não há indícios de interação desses antibióticos com as proteínas presente nas amostras de leite e que a desproteinização dessas amostras é realizada, as curvas analíticas em água podem ser usadas sem prejuízos ao método desenvolvido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM AUNPs/SPCE PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA

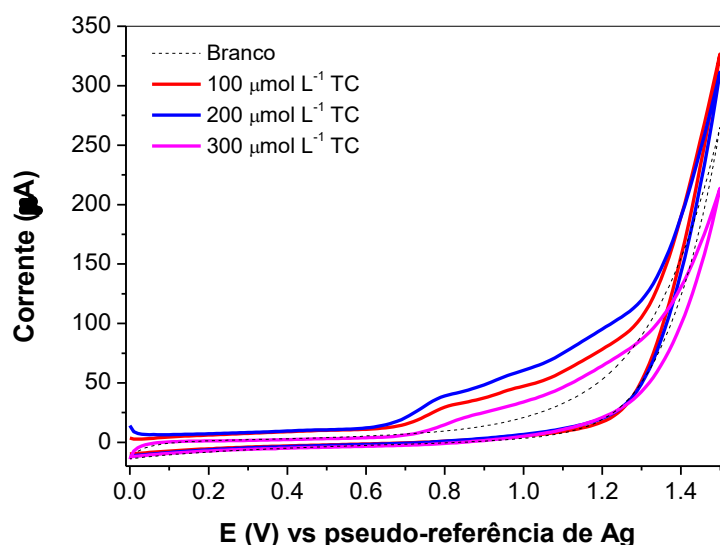
A fim de investigar e melhorar a resposta analítica do sensor desenvolvido para a determinação de TC, as variáveis do sistema eletroquímico e do sensor foram estudadas, sendo elas: influência da modificação do eletrodo impresso de carbono com AuNPs no perfil voltamétrico da TC, concentração de HAuCl_4 para eletrodeposição das AuNPs sobre o SPCE e potencial de oxidação da TC. As variáveis do sistema BIA, que incluem velocidade e volume de injeção também foram estudadas.

5.1.1 Influência da modificação do eletrodo impresso de carbono no comportamento eletroquímico da tetraciclina

Visando a determinação de resíduos de TC em amostras alimentícias e ambientais, a seleção de modificadores químicos que promovem um aumento da sensibilidade analítica do sensor torna-se um passo importante. Inicialmente, foram realizados experimentos com a técnica de voltametria cíclica (CV) para avaliar o comportamento eletroquímico da TC, utilizando SPCE sem modificação. Segundo a literatura, a oxidação eletroquímica das TCs pode ocorrer no grupo fenol e/ou dimetilamina resultando em um ou dois picos, cujas posições dependem do pH do meio (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017; CHATTEN; FLEISCHAMANN; PLETCHER, 1979; WANG et al., 2011).

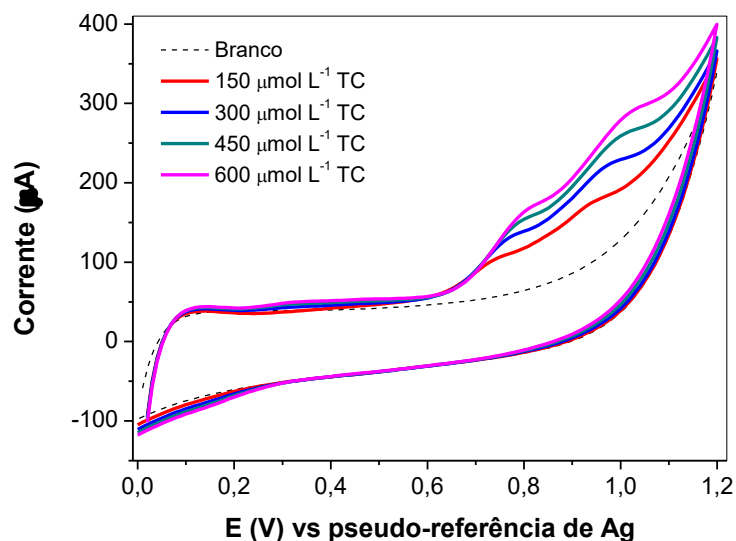
Como apresentado na Figura 14, dentro da faixa de potencial estudado, a TC apresentou sinais de oxidação entre 0,60 V e 1,35 V, com aumento da corrente a medida que sua concentração também aumenta. Entretanto, com o aumento da concentração de TC para $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ houve uma diminuição do sinal analítico, possivelmente causado pela passivação da superfície do eletrodo, o que pode estar relacionado com a formação de subprodutos que ficam adsorvidos à superfície do eletrodo ou uma diminuição na área de superfície do eletrodo disponível para a oxidação da TC (DANG et al., 2004; SILVA et al., 2019; YANG et al., 2013).

Figura 14. Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo impresso de carbono não modificado na presença de diferentes concentrações de tetraciclina. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,50) e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.



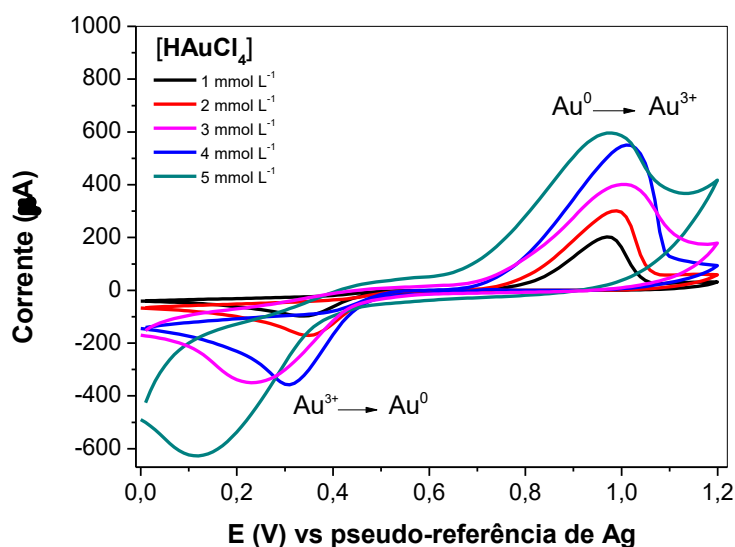
A fim de melhorar a resposta analítica em termos de intensidade da corrente e definição de pico, o SPCE foi modificado a partir da eletrodeposição de AuNPs) (DEVKOTA et al., 2018), conforme descrito anteriormente (Sessão 4.3). Vale ressaltar que neste estudo inicial, seguindo o procedimento empregado por Devkota e colaboradores (DEVKOTA et al., 2018), foi utilizado uma concentração de 3 mmol L⁻¹ de HAuCl₄ na eletrodeposição das AuNPs. Após a modificação com as AuNPs, conforme é apresentado na Figura 15, a TC apresentou dois picos de oxidação mais bem definidos entre 0,7 V e 1,15 V e com aumento da intensidade do pico anódico (I_{pa}) proporcional a concentração de TC no meio. Esse aumento significativo da I_{pa} de TC no AuNPs/SPCE e da melhor definição dos picos de oxidação podem ser atribuído ao efeito eletrocatalítico promovido pelos óxidos de ouro que facilitam a oxidação da TC (CASELLA; FABIO, 2009; DEVKOTA et al., 2018; GUO et al., 2019; WANG et al., 2011). Ainda, cabe salientar que não foi observado picos de redução no sentido oposto de varredura e, portanto, nas condições estudadas o processo de oxidação da TC no AuNPs/SPCE e SPCE não modificado é irreversível.

Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo impresso de carbono modificado com AuNPs (AuNPs/SPCE) na presença de diferentes concentrações de tetraciclina. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,50) e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

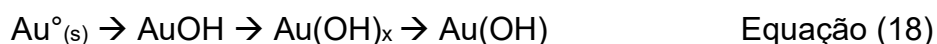
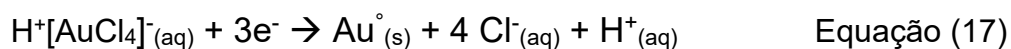


Tendo em vista a melhora da resposta analítica com AuNPs/SPCE, foi estudado o efeito da concentração de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) na eletrodeposição de AuNPs no comportamento eletroquímico do sensor e na determinação de TC. A Figura 16 reúne os voltamogramas do 10^o ciclo da eletrodeposição em diferentes concentrações de HAuCl_4 (na faixa de 1 a 5 mmol L^{-1}).

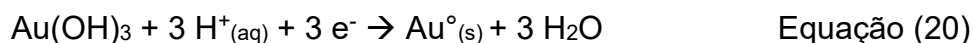
Figura 16. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos AuNPs/SPCE preparados pela eletrodeposição de AuNPs a partir de diferentes concentrações de HAuCl_4 . Condições experimentais: eletrólito suporte KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



Conforme pode ser observado, os voltamogramas apresentam a forma típica para eletrodos modificados com ouro, com picos anódicos e catódicos bem definidos, correspondentes à oxidação e redução Au° e óxidos de ouro na superfície do eletrodo. Entende-se que de 0,0 V à aproximadamente 0,7 V, há uma redução de Au^{3+} para Au° , de acordo com a Equação (17) (KHASHAYAR et al., 2016), para então essas partículas metálicas formadas serem oxidadas. Assim, o pico de oxidação dos voltamogramas da Figura 16 está relacionado à formação de espécies de óxidos de Au (I) e Au(III), conforme reações apresentadas na Equação (18) e Equação (19) (OGURA; HARUYAMA; NAGASAKI, 1971), sendo que na presença de oxigênio, a formação de óxidos de ouro com o maior estado de oxidação é favorecida (BURKE; NUGENT, 1997; CASELLA; FABIO, 2009; HEBIÉ et al., 2016; MASAWAT; SLATER, 2007).



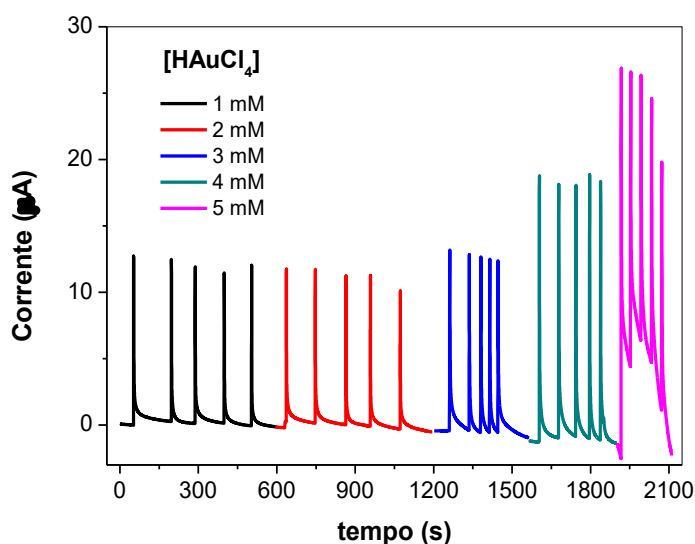
A redução de óxidos de ouro, pico de redução dos voltamogramas da Figura 16, é obtida de acordo com a Equação (20), indicando que houve uma deposição de partículas metálicas de ouro (BURKE; NUGENT, 1997; HEBIÉ et al., 2016; OGURA; HARUYAMA; NAGASAKI, 1971) e perfil similares são encontrados na literatura (CASELLA; FABIO, 2009; CHAROENRAKS et al., 2004; DEVKOTA et al., 2018; DO et al., 2014; HOLZE, 2015; SHETTI; MALODE; NANDIBEWOOR, 2015).



À medida que a concentração de HAuCl_4 aumenta, há um aumento significativo nas correntes de pico anódica e catódica. Esse aumento está relacionado com o crescimento mais fácil de AuNPs formadas previamente do que novas nucleações na superfície do eletrodo, visto que a deposição de ouro nas nanopartículas previamente eletrodepositadas requer menos energia do que na superfície do SPCE (HEZARD et al., 2012). Além disso, o deslocamento do potencial de pico catódico (E_{pc}) para potenciais menos positivos indica que a

deposição de ouro ocorreu preferencialmente nas AuNPs já eletrodepositadas (HEZARD et al., 2012; VAN QUYNH et al., 2020). No entanto, para uma concentração de 5 mmol L^{-1} HAuCl_4 ocorre uma diminuição nas correntes, possivelmente devido à aglomeração de AuNPs em excesso na superfície do eletrodo, causando uma diminuição na área superficial e na taxa de transferência de elétrons (BOONKAEW et al., 2019). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos ao usar esses eletrodos no sistema BIA-AD na presença de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ TC (Figura 17), em que a concentração de 5 mmol L^{-1} HAuCl_4 mostra maior instabilidade nas injeções e pouca diferença significativa na I_{pa} . Assim, HAuCl_4 4 mmol L^{-1} foi selecionado para a eletrodeposição de AuNPs.

Figura 17. Amperogramas para diferentes concentrações de HAuCl_4 usados na eletrodeposição das AuNPs. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), vazão de injeção de $123,2 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $100 \text{ } \mu\text{L}$.

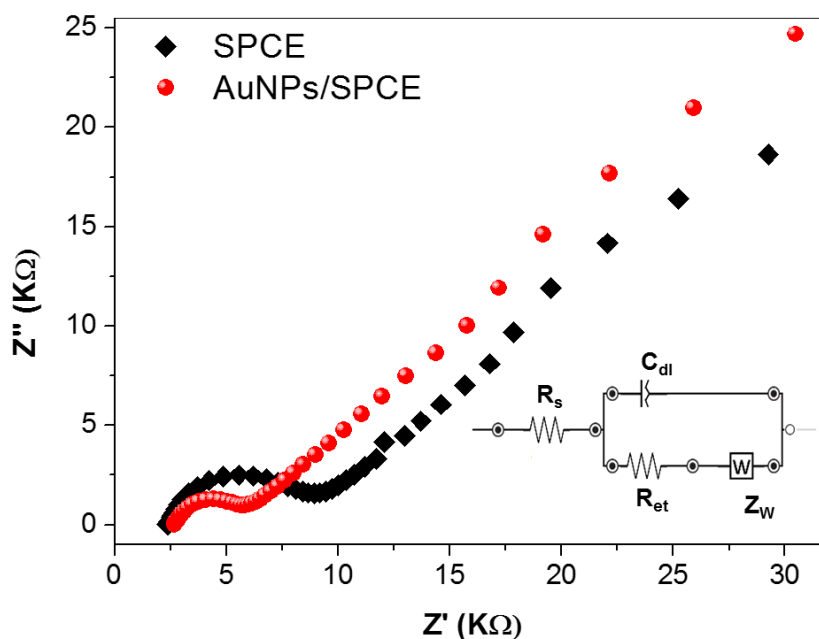


A EIS também foi utilizada a fim de se investigar a capacidade de transferência eletrônica na superfície do eletrodo. Os resultados obtidos pela EIS estão apresentados em termos do diagrama de Nyquist, que traz a impedância imaginária (Z'') versus a impedância real (Z'). Cada ponto do diagrama de Nyquist representa uma impedância de uma frequência, com variação da alta para baixa frequência (de $100,0 \text{ KHz}$ a $10,0 \text{ mHz}$). Assim, a presença de um semicírculo em regiões de alta frequência está relacionado com a resistência de transferência de elétrons, enquanto uma porção linear em baixas frequências corresponde a um processo controlado por difusão. Dependendo das características dielétricas

e isolantes do eletrodo e da interface com o eletrólito, o diâmetro do semicírculo do gráfico de Nyquist é igual a resistência de transferência de elétrons (BOONKAEW et al., 2019; DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004; KANYONG; RAWLINSON; DAVIS, 2016; LU et al., 2017; ÖZCAN; SEZGINTÜRK, 2017; ZOU et al., 2014).

A Figura 18 apresenta o diagrama de Nyquist dos espectros de impedância para os eletrodos SPCE não modificado e AuNPs/SPCE (otimizado anteriormente na concentração de 4 mmol L⁻¹). Para ambos os eletrodos, o espectro exibe um semicírculo em regiões de alta frequência seguido pela parte linear em regiões de baixa frequência, correspondendo a transferência de elétrons e ao processo de difusão, respectivamente (BOONKAEW et al., 2019; KANYONG; RAWLINSON; DAVIS, 2016; MARQUES et al., 2021).

Figura 18. Diagrama de Nyquist observado para espectros de impedância eletroquímica nos eletrodos SPCE e AuNPs/SPCE em solução de 5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{-3/-4} em KCl 0,1 mol L⁻¹. *Insert*: circuito equivalente de Randles usado para ajuste dos dados experimentais.



Os dados de ESI para os eletrodos SPCE não modificado e AuNPs/SPCE foram ajustados para o modelo de circuito equivalente de Randles, como mostra a Figura 18 (*insert*), que consiste de uma resistência do eletrólito entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (R_s), constante de Warbur (Z_w) que resulta da difusão dos íons do seio da solução eletrolítica para a interface do eletrodo, um elemento de fase constante que corresponde a capacitância da dupla

camada (C_{dl} , interface eletrodo/eletrólito), e a resistência de transferência de elétrons (R_{et}) que controla a cinética de transferência de elétrons (CHEN et al., 2011; DA SILVA; GHICA; BRETT, 2018; PATOLSKY et al., 1999; RAFIEE; FAKHARI; GHAFFARZADEH, 2015). O diâmetro do semicírculo representa a R_{et} na superfície do eletrodo (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004; KANYONG; RAWLINSON; DAVIS, 2016; MARQUES et al., 2021). No SPCE não modificado, o semicírculo apresentou um maior diâmetro e o valor de R_{et} para o processo cinético de transferência de elétrons do $[Fe(CN)_6]^{3-/4}$ foi de 622,72 Ω . Entretanto, para AuNPs/SPCE, o diâmetro do semicírculo reduz significativamente para 265,37 Ω . Essa diminuição da R_{et} pode ser atribuída as propriedades das AuNPs, como aumento da condutividade e da área eletroativa do eletrodo, que favorecem o transporte de elétrons e de massa de espécies eletroativas na superfície do eletrodo (CHEN et al., 2011; DA SILVA; GHICA; BRETT, 2018; KANYONG; RAWLINSON; DAVIS, 2016; LU et al., 2017).

Foi empregado a Equação de Randles-Sevcik (Equação 1) para calcular a área eletroativa dos eletrodos SPCE e AuNPs/SPCE utilizando CV em diferentes velocidades de varredura em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆ (Figura 19 e Figura 20). Assim, as áreas eletroativas dos eletrodos SPCE não modificado e AuNPs/SPCE apresentaram os valores de 0,043 e 0,110 cm², respectivamente. Assim, AuNPs/SPCE apresentou maior interface de reação eletroquímica que o SPCE sem modificação, ou seja, as AuNPs promovem um aumento da área eletroativa, fazendo com que a condução da reação de transferência de elétrons seja mais rápida que no SPCE e, portanto, a eletrooxidação da TC neste eletrodo é favorecida.

Figura 19. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE em diferentes velocidade de varredura em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) relação linear entre I_p versus $u^{1/2}$.

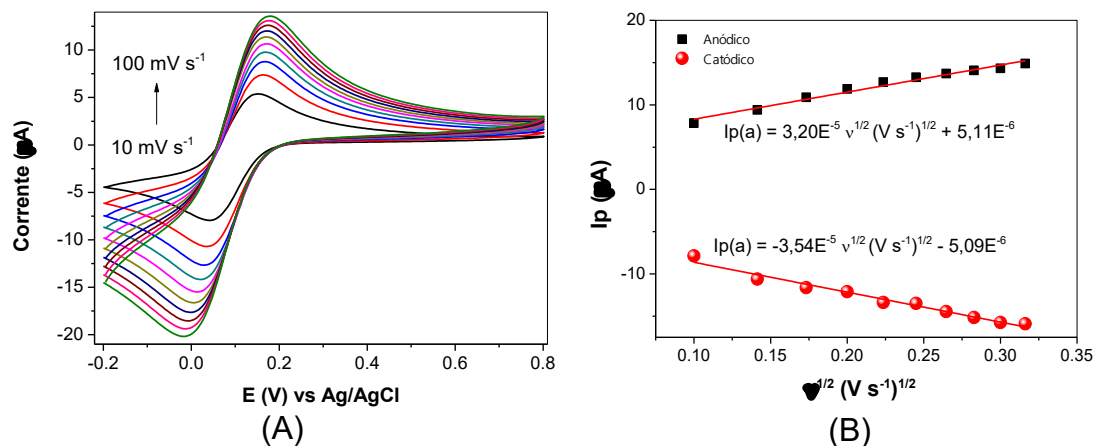
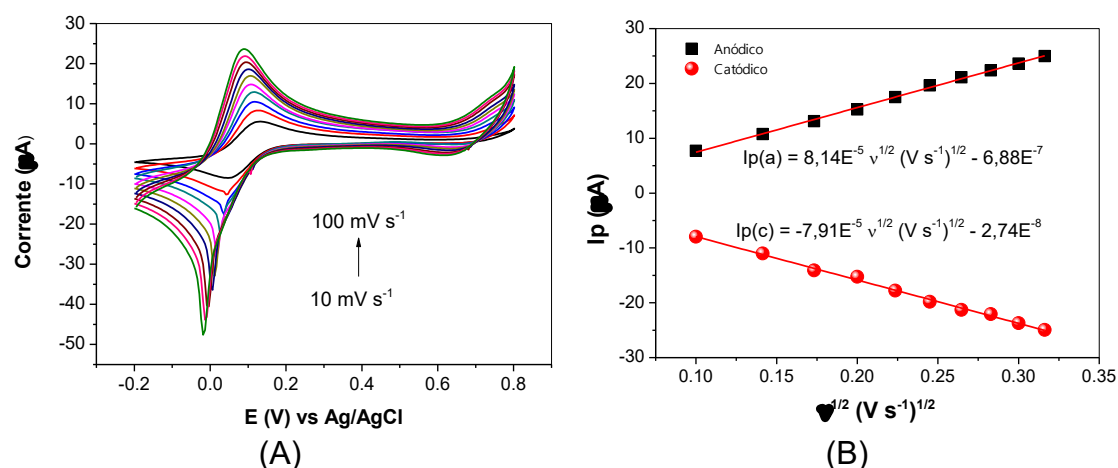


Figura 20. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o AuNPs/SPCE em diferentes velocidade de varredura em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) relação linear entre I_p versus $u^{1/2}$.

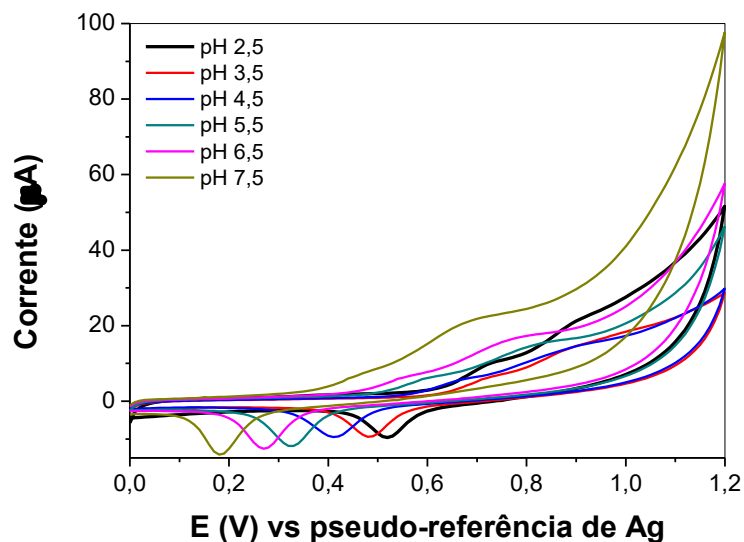


5.1.2 Efeito do pH na eletrooxidação da tetraciclina empregando AuNPs/SPCE

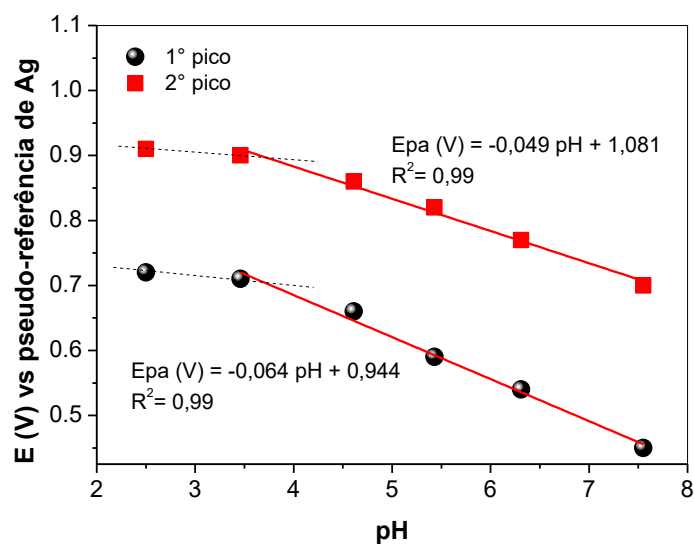
Em análises eletroquímicas, a concentração hidrogeniônica do eletrólito suporte desempenha um papel importante tanto na magnitude da corrente como no potencial de eletrooxidação do analito. Assim, empregando CV na faixa de potencial de 0,0 a 1,2 V (100 mV s^{-1}), realizou-se um estudo para avaliar o efeito do pH no perfil voltamétrico de TC $200,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com variação de pH de 2,5 a 7,5 (Figura 21). Valores de pH superiores a 7,5 não foram estudados pois, segundo a literatura, em meio alcalino as TCs são

instáveis, podendo sofrer degradação com formação de análogos isoméricos (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017; CALIXTO; CERVINI; CAVALHEIRO, 2012; KAZEMIFARD; MOORE, 1997; LOFTIN et al., 2008).

Figura 21. Voltamogramas cíclicos empregando AuNPs/SPCE em solução de TC $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (A) diferentes valores de pH e (B) Dependência do pH com o potencial de pico anódico. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e empregado $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HAuCl_4 na eletrodeposição das AuNPs.



(A)



(B)

De acordo com a Figura 21, observa-se um deslocamento dos picos de oxidação da TC para potenciais menos positivos com o aumento do pH. Além disso, o aumento do pH também causou uma diminuição na definição e

intensidade de corrente do primeiro pico de oxidação e um aumento da corrente do segundo pico de oxidação. Portanto, em pH 2,5, os picos apresentam a melhor definição, sendo este pH mantido para estudos posteriores. Resultados similares a estes foram encontrados na literatura (ASADOLLAHI-BABOLI; MANI-VARNOSFADERANI, 2014; CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017; FARIA et al., 2019; MASAWAT; SLATER, 2007).

Wangfuengkanagul e colaboradores (WANGFUENGGANAGUL; SIANGPROH; CHAILAPAKUL, 2004) observaram pico de oxidação da TC bem definido em pH 2,0 (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹) empregando um eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB). Entretanto, em tampão neutro ou alcalino os picos ficaram mal definidos. Segundo os autores, o melhor resultado em pH 2,0 se deve ao fato de a TC ser carregada positivamente neste pH enquanto o EDDB possui cargas negativas na superfície do eletrodo geradas pelo pré-tratamento anódico ao qual foi previamente submetido.

No entanto, atrações eletrostáticas não parecem ser a única razão para se ter uma melhor resposta em meio ácido, uma vez que o AuNPs/SPCE não foi submetido a nenhum pré-tratamento eletroquímico com geração de cargas negativas. Assim, acredita-se que a melhor resposta em pH 2,5 se deve, principalmente, à maior estabilidade da TC neste meio. Isso está de acordo com a literatura, em que uma diminuição da resposta voltamétrica com o aumento do pH empregando eletrodo compósito grafite-poliuretana (60% grafite, m/m) (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017; CALIXTO; CERVINI; CAVALHEIRO, 2012) e eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (VEGA et al., 2007) foi atribuído a instabilidade da TC em meio alcalino aquoso.

Melhores respostas voltamétricas e boa definição dos dois picos de oxidação da TC em meio ácido, também foram observadas por Masawat e Slater (MASAWAT; SLATER, 2007), usando um eletrodo impresso de ouro (SPGE) em pH 2,0, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Asadollahi-Baboli e Mani-Varnosfaderani (ASADOLLAHI-BABOLI; MANI-VARNOSFADERANI, 2014) também utilizam tampão fosfato, pH 2,6, para fazer a determinação simultânea dos antibióticos TC e cefixima empregando um SPGE modificado com cisteína e nanopartículas de ouro. Charoenraks e colaboradores obtiveram a melhor resposta voltamétrica para os picos de oxidação da doxiciclina e clorotetraciclina em pH 2,5, usando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (CHAROENRAKS et al., 2004). Clarindo et al.

(CLARINDO et al., 2020) empregam um eletrodo compósito grafite-poliuretana modificado com polímero impresso molecularmente (MIP) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5, para determinação de TC em amostras farmacêuticas e urina sintética.

O deslocamento do potencial para valores menos positivos segue um comportamento com duas regiões lineares para ambos os picos de oxidação da TC, como é apresentado na Figura 21B. A primeira região linear ocorre entre pH 2,5 e 3,5, e a segunda região entre pH 4,5 e 7,5. A intersecção das retas dessas duas regiões ocorre em pH próximo a 3,6, para ambos os picos, valor este muito próximo ao pK_{a1} da TC descrito na literatura ($pK_{a1} \sim 3,3$) (ANTÓN-HERRERO et al., 2018; MOHAMMED; KAREEM, 2019; PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020; SÁNCHEZ-POLO et al., 2015; SOORI et al., 2016). Acredita-se que isso ocorre pois até pH 2,5 aproximadamente 100% das moléculas de TC estão protonadas e a medida em que se aumento o pH, tem-se a diminuição dessas espécies e o surgimento de novas espécies com conformações diferentes, conforme será abordado mais profundamente na sessão 5.3 deste trabalho. Calixto e colaboradores apresentam resultados similares usando eletrodo compósito grafite-poliuretana (60% grafite, m/m) (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017; CALIXTO; CERVINI; CAVALHEIRO, 2012). A presença de duas regiões lineares no estudo do pH também foi encontrado por Allahverdiyeva *et al.* usando EDDB pré-tratado catódicamente (ALLAHVERDIYEVA; YARDIM; SENTÜRK, 2021).

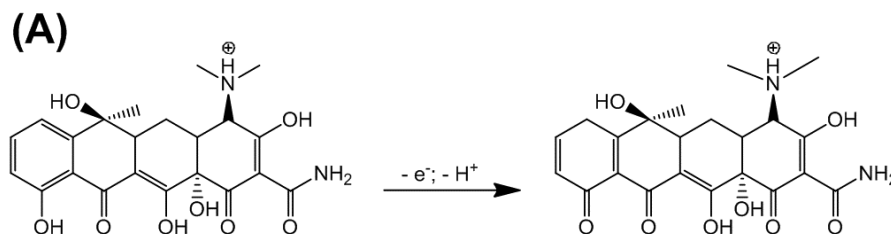
A segunda região linear (Figura 21B), entre pH 4,5 e 7,5, apresenta um comportamento linear bem definido, representado pela equação $E_p \text{ (V)} = -0,064 \text{ pH} + 0,944$ ($R^2 = 0,99$) para o pico 1 e $E_p \text{ (V)} = -0,049 \text{ pH} + 1,081$ ($R^2 = 0,99$) para o pico 2. Este comportamento, para ambos os picos, sugere uma dependência protônica na eletrooxidação da TC seguindo um comportamento Nerstiniano, ou seja, no processo de oxidação a perda de elétrons é acompanhada pela perda de prótons (ANGELIS et al., 2020; KUCEKI et al., 2018; ROCHA et al., 2018, 2020; TARLEY et al., 2020; WANG, 2006). Como o coeficiente angular de -64 mV pH^{-1} e -49 mV pH^{-1} para os picos 1 e 2, respectivamente, estão próximos ao valor teórico de -59 mV pH^{-1} para um sistema Nerstiniano, pode-se sugerir que o processo de oxidação de ambos os picos envolve a transferência do mesmo número de prótons e elétrons (BARD;

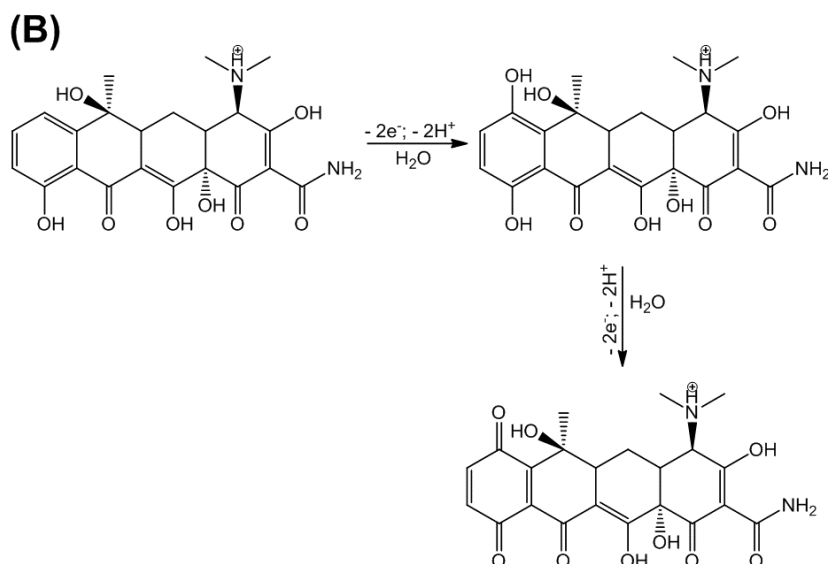
FAULKNER, 1980; GOSSER, 1993; PACHECO et al., 2013; PLETCHER et al., 2002).

Como mencionado anteriormente, a literatura reporta que a oxidação eletroquímica da TC pode ocorrer através dos grupos fenol (C10) e dimetil amônio (C4) (BELKHEIRI et al., 2011; BORISOVA et al., 2013; CHATTEN; FLEISCHAMANN; PLETCHER, 1979; KAZEMIFARD; MOORE, 1997; WANG et al., 2011). O substituinte fenólico na posição C10 é um grupo eletroativo que oxida mais facilmente que os demais grupos substituintes presentes na estrutura das TCs, e assim, a literatura reporta dois diferentes mecanismos propostos para a oxidação eletroquímica da TC ocorrendo neste grupo (BELKHEIRI et al., 2011; DANG et al., 2004; FARIA et al., 2021; KUSHIKAWA et al., 2016).

O primeiro mecanismo reportado para a oxidação eletroquímica da TC ocorre em uma única etapa, ou seja, apenas um pico de oxidação é apresentado, em que o grupo fenólico do C10 é oxidado para um grupo cetona, envolvendo 1 próton e 1 elétron durante o processo (FARIA et al., 2021; KESAVAN; KUMAR; SHIM, 2017; KUSHIKAWA et al., 2016), conforme apresentado na Figura 22A. Em contrapartida, o segundo mecanismo proposto (Figura 22B) ocorre em duas etapas envolvendo 2 prótons e 2 elétrons em cada etapa, em que, além da oxidação do grupo fenólico, ocorre a adição de uma hidroxila na posição para, formando um derivado da benzoquinona (Figura 22B) (BORISOVA et al., 2013; DANG et al., 2004; FARIA et al., 2021; KUSHIKAWA et al., 2016), sendo este o mecanismo mais plausível de estar ocorrendo neste trabalho.

Figura 22. Mecanismo de oxidação eletroquímica para TC em (A) uma etapa ou (B) duas etapas.





Fonte: Adaptado de (FARIA et al., 2021; KUSHIKAWA et al., 2016).

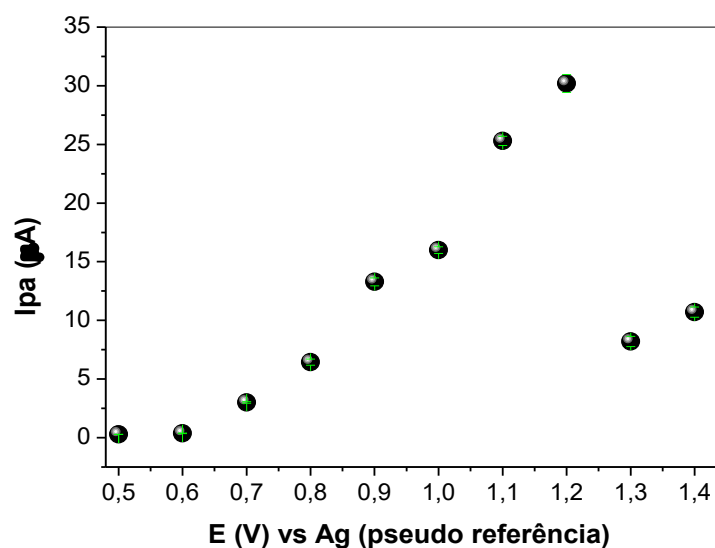
Em relação ao eletrólito suporte para determinação de TC, muitos trabalhos na literatura descrevem que a melhor definição de pico e as maiores intensidade de corrente de pico foram obtidas empregando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em meio ácido (com pH entre 2,0 e 3,0), como alguns trabalhos já citados anteriormente (ASADOLLAHI-BABOLI; MANI-VARNOSFADERANI, 2014; CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017; CALIXTO; CERVINI; CAVALHEIRO, 2012; CHAROENRAKS et al., 2004; KAZEMIFARD; MOORE, 1997; KUSHIKAWA et al., 2016; MASAWAT; SLATER, 2007). Esses melhores resultados nessas condições são atribuídos, principalmente, a maior estabilidade da TC neste meio. Segundo um estudo realizado por Loftin e colaboradores sobre a estabilidade das TCs em meio aquoso (LOFTIN et al., 2008), a TC 4,0 mmol L⁻¹ apresenta uma vida útil de 306 horas em tampão fosfato pH 2,0, a 22 °C. Ainda segundo esses autores, as TCs sofrem degradação na água, incluindo hidrólise e epimerização em soluções com alto valor de pH. Desta forma, com base no exposto na literatura, manteve-se o tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5) para estudos futuros.

5.1.3 Estudo do potencial de eletrooxidação da tetraciclina empregando AuNPs/SPCE no sistema BIA-AD

Medidas eletroquímicas dinâmicas, como o sistema BIA, normalmente exibem uma resposta analítica (corrente) mais alta que as obtidas nas medidas estacionárias, uma vez que a espessura da camada de difusão – que limita a resposta máxima e as condições de controle de difusão – é reduzida (BARD; FAULKNER, 1980; MASAWAT; SLATER, 2007). Portanto, a corrente obtida no sistema BIA-AD é muito maior do que o observado ao usar o AuNPs/SPCE sob condições estacionárias.

O potencial de oxidação da TC utilizando AuNPs/SPCE em sistema BIA-AD foi estudado na faixa de 0,5 V a 1,4 V. A escolha dessa faixa de estudo se deve aos potenciais de oxidação da TC apresentados anteriormente (Figura 15), de modo que se obtenha o potencial que melhor favoreça a oxidação deste antibiótico. Assim, a Figura 23 apresenta um voltamograma hidrodinâmico resultante da média de injeções ($n=3$) explorando essa faixa de potencial, em que foram aplicados dez potenciais (0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; e 1,4 V) ao eletrodo de trabalho, sendo todos experimentos individuais, com injeções de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TC.

Figura 23. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC em função de potenciais aplicados no sistema BIA usando AuNPs/SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$.



Como apresentado na Figura 23, a oxidação da TC nestas condições iniciou-se em potenciais superiores a +0,7 V, semelhante aos resultados

apresentados nas varreduras de VC (Figura 15). A partir de +0,7 V houve um crescente aumento de I_{pa} à medida que o potencial aplicado foi aumentado, atingindo um máximo em +1,2 V. Acredita-se que nesse potencial a superfície de óxido de ouro (por exemplo, $Au(OH)_3$, $AuOOH$, Au_2O_3 , etc) atue como um forte catalisador, favorecendo a eletrooxidação da TC (CASELLA; FABIO, 2009). Para potenciais superiores a +1,2 V, houve uma diminuição da resposta, possivelmente devido ao fato de que nesta região há pouca contribuição das AuNPs na eletrooxidação de TC. Resultados similares podem ser encontrados na literatura usando eletrodo impresso de ouro (SPGE) (MASAWAT; SLATER, 2007) e eletrodo de ouro de disco rotatório (Au RDE) (CHAROENRAKS et al., 2004; PALAHARN et al., 2003), em que ambos os eletrodos são usados em sistema FIA-AD. Kazemifard e Moore (KAZEMIFARD; MOORE, 1997) também utilizam este potencial para determinação de TCs em formulações farmacêuticas empregando HPLC com detecção amperométrica. Sendo assim, o potencial de +1,2 V foi selecionado para experimentos futuros.

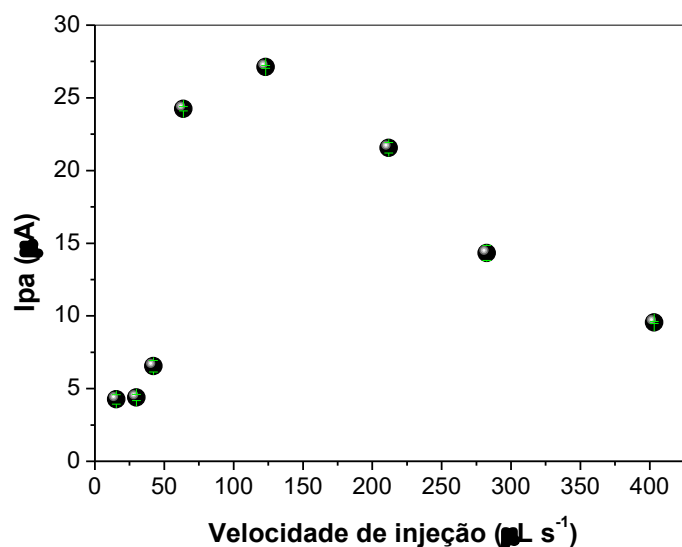
5.1.4 Estudo dos parâmetros do sistema BIA-AD (volume e velocidade de injeção) para determinação de tetraciclina empregando AuNPs/SPCE

Os parâmetros do sistema BIA-AD como volume e velocidade de injeção foram estudados, pois afetam a zona de dispersão da amostra e, conseqüentemente, a sensibilidade e precisão do método (ALENCAR et al., 2017; WANG; TAHA, 1991).

A micropipeta eletrônica (Eppendorf® Multipipete E3), Figura 10, usada no sistema BIA para injeção das amostras, oferece oito níveis de velocidade de injeção diferentes (speed de 1 a 8) quando se utiliza uma ponteira do tipo Combitip® de 1,0 mL. Experimentalmente, usando alíquotas de 100 μL , foi calculado que os níveis correspondem, respectivamente, as seguintes velocidades de injeção: speed 1= 15,5 $\mu\text{L s}^{-1}$, speed 2= 30,0 $\mu\text{L s}^{-1}$, speed 3= 42,3 $\mu\text{L s}^{-1}$, speed 4= 63,8 $\mu\text{L s}^{-1}$, speed 5= 123,2 $\mu\text{L s}^{-1}$, speed 6= 211,9 $\mu\text{L s}^{-1}$, speed 7= 282,5 $\mu\text{L s}^{-1}$, speed 8= 403,2 $\mu\text{L s}^{-1}$. Feito isso, foi possível estudar a velocidade de injeção (speed) que proporciona a melhor resposta analítica para a determinação de TC.

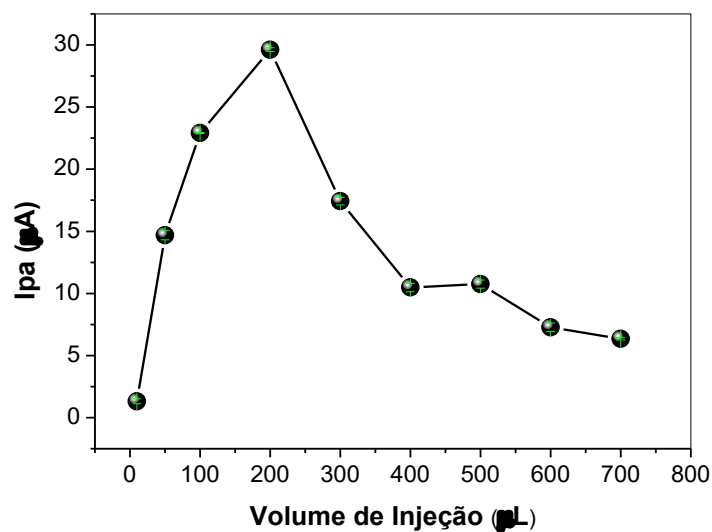
A Figura 24 apresenta a I_{pa} média ($n=3$) em cada velocidade de injeção, sendo que a resposta aumenta com o aumento da velocidade de injeção, possivelmente devido a diminuição da camada difusional, visto que o sinal é proporcional a transferência de massa de TC para o eletrodo (ALENCAR et al., 2018; BACKES et al., 2017; FARIA et al., 2019). Entretanto, acima de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ houve uma diminuição da I_{pa} . Essa diminuição pode estar relacionada com a velocidade de aquisição do sinal não ser suficiente para mensurar no ápice da I_{pa} , já que o analito é dispensado muito rapidamente sobre o eletrodo. Assim, a velocidade de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ foi escolhida para os experimentos futuros. Resultados similares podem ser encontrados na literatura para outros sistemas BIA-AD (ALENCAR et al., 2017).

Figura 24. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC em função da velocidade de injeção utilizadas no sistema BIA usando AuNPs/SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5) e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$.



Com Combitip[®] de 1 mL usado na micropipeta eletrônica (Eppendorf[®] Multipipete E3), foram estudados volumes de injeção na faixa de 10 a 700 μL e os resultados estão apresentados na Figura 25. Como pode ser observado, a I_{pa} aumentou significativamente com o aumento do volume injetado de 10 para 200 μL . Entretanto, para volumes acima de 200 μL houve uma diminuição da resposta, pois possivelmente ocorre a passivação da superfície do eletrodo devido ao alto volume injetado e este ficar em maior tempo de contato com a superfície do eletrodo. Resultados similares podem ser encontrados na literatura para outros sistemas BIA-AD (ALENCAR et al., 2017).

Figura 25. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC em função do volume de injeção utilizadas no sistema BIA usando AuNPs/SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5) e velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$.

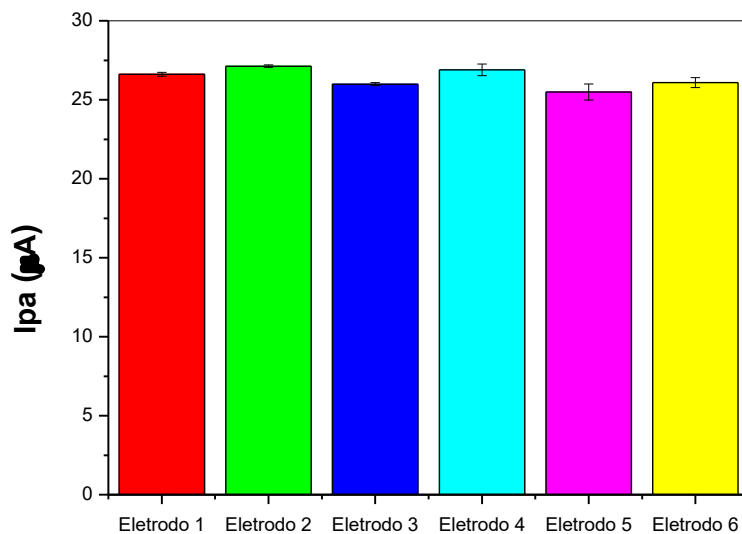


5.1.5 Estudo da reprodutibilidade do preparo do sensor AuNPs/SPCE e sua estabilidade e repetibilidade

A fim de avaliar a reprodutibilidade do preparo do sensor, seis eletrodos modificados com AuNPs foram preparados de acordo com a seção 4.3. Para cada sensor, foram feitas medidas sucessivas ($n=3$) empregando as condições previamente otimizadas do sistema BIA-AD.

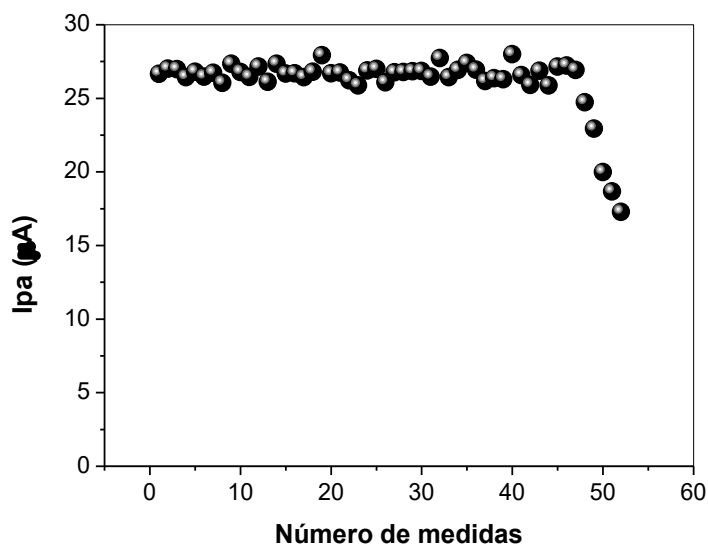
A Figura 26 apresenta a média de Ipa obtida empregando cada eletrodo. Os seis eletrodos estudados obtiveram uma média de resposta de $26,32 \mu\text{A}$ com DPR de 1,87%, o que indica uma boa reprodutibilidade do preparo do sensor com a eletrodeposição das AuNPs.

Figura 26. Variação da corrente de pico anódica ($n=3$) em relação a seis eletrodos estudados. Condições experimentais: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC, eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de $1,2 \text{ V}$, velocidade de injeção de $123 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$.



Também foi avaliado a estabilidade do sensor por meio de injeções sucessivas no mesmo dia com uma solução de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC no sistema BIA-AD com as condições previamente otimizadas. A Figura 27 apresenta a I_{pa} obtida em relação ao número de medidas realizadas.

Figura 27. Corrente anódica para injeções de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ TC empregando AuNPs/SPCE em relação ao número de injeções. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de $1,2 \text{ V}$, velocidade de injeção de $123 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$.



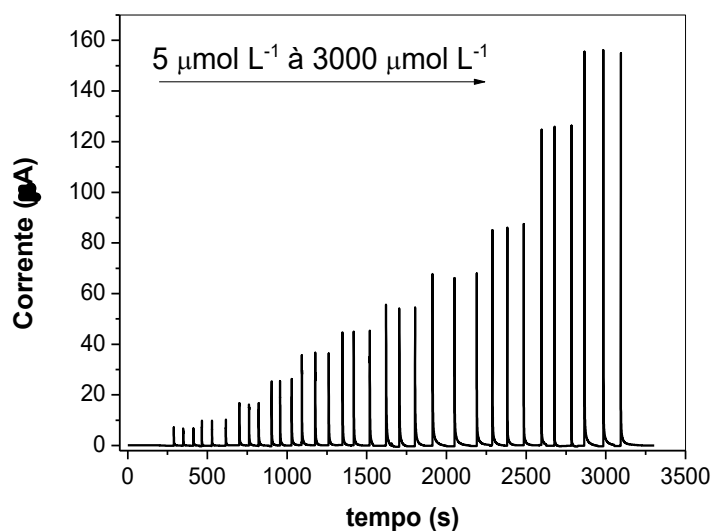
Como pode ser observado na Figura 27, o sensor apresentou uma estabilidade elevada com 47 injeções até que a resposta analítica comece a diminuir. Estes resultados mostram-se satisfatórios, uma vez que não precisa de lavagem da superfície do eletrodo entre as medidas, sendo uma ótima opção para análises de rotina, por exemplo.

Posteriormente, foi estudado a repetibilidade do sensor AuNPs/SPCE a fim de avaliar a precisão deste sensor no sistema BIA-AD para determinação de TC. As injeções se mostraram reprodutíveis para a detecção da TC, com DPR de 2,42%. Essa alta repetibilidade pode ser atribuída a precisão do volume e da velocidade de injeção fornecidos pela micropipeta eletrônica, bem como ao posicionamento fixo da micropipeta em relação ao sensor.

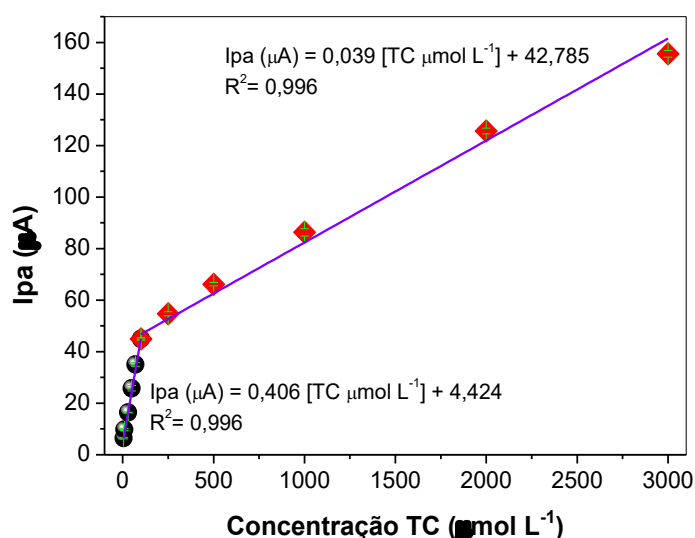
5.1.6 Desempenho Analítico do Sensor AuNPs/SPCE na Determinação de Tetraciclina

O desempenho analítico do sensor AuNPs/SPCE foi obtido sob as condições eletroquímicas e do sistema BIA-AD otimizados. A Figura 28A apresenta os amperogramas, com injeções em triplicata, para as concentrações de TC na faixa de concentração de 5 a 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dentro da faixa de concentração estudada, o método apresentou duas inclinações, sendo a primeira de 5 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a segunda de 500 a 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 28B).

Figura 28. (A) Amperogramas para concentrações crescentes de TC, de 5 a 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e (B) Curva analítica para TC. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 200 μL .



(A)



(B)

A primeira linearidade da curva analítica, de 5,0 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, apresentou uma equação linear como $I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,406 (\pm 0,005) [\text{TC}, \mu\text{mol L}^{-1}] + 4,424 (\pm 0,171)$ com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,996, enquanto a segunda linearidade, de 100 a 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a equação linear foi $I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,039 (\pm 3,767 \times 10^{-4}) [\text{TC}, \mu\text{mol L}^{-1}] + 42,785 (\pm 0,341)$ com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,990. Tendo em vista os LMR permitidos para TC em amostras alimentícias, como por exemplo o leite, optou-se por trabalhar com a

primeira linearidade da curva, o qual contempla concentrações mais baixas. Os limites de LD e LQ calculados foram de 0,65 e 2,16 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

A curva analítica, segundo a ANVISA (RIBANI et al., 2004), para as concentrações de 5,0 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, foi verificada por análise de variância (ANOVA), levando-se em consideração que a hipótese nula $H_0: \beta=0$ era de que não houvesse relação linear entre as variáveis. Assim, aplicou-se o teste F, com um intervalo de confiança de 95%, em que a relação entre $MS_{\text{regressão}}/MS_{\text{resíduo}}$ foi 1069,02, sendo muito maior que o valor tabelado ($F_{16,1} = 246,46$), podendo assim, descartar a hipótese nula e considerar que os dados experimentais se ajustam bem ao modelo de regressão linear (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003). Ainda, a relação entre $MS_{\text{falta de ajuste}}/MS_{\text{erro puro}}$ foi de 2,75, sendo menor que o valor tabelado ($F_{4,12} = 3,26$), confirmando o bom ajuste ao modelo linear (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003).

A precisão intradia ($n=6$) e interdia ($n=2$) foi avaliada em duas concentrações diferentes de TC (10,0 e 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). O desvio padrão relativo (%DPR) para as medidas intradia variou de 1,52 a 3,59%, enquanto a precisão interdia variou de 1,67 a 2,99%, mostrando que o método desenvolvido apresenta boa repetibilidade e exatidão.

Apesar do método eletroanalítico desenvolvido apresentar resultados satisfatórios para a determinação de TC, com limite de quantificação de 2,16 $\mu\text{mol L}^{-1}$, este ainda não é suficiente para detectar TC em amostras alimentícias como o leite, por exemplo, visto que os limites máximos permitidos para esse tipo de amostras varia de 30-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,068-0,225 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (ANVISA, 2009, 2012, 2018; COMMISSION, 2015; EU, 2010; MOREIRA et al., 2010). Assim, a extração em fase sólida empregando um polímero molecularmente impresso (MIP) como material adsorvente para extração/pré-concentração de tetraciclina torna-se indispensável para melhorar o limite de quantificação, bem como a seletividade do método proposto. Desta forma, um MIP para TC foi sintetizado, caracterizado e comparado com seus respectivos polímeros sem impressão química. Além disso, o método de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) foi otimizado, a fim de avaliar a eficiência do material para extração/pré-concentração de TC.

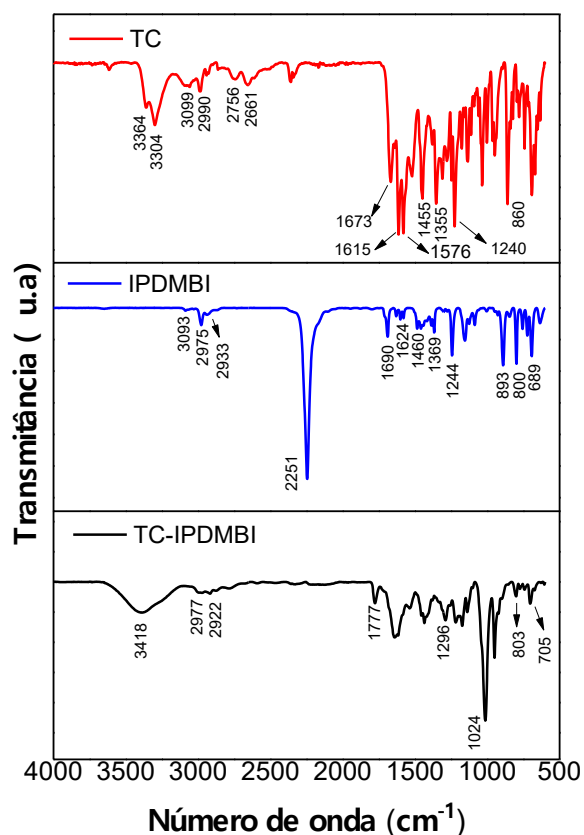
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO TC-IPDMBI E DOS POLÍMEROS, IPDMBA-MIP E IPDMBA-NIP

Os materiais sintetizados TC-IPDMBI, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e fisiossorção de gás N₂ a 77 K.

5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

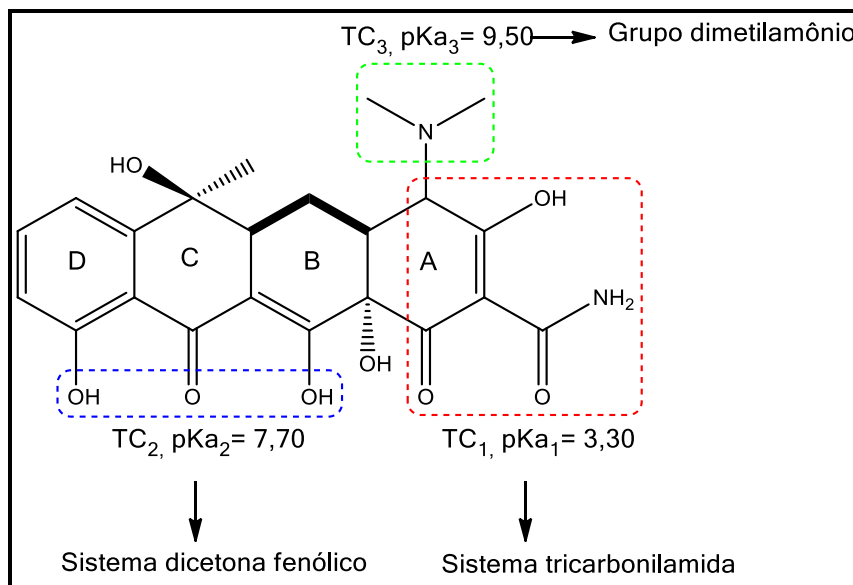
Os materiais sintetizados e seus precursores foram caracterizados por espectroscopia da região do infravermelho, com o intuito de avaliar a presença ou ausência de grupos funcionais característicos dos reagentes utilizados em cada etapa da síntese. Na Figura 29 é apresentado os espectros de FT-IR para a TC, IPDMBI e o produto formado TC-IPDMBI.

Figura 29. Espectros de FT-IR para TC, IPDMBI e TC-IPDMBI.



O espectro de FT-IR da TC mostra bandas de absorção características para estiramento de N–H e O–H em 3364 cm^{-1} e 3304 cm^{-1} (COATES, 2000; TRIVEDI et al., 2015). A banda em 3099 cm^{-1} pode ser atribuída tanto ao estiramento assimétrico N–H quanto estiramento C–H de aromáticos (GUNASEKARAN; VARADHAN; KARUNANIDHI, 1996; TRIVEDI et al., 2015). As bandas de 2990 cm^{-1} a 2261 cm^{-1} referem-se a estiramentos C–H em aromáticos e grupos metila (COATES, 2000; GUNASEKARAN; VARADHAN; KARUNANIDHI, 1996; TRIVEDI et al., 2015). A região entre 1700 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} , segundo a literatura (GU; KARTHIKEYAN, 2005; MYERS; TOCHON-DANGUY; BAUD, 1983), apresenta picos característicos para espectros de FT-IR de TCs, sendo o sistema tricarbonilamida do anel A (Figura 30) o principal responsável por esta região. A banda em 1673 cm^{-1} pode ser atribuída a ligação –C=O associado a amida de TC₁ (ABDULGHANI; JASIM; HASSAN, 2013; GU; KARTHIKEYAN, 2005; MYERS; TOCHON-DANGUY; BAUD, 1983; WU et al., 2016). As bandas em 1615 cm^{-1} e 1576 cm^{-1} são características de grupos carbonilas presentes nos anéis A e C, respectivamente (ABDULGHANI; JASIM; HASSAN, 2013; GU; KARTHIKEYAN, 2005; WU et al., 2016). A banda em 1455 cm^{-1} pode ser atribuída tanto a vibrações de ligação =C–N– (GHADIM et al., 2013; ZHANG et al., 2011) quanto para ligações –C=C– (TRIVEDI et al., 2015; WU et al., 2016), enquanto a banda em 1355 cm^{-1} pode ser associada a deformações das ligações C–H (COATES, 2000; TRIVEDI et al., 2015) e a banda em 1240 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação N–H (CHANG et al., 2020; COATES, 2000). As bandas abaixo de 1000 cm^{-1} , como em 860 cm^{-1} , são características de deformações angular para ligações C–H em anel aromático (COATES, 2000).

Figura 30. Fórmula estrutural para a tetraciclina e seus respectivos pKas.



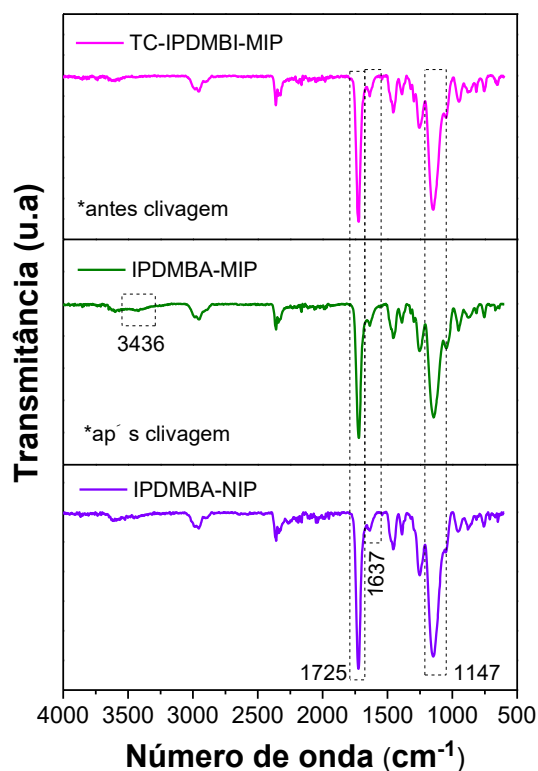
O espectro de FT-IR para IPDMBI exibe uma banda em 3093 cm^{-1} que pode estar relacionada ao estiramento C–H do grupo vinílico terminal, enquanto as bandas em 2975 cm^{-1} e 2933 cm^{-1} são atribuídas a vibrações fundamentais de grupos $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_3$ (COATES, 2000; KYULAVSKA et al., 2010). A banda de forte intensidade em 2251 cm^{-1} é característica de estiramento vibracional do grupo isocianato presente na molécula de IPDMBI (BOTARO; GANDINI, 1998; KYULAVSKA et al., 2010; LIU et al., 2014c; LIU; CHEN; QIU, 2014). A banda em 1690 cm^{-1} pode ser atribuída a vibração tanto da ligação $-\text{C}=\text{N}-$ quanto da ligação $\text{C}=\text{O}$, ambos presentes no grupo isocianato (COATES, 2000). As bandas entre as regiões de $1650\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ e $1490\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ estão associadas com as vibrações do núcleo aromático e deformações angulares de grupos metil, respectivamente, além de uma banda fina em 1244 cm^{-1} que pode ser atribuída a grupos carbonila (COATES, 2000; KYULAVSKA et al., 2010). As bandas em 893 cm^{-1} , 800 cm^{-1} e 689 cm^{-1} indicam a presença de meta-substituintes no anel aromático, como ocorre na molécula de IPDMBI (BOTARO; GANDINI, 1998; COATES, 2000; KYULAVSKA et al., 2010).

Uma comparação entre os espectros dos precursores TC e IPDMBI com o espectro do produto formado da reação entre eles, TC-IPDMBI, mostra a presença de uma banda alargada em 3418 cm^{-1} , que pode estar associada a sobreposição de estiramentos de ligações O–H e N–H (COATES, 2000). As bandas na região entre $3000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a vibrações de grupos –

CH_2- e $-\text{CH}_3$ presentes na estrutura do produto formado (COATES, 2000; KYULAVSKA et al., 2010). A banda em 2251 cm^{-1} , referente ao grupo isocianato, não aparece no espectro, indicando que houve a reação entre o grupo isocianato do IPDMBI e o grupo fenol da TC, formando uma ligação uretana entre esses grupos (GÜNEY; GÜNEY, 2017; KI et al., 2002; KI; CHANG, 2006; WANG et al., 2009). As bandas em 1777 cm^{-1} , 1296 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos das ligações $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$ e $\text{C}-\text{O}$, respectivamente, confirmando a formação da ligação uretana e da estrutura de carbamato no produto TC-IPDMBI (COATES, 2000; KOZAKIEWICZ et al., 2011; KYULAVSKA et al., 2010; LIU et al., 2014c; LIU; CHEN; QIU, 2014). Ainda, a presença das bandas em 803 cm^{-1} e 705 cm^{-1} são mais um indicativo da formação da ligação uretana entre TC e IPDMBI, já que estas bandas são características de meta-substituição em aromáticos, conforme apresenta a estrutura do IPDMBI (BOTARO; GANDINI, 1998; COATES, 2000; KYULAVSKA et al., 2010).

Os espectros de FT-IR obtidos para os polímeros são apresentados na Figura 31, em que se pode observar uma grande similaridade entre perfil dos espectros destes materiais. A banda ampla na região de $3640\text{-}3610\text{ cm}^{-1}$ são características de estiramento da ligação $\text{O}-\text{H}$, possivelmente de água adsorvida nos materiais (COATES, 2000). Para o espectro do IPDMBA-MIP, a presença de uma banda larga em 3436 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do grupo NH_2 (COATES, 2000), indicando que houve a quebra da ligação entre IPDMBI e TC após a clivagem. A banda em 1725 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ presente tanto na TC quanto no EGDMA. A banda em 1637 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de grupos vinílicos residuais na matriz polimérica e para IPDMBA-MIP, pode ser atribuído ao estiramento da ligação $\text{N}-\text{H}$, sendo mais um indicativo da quebra da ligação entre IPDMBI e TC após a clivagem e formação da amina primária. A banda intensa em 1147 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupo éster ($\nu\text{O}-\text{C}-\text{O}$) presente no EGDMA (SUQUILA; OLIVEIRA; TARLEY, 2018).

Figura 31. Espectros de FT-IR para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.



5.2.2 Análise Textural por Fisissorção de Gás Nitrogênio a 77 K

As características texturais de um material podem influenciar muitas de suas propriedades e desempenho como material adsorvente, por exemplo. Além disso, tais características podem estar diretamente relacionadas com a cinética de transferência de massa do analito da fase líquida para a fase sólida, que pode afetar a capacidade de adsorção dos materiais (IKENYIRI; UKPAKA, 2016; MÜLLER, 2010).

O modelo BET (Brunauer, Emmett e Teller) foi usado para determinar a área superficial específica, enquanto o modelo BJH (Barret, Joyner e Halenda) foi aplicado para determinar o volume total e o diâmetro médio dos poros. Baseados no princípio de adsorção-dessorção de gás nitrogênio, esses métodos são os principais métodos utilizados para se determinar a porosidade de materiais (THOMMES et al., 2015; VASAPOLLO et al., 2011). Na Tabela 2 são apresentados os dados texturais para TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.

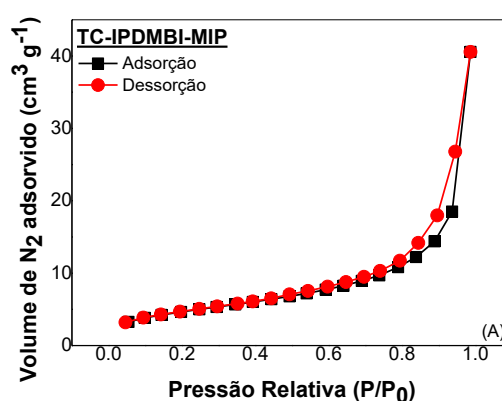
Tabela 2. Características texturais como área superficial específica, volume total e diâmetro de poros para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.

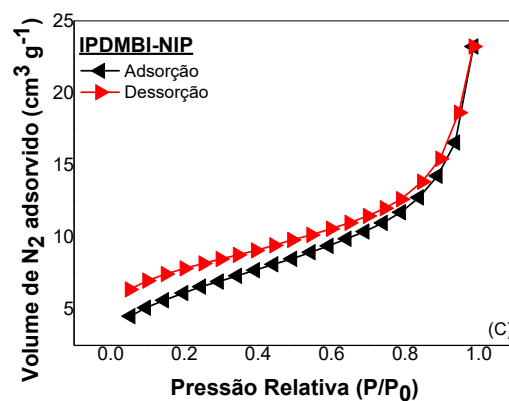
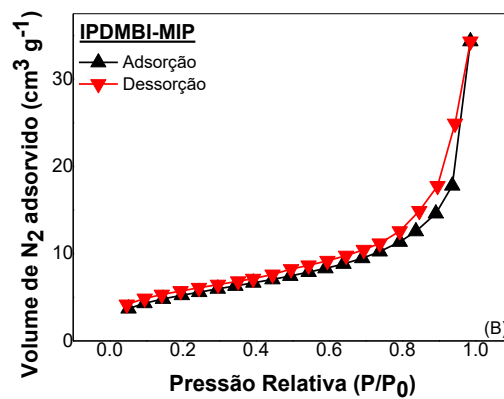
Material	Área Superficial Específica ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume Total de Poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro Médio de Poro (nm)
TC-IPDMBI-MIP	163,94	0,61	3,36
IPDMBA-MIP	183,21	0,51	3,36
IPDMBA-NIP	206,12	0,34	3,35

Como visto na Tabela 2, a ausência da TC na matriz polimérica dos polímeros IPDMBA-MIP provoca um aumento na área superficial desse material. Tal resultado era esperado em comparação ao polímero TC-IPDMBI-MIP, pois a presença da TC pode ocupar alguns poros do material.

Segundo a literatura, normalmente é esperado que materiais com maior área superficial possuam maior capacidade adsortiva (FONSECA et al., 2015; RENKECZ et al., 2013). Entretanto, o IPDMBA-NIP apresentou uma área superficial específica maior que o IPDMBA-MIP. Como será discutido posteriormente, o IPDMBA-MIP apresentou uma maior capacidade adsortiva com a TC, podendo-se atribuir estes resultados à presença de sítios de ligação específica formados durante a síntese, sem dependência com dados texturais (MENDONÇA et al., 2020). Ainda, de acordo com os perfis das isotermas de adsorção-dessorção de gás nitrogênio para os materiais poliméricos (Figura 32) e por apresentarem um diâmetro de poro entre 2 e 50 nm, segundo a IUPAC todos os materiais apresentam isotermas do tipo V com histerese do tipo H3 com poros em forma de fenda, sendo este um perfil característico de materiais mesoporosos (THOMMES et al., 2015; ZDRAVKOV et al., 2007).

Figura 32. Isotermas de adsorção-dessorção de gás nitrogênio para (A) TC-IPDMBI-MIP, (B) IPDMBA-MIP e (C) IPDMBI-NIP.

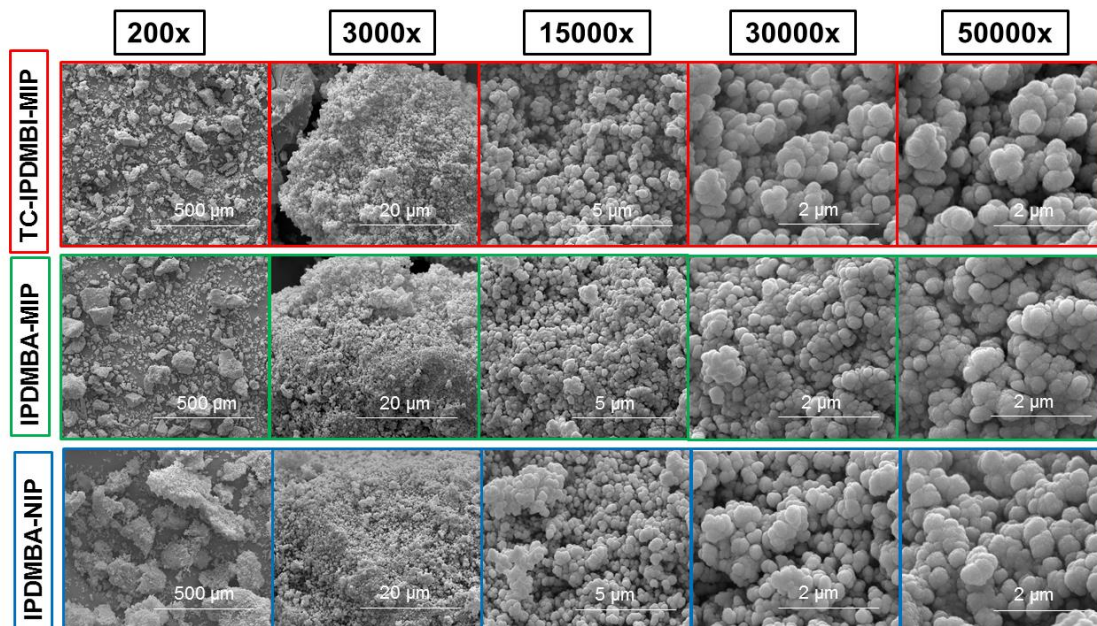




5.2.3 Análise Morfológica

As características morfológicas dos materiais TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 33).

Figura 33. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com ampliações de 200, 3000, 15000, 30000 e 50000 vezes para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.



Como pode ser observado nas imagens de MEV, a morfologia dos polímeros sintetizados mostrou-se bastante similaridade entre si. Em ampliações maiores é possível observar que os polímeros apresentaram partículas de tamanhos variados e em suas superfícies aglomerados esféricos, que atribuem características rugosas a esses materiais. Esse tipo de partícula era esperado, visto que o método de polimerização utilizado foi por precipitação, em que se emprega um volume excessivo de solvente porogênico quando comparado ao método em *bulk*, por exemplo, para que este impeça a coalescência das partículas e, conseqüentemente, estas sejam mais esféricas. Além disso, as partículas obtidas pela síntese por precipitação fornecem uma maior área superficial ao material sintetizado, o que contribui para sua capacidade de adsorção (FONSECA et al., 2015; JING et al., 2009; OLIVEIRA; SEGATELLI; TARLEY, 2016; PÉREZ-MORAL; MAYES, 2004; VENDAMME et al., 2009).

Ainda, é possível observar que a presença de TC na matriz polimérica não interferiu na morfologia do material. A partir desses resultados, é possível inferir que qualquer comportamento de seletividade do IPDMBA-MIP em comparação ao IPDMBA-NIP pode ser atribuído aos possíveis sítios de ligação formados após a clivagem térmica no IPDMBA-MIP, sem qualquer influência da morfologia do material (MENDONÇA et al., 2020).

5.2.4 Análise Térmica

O comportamento térmico dos polímeros e o efeito dos reagentes na organização das cadeias poliméricas foram avaliados pelas curvas de TG e DTG (Figura 34), que mostra a perda de massa (em %) em função da variação de temperatura na faixa de 30 a 900 °C.

Como observado na Figura 34, os polímeros sintetizados apresentam um perfil térmico semelhante. Os polímeros TC-IPDMBI-MIP e IPDMBA-MIP apresentaram quatro eventos de decomposição, enquanto três eventos de decomposição são apresentados pelo IPDMBA-NIP.

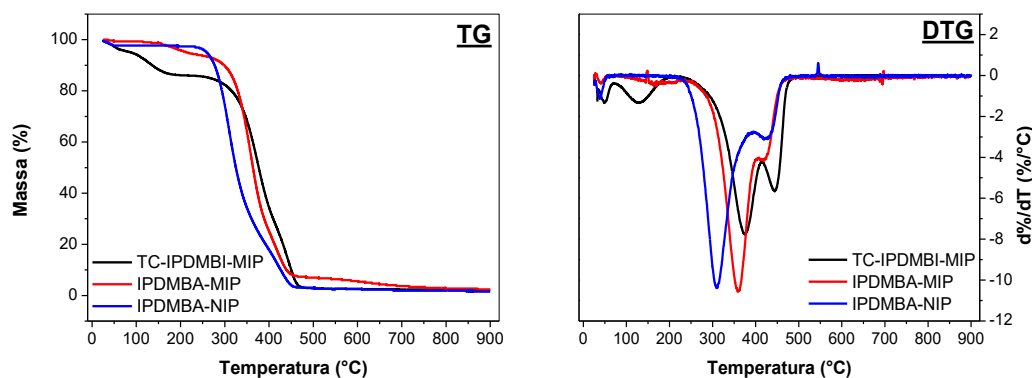
O primeiro evento observado para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP, IPDMBA-NIP encontra-se na faixa de temperatura de 30 °C a 80 °C, com taxa de perda máxima em 49, 40 e 39 °C e percentagem de perda de massa de 2,62%, 1,68% e 1,51%, respectivamente, corresponde a remoção da água adsorvida fisicamente na superfície dos polímeros (CAPELARI et al., 2021; CASARIN et al., 2017; SUQUILA; OLIVEIRA; TARLEY, 2018).

Para o polímero TC-IPDMBI-MIP, um segundo evento de decomposição é observado na faixa de 80-240 °C, com perda de massa de 6,39% nesta faixa de temperatura, sendo atribuído a decomposição térmica da TC (CERVINI et al., 2016).

Na faixa de temperatura de 220 °C a 420 °C, todos os polímeros apresentam um evento com perda de massa significativa de 39,39% para TC-IPDMBI-MIP, 45,14% para IPDMBA-MIP e 32,96% para IPDMBA-NIP, com taxa de perda máxima em 374,63 °C, 360,49 °C e 308,86 °C, respectivamente, que pode ser atribuído a decomposição da cadeia polimérica (GAO et al., 2020; LV et al., 2012; SUQUILA; OLIVEIRA; TARLEY, 2018).

Um último evento é observado para todos os polímeros na faixa de 390 °C a 480 °C, com taxa de perda máxima em 443,71 °C, 419,78 °C e 428,66 °C, com perda de massa de 37,58%, 37,80% e 56,06% para TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP, respectivamente, podendo ser atribuído a descarboxilação dos segmentos do EGDMA (SUQUILA; OLIVEIRA; TARLEY, 2018). As percentagens residuais obtida para os polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBI-NIP foram de 14,02%, 15,38% e 9,47%, respectivamente.

Figura 34. Curvas termogravimétricas TG (esquerda) e derivada DTG (direita) dos polímeros TC-IPDMBI-MIP, IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. Condições experimentais: vazão de N₂ a 20 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ a 900 °C.



5.2.5 Análise Elementar CHN

A taxa de incorporação do monômero, IPDMBI, e do agente de ligação cruzada, EGDMA, nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP foi avaliada utilizando análise de elemento de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Os resultados obtidos pela análise mostraram que o teor de C, H, e N no IPDMBA-MIP foram 57,08%, 7,12% e 0,34%, respectivamente, e para o IPDMBI-NIP foram 57,68% de C, 6,90% de H e 0,85% de N. A composição percentual dos reagentes nos polímeros (% em mmol) foi determinada a partir de cálculos estequiométricos demonstrados a seguir.

Para a síntese do IPDMBA-MIP foram adicionados no total 26,24 mmol (100%) de reagentes, sendo 1,24 mmol (4,73%) do produto TC-IPDMBI e 25 mmol (95,27%) do agente reticulante EGDMA.

Para o IPDMBA-MIP a quantidade final de IPDMBA, em mmol, foi obtida a partir do cálculo de N_{total} (mmol) considerando 1 g de polímero:

$$N_{total} = 1 \text{ g (pol.)} \times \frac{0,34\%}{100\%} \times \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g}} = 0,243 \text{ mmol } N_{total}$$

$$IPDMBA = 0,243 \text{ mmol } N_{total} \times \frac{1 \text{ mol IPDMBA}}{1 \text{ mol N}} = 0,243 \text{ mmol IPDMBA}$$

De modo similar, foi calculado a quantidade de C_{total} (mmol) e a quantidade de C referente ao IPDMBA (C_{IPDMBA}) e, por diferença, foi encontrado a quantidade de C referente ao EGDMA (C_{EGDMA}):

$$C_{total} = 1 \text{ g (pol.)} \times \frac{57,08\%}{100\%} \times \frac{1 \text{ mol C}}{12 \text{ g}} = 0,048 \text{ mol } C_{total}$$

$$C_{IPDMBA} = 0,243 \text{ mmol IPDMBA} \times \frac{12 \text{ mols C}}{1 \text{ mol IPDMBA}} = 2,92 \text{ mmol}$$

$$C_{EGDMA} = 0,048 - 2,92 \text{ mmol} = 0,0451 \text{ mmol}$$

A fração de EGDMA (mmol) foi obtida a partir da quantidade de C presente no agente reticulante:

$$EGDMA = 0,0451 \text{ mmol C} \times \frac{1 \text{ mol EGDMA}}{10 \text{ mols C}} = 4,51 \text{ mmol}$$

A % de conversão de cada reagente foi obtida conforme segue:

$$\%IPDMBA = \frac{0,243 \text{ mmol}}{0,243 \text{ mmol IPDMBA} + 4,51 \text{ mmol EGDMA}} \times 100 = 5,11 \%$$

$$\%EGDMA = \frac{4,51 \text{ mmol}}{0,243 \text{ mmol IPDMBA} + 4,51 \text{ mmol EGDMA}} \times 100 = 94,89 \%$$

Para o IPDMBA-NIP os cálculos foram feitos de modo semelhante.

A Tabela 3 apresenta as % em mmol iniciais e após a polimerização dos reagentes utilizados na síntese. Como pode ser observado, todo o produto TC-IPDMBI, ou seja, todo monômero funcional foi convertido durante a síntese do IPDMBA-MIP. Embora o IPDMBA-MIP tenha uma porcentagem molar de monômero menor que o NIP, isso não interfere na capacidade de adsorção do polímero. Além disso, é possível observar uma elevada quantidade de agente reticulante nos polímeros, principalmente no IPDMBA-MIP. A presença de maior quantidade agente reticulante no IPDMBA-MIP é altamente recomendável para evitar o efeito de inchamento em experimentos de coluna. Portanto, como será demonstrado posteriormente, mesmo o IPDMBA-MIP contendo baixa quantidade de monômero funcional e maior reagente de reticulação teve maior capacidade de adsorção e seletividade para TC em comparação com IPDMBA-NIP.

Tabela 3. Determinação da porcentagem molar de IPDMBA e EGDMA nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP a partir da análise elementar.

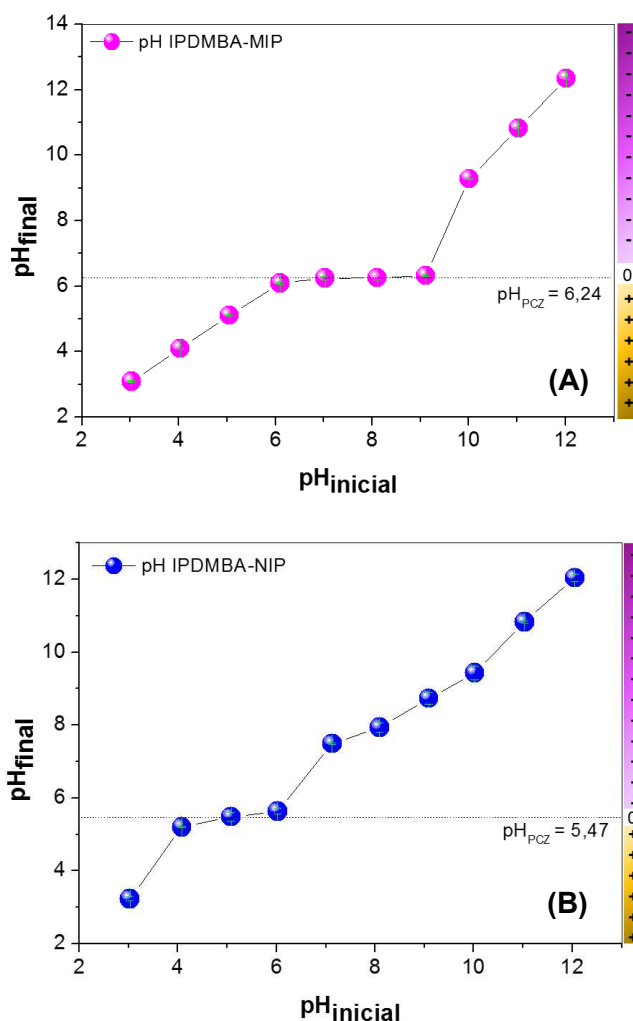
Polímero (%mol)		Polimerização	
		Antes	Depois
IPDMBA- MIP	IPDMBI	4,7	5,1
	EGDMA	95,3	94,9
IPDMBA- NIP	IPDMBI	7,4	13,2
	EGDMA	92,6	86,8

5.3 PONTO DE CARGA ZERO (PCZ) E EFEITO DO PH NA ADSORÇÃO DE TETRACICLINA

O ponto de carga zero (PCZ) é definido como o valor de pH no qual a carga superficial do material adsorvente é zero ou neutro, ou seja, quando as cargas positivas e negativas estão em equilíbrio. A determinação do pH_{PCZ} de materiais adsorventes é uma caracterização importante, visto que este valor permite prever a carga superficial do material ao longo de uma faixa de pH. O material pode apresentar carga superficial positiva quando em soluções com valores de pH menor que o pH_{PCZ} , ou carga negativa para soluções com valores de pH superior ao pH_{PCZ} (HAMI et al., 2019; MOHAMMED; KAREEM, 2019).

Os resultados experimentais para a determinação do pH_{PCZ} são apresentados na Figura 35, em que o diagrama a direita de cada gráfico representa a carga superficial do material de acordo com a variação do pH. De acordo com estes resultados, o pH_{PCZ} para os materiais IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP são 6,24 e 5,47, respectivamente. Portanto, para soluções com pH abaixo do pH_{PCZ} , os polímeros apresentaram uma carga superficial positiva, enquanto soluções com pH superior ao pH_{PCZ} faz com que os materiais adquiram carga superficial negativa. A presença de grupos amino (NH_2) na superfície do IPDMBA-MIP, formados após a clivagem térmica pela quebra da ligação uretana formada entre a TC e o IPDMBI, possivelmente causa um aumento do valor do pH_{PCZ} para este material.

Figura 35. Determinação do pH_{PCZ} para (A) IPDMBA-MIP e (B) IPDMBA-NIP em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os pontos correspondem a média das replicatas ($n=3$) com seus respectivos desvios padrão ($\pm\text{DP}$).

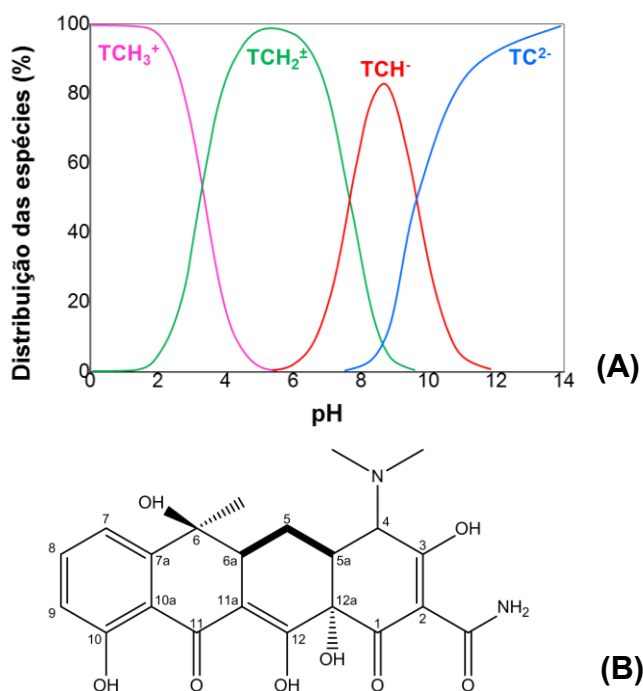


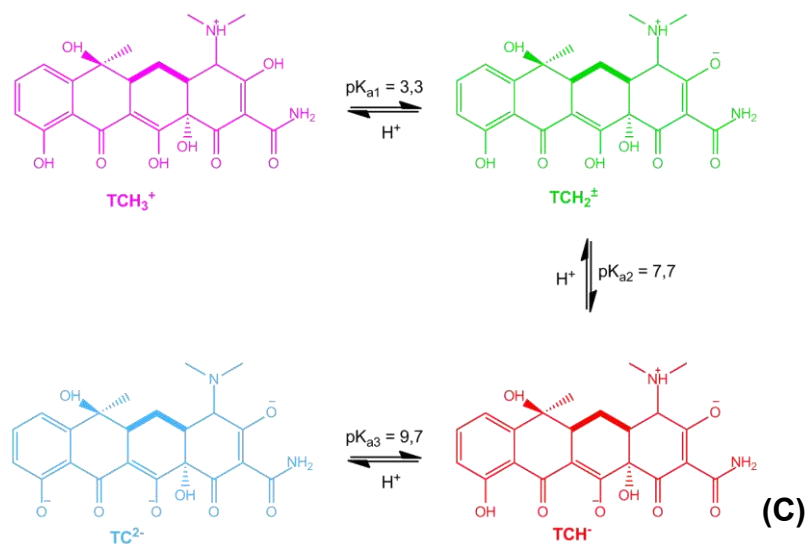
O pH da solução é considerado um dos fatores mais importante que afetam os processos de adsorção, devido a sua influência nas propriedades superficiais do material adsorvente e no grau de ionização das espécies do analito (MOHAMMED; KAREEM, 2019; SOORI et al., 2016).

A especiação química das TCs em função do pH da solução é muito importante para o processo de adsorção. Esses antibióticos são compostos anfóteros com vários grupos funcionais ionizáveis. A TC apresenta diferentes espécies iônicas dependendo do pH da solução, conforme apresentado na Figura 36, com três centros de dissociação de prótons (Figura 30): em C1-C3 sistema tricarbonilamida (pK_a 3,3), O10 e O12 no sistema dicetona fenólico (pK_a 7,7) e em C4 grupo dimetilamônio (pK_a 9,7), além de duas regiões cromóforas, separadas uma da outra pelo -OH12a. Devido a estas dissociações ácidas, a TC

forma 4 séries de espécies iônicas: uma espécie catiônica (TCH_3^+) em solução com pH abaixo de 3,3, devido a protonação do grupo dimetilamônio; em solução com pH entre 3,3 e 7,7, têm-se uma espécie *zwitteriônica* (TCH_2^\pm), devido à perda de prótons do sistema dicetona fenólico; uma espécie aniônica monovalente (TCH^-) aparece em solução com pH entre 7,7 e 9,7; para solução com pH superior a 9,7, prevalecerá a espécie aniônica divalente (TC^{2-}), devido à perda de prótons dos sistemas dicetona fenólico e tricarbonilamida (ANTÓN-HERRERO et al., 2018; MOHAMMED; KAREEM, 2019; PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020; SÁNCHEZ-POLO et al., 2015; SOORI et al., 2016).

Figura 36. (A) Distribuição das espécies da TC em função do pH. (B) Estrutura química da TC e (C) Estrutura química das espécies iônicas da TC associadas aos valores de pKa.

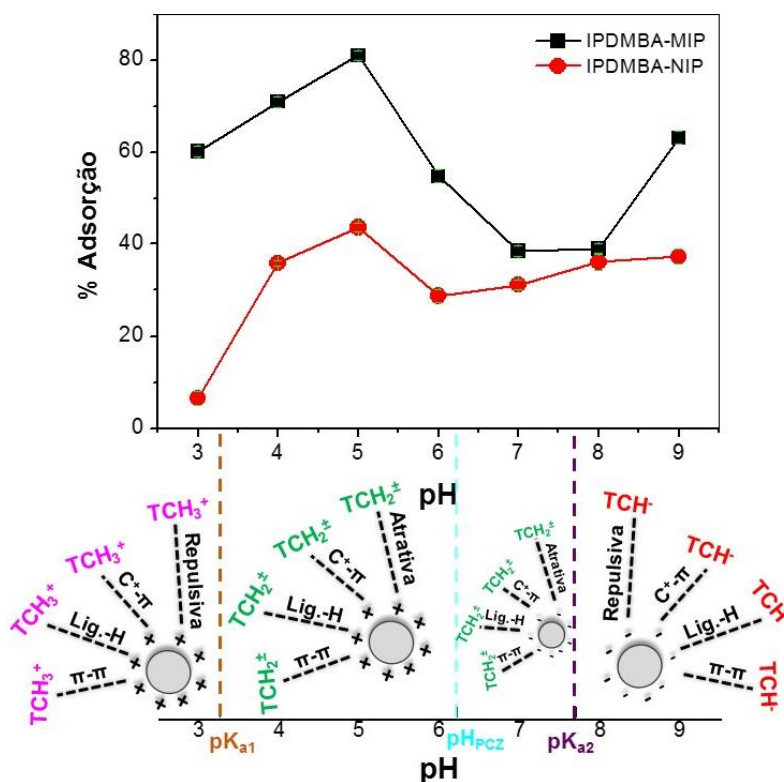




Fonte: Adaptado de (PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020; SÁNCHEZ-POLO et al., 2015)

O efeito do pH na adsorção de TC pelos materiais IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP, apresentado na Figura 37, foi estudado fixando-se a concentração de TC em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ sob soluções com pH na faixa de 3 a 9, sem uso de tampão. Como observado, a TC é adsorvida em toda a faixa de pH estuda para ambos os materiais, com uma maior eficiência de adsorção para o IPDMBA-MIP, demonstrando que este processo se baseia em interações específicas entre a TC e o material. A maior adsorção de TC pelo IPDMBA-MIP possivelmente ocorre pela presença de sítios de ligação específica neste material, e esta adsorção é independente dos dados texturais, uma vez que o IPDMBA-MIP apresenta uma área superficial específica menor que o IPDMBI-NIP (MENDONÇA et al., 2020).

Figura 37. Efeito do pH e possíveis mecanismos de adsorção da tetraciclina usando os polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. Condições: 10 mg de material, 5 mL de TC $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 minutos agitação. Leitura do sobrenadante no sistema BIA-AD: $200 \mu\text{L}$ amostra, $123 \mu\text{L s}^{-1}$, 1,2 V, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5). Os pontos correspondem a média das replicatas ($n=3$) com seus respectivos desvios padrão ($\pm\text{DP}$).



Lig.-H: Ligações de Hidrogênio; $\text{C}^+-\pi$: interação cátion-elétrons π ; $\pi-\pi$: interação elétrons π -elétrons π ; Atrativa/Repulsiva: Interações eletrostáticas atrativas ou repulsivas.

Como é mostrado na Figura 37, à medida que se aumenta o pH da solução de 3 para 5, a capacidade de adsorção aumenta, atingindo um máximo de adsorção em pH 5 (81,0%) e, posteriormente, a adsorção diminui com o aumento do pH, passando de 81,0% para 63,1% em pH 9. Dessa forma, pode-se concluir que a adsorção da TC pelo IPDMBA-MIP apresenta uma dependência do pH da solução, podendo atribuir estes resultados as características estruturais moleculares da TC e dos grupos funcionais na superfície do IPDMBA-MIP.

Considerando que o pH_{PCZ} do IPDMBA-MIP foi de 6,24, Figura 35A, sua superfície pode estar positiva em solução com pH abaixo de 6,24, atribuindo a carga positiva a presença de grupos amino ($-\text{NH}_2$) na superfície do material

impresso, e que este polímero apresentou uma região tamponante de pH 6,24 até aproximadamente pH 9,0, conforme a reação a seguir:



Assim, dentro da faixa de pH estudada, interações eletrostáticas repulsivas podem existir quando:

- pH < 3,3: a TC estará na sua espécie catiônica (TCH₃⁺) (Figura 36A) e a superfície do material estará carregada positivamente (IPMDBA-MIP⁺);
- pH > 9,0 (região tamponante): presença da espécie aniônica da TC (TCH⁻ ou TC²⁻) (Figura 36A) e o material terá sua superfície carregada negativamente (IPMDBA-MIP⁻).

Entretanto, a maior adsorção de TC no IPDMBA-MIP ocorreu em pH 5,0, e nestas condições a TC está aproximadamente 100% na sua forma *zwitteriônica* (TCH₂[±]) (Figura 36A), com ausência de qualquer carga elétrica por quase toda molécula, o que resulta em baixas interações eletrostáticas, sejam elas atrativas ou repulsivas, entre a TC e o IPDMBA-MIP. Portanto, infere-se que interações eletrostáticas não é o mecanismo principal de adsorção da TC no IPDMBA-MIP. Essa sugestão corrobora com o fato de o IPDMBA-MIP adsorver em soluções com pH abaixo de 3,3 e acima de 6,24, mesmo existindo interações eletrostáticas repulsivas entre as moléculas de TC e o material (ZHANG et al., 2015). Assim, estes resultados indicam que o mecanismo principal de adsorção da TC no IPDMBA-MIP seja via complexação de superfície (MOHAMMED; KAREEM, 2019; ZHANG et al., 2015). Resultados semelhantes foram relatados para a adsorção de TC em nanocompósito de óxido de grafeno-sílica magnética amino funcionalizado (PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020), óxido de grafeno magnético funcionalizado com ácido nitriloacético (LI et al., 2017), casca de pistache revestida com nanopartículas de óxido de zinco (MOHAMMED; KAREEM, 2019), sílica SBA15 funcionalizada com grupos aminos e Fe³⁺ (ZHANG et al., 2015), entre outros.

Baseado na estrutura da TC e nos grupos funcionais presentes na superfície do IPDMBA-MIP, interações não eletrostáticas como forças atrativas de van der Waals, ligações de hidrogênio entre moléculas de TC e com a superfície do material impresso, interações π- π, podem contribuir e ajudar a

explicar o mecanismo de adsorção via complexação de superfície (ERSAN et al., 2015; LI et al., 2017; MOHAMMED; KAREEM, 2019; ZHANG et al., 2015; ZHAO et al., 2011). Sugestões de possíveis mecanismos de adsorção são apresentados na Figura 37.

Sabe-se que as TCs podem assumir diferentes conformações em solução, bem como no estado sólido. Essas conformações dependem da natureza do solvente, da posição e da natureza dos substituintes, da coordenação do metal, e estes fatores tem forte influência no comportamento farmacocinético destes antibióticos (AGUILAR-GARCÍA et al., 2016). Em soluções ácidas ou neutras, a TC assume uma conformação torcida, devido à forte repulsão existente entre o grupo dimetilamônio protonado (C4) e o -OH_{12a}, ao passo que em soluções básicas, uma conformação do tipo “cadeira estendida” seja adotada pois C1, C2, C3 e o carbono amida ficam acima do plano do anel BCD (Figura 30 e Figura 36B). Em ambas as situações, as conformações permitem uma ligação de hidrogênio entre os grupos N4 e -OH_{12a} (AGUILAR-GARCÍA et al., 2016; BOJCZUK et al., 1993). Assim, estas conformações permitem que ocorra ligações de hidrogênio entre os grupos polares da TC (grupos hidroxila e amida) e o grupo NH₃⁺ presente na superfície do IPDMBA-MIP (AGUILAR-GARCÍA et al., 2016). Contudo, em soluções básicas, essas ligações de hidrogênio específicas competem com as forças repulsivas entre C₁₂-O⁻ e a carga negativa presente no material (AGUILAR-GARCÍA et al., 2016). Ainda, as ligações de hidrogênio podem ocorrer entre os grupos hidroxila e amina da TC e os grupos funcionais contendo oxigênio (principalmente hidroxila e carbonila) do IPDMBA-MIP e de outras moléculas de TC (LI et al., 2017; PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020).

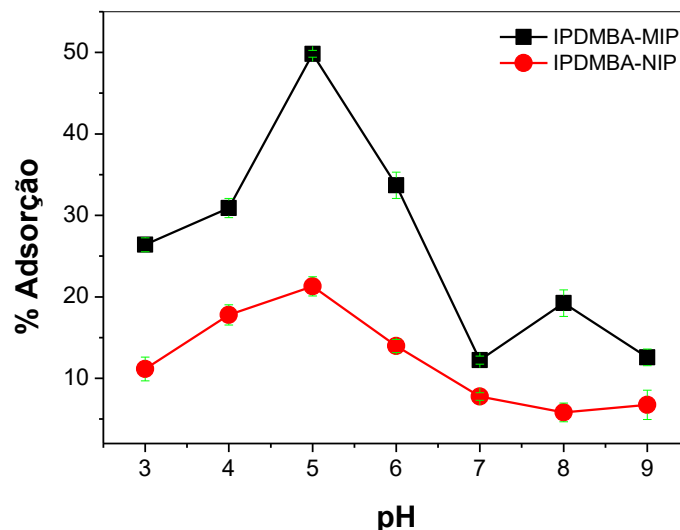
A presença do grupo amino em C4 na molécula de TC (Figura 30 e Figura 36B) e a facilidade de protonação deste grupo, pode também favorecer a adsorção da TC pelo IPMDBI-MIP. Isso porque, pode haver interações entre C₄-NH(CH₃)₂⁺ da TC e elétrons π do IPDMBA-MIP ou TC (Figura 11B). O IPDMBA-MIP também apresenta grupos aminos em sua superfície que podem ser facilmente protonados, proporcionando a mesma interação. Logo, poderá haver interações cátion-elétrons π entre grupo amino protonado e estruturas ricas em elétrons π. Além disso, interações π-π também podem ocorrer, como por exemplo, entre os elétrons π dos anéis aromáticos presentes nas estruturas

da TC e do IPDMBI (LI et al., 2017; PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020; PRIYA; RADHA, 2017).

Os resultados e a discussão aqui apresentados, sugerem que a adsorção de TC seja fortemente dependente do tipo de grupos funcionais presentes na superfície do material adsorvente, e a presença de grupos com nitrogênio favorecem essa adsorção. A literatura reporta que materiais que contenham grupos funcionais com nitrogênio, como por exemplo os grupos aminos, favorecem a adsorção de resíduos farmacêuticos, devido forte capacidade quelante desses grupos (LI et al., 2017, 2018b; PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020).

Foi estudado também se o meio tamponado influenciaria na adsorção de TC pelos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP, conforme apresentado na Figura 38. Com o meio tamponado foram obtidas baixas percentagens de recuperação, comparado ao meio sem tampão. Estes resultados podem ser explicados devido a uma adsorção competitiva entre os íons presentes em solução e a TC nos diferentes sítios ativos do material. Para o preparo do tampão Britton-Robinson (BR), são utilizados volumes adequados da solução padrão de ácido bórico, ácido acético e ácido fosfórico, que em solução formam os ânions BO_3^{3-} , COO^- e PO_4^{3-} , respectivamente. Em solução, esses íons podem se ligar aos grupos NH_3^+ presentes na TC e no IPDMBA-MIP, prejudicando a adsorção da TC pelo material. A alta carga de valência dos íons também pode ser um fator que prejudica a adsorção da TC, pois estes possuem um maior raio iônico e ocupam mais sítios ativos. Além disso, a literatura também reporta que a TC tem alta tendência em formar complexos com íons solúveis em água, especialmente os mono e divalentes, como é o caso do COO^- (PRARAT; HONGSAWAT; PUNYAPALAKUL, 2020; SOORI et al., 2016; WEI et al., 2019; ZHU et al., 2020).

Figura 38. Efeito do pH em meio tamponado (tampão BR 0,01 mol L⁻¹) na sorção de tetraciclina usando os polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP. Condições: 10 mg de material, 5 mL de TCs 50 μmol L⁻¹, 2 minutos agitação. Leitura do sobrenadante no sistema BIA-AD: 200 μL amostra, 123 μL s⁻¹, 1,2 V, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5). Os pontos correspondem a média das replicatas (n=3) com seus respectivos desvios padrão (±DP).



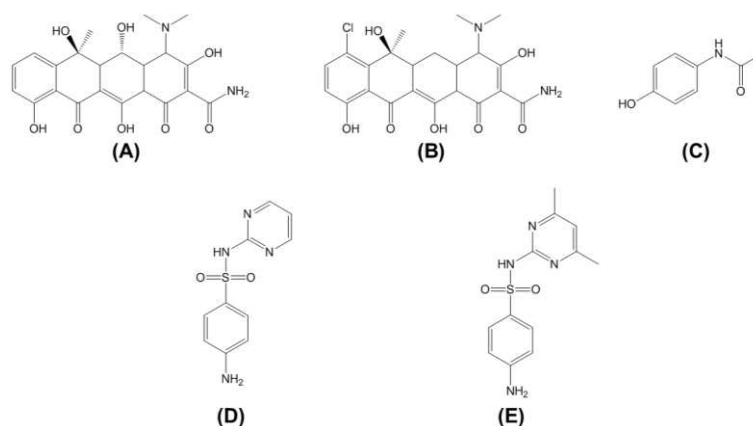
5.4 ESTUDO DO EFEITO DE IMPRESSÃO

A finalidade do estudo do efeito de impressão é avaliar se o material impresso sintetizado com a MM apresenta sítios adsorptivos seletivos para o analito em questão, em comparação com o material controle não impresso (MARESTONI et al., 2013). Esse efeito de impressão é avaliado a partir dos coeficientes de distribuição (K_d), seletividade (k) e seletividade relativa (k'). Os valores de K_d fornecem o grau de retenção do analito e da molécula interferente nos polímeros impresso (MIP) e não impresso (NIP). Para indicar o efeito de impressão, espera-se que o MIP apresente um valor de K_d maior que do NIP. Entretanto, como estes valores podem estar associados às propriedades texturais do polímero e não apenas ao efeito de impressão química, faz-se necessário avaliar também os coeficientes de seletividade e seletividade relativa. Assim como o K_d , quanto maior o valor de k , maior a capacidade de adsorção do analito comparado ao interferente. Como este também não deve ser analisado isoladamente, o k' também precisa ser considerado. Assim, quando se

compara o k do MIP em relação k do NIP e essa razão foi maior que 1, tem-se então a confirmação do efeito de impressão (MARESTONI et al., 2013).

Para comprovar o efeito de impressão, foram realizados estudos de adsorção com o IPDMBA-MIP e seu material controle IPDMBI-NIP. Clorotetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC) foram selecionados por serem análogos estruturais da molécula de TC e pertencerem a família das TCs, enquanto as moléculas de paracetamol (PAR), sulfametazina (SMZ) e sulfadiazina (SDZ) foram escolhidas por apresentarem estrutura com tamanho e grupos funcionais similares a TC, bem como por serem medicamentos que podem estar presente nas amostras reais (CHEN et al., 2009; DAI et al., 2012; GAO et al., 2020; WU et al., 2018a, 2018b; ZHAO et al., 2014). A estrutura química dos interferentes estão apresentados na Figura 39.

Figura 39. Estrutura química das moléculas (A) oxitetraciclina (OTC), (B) clorotetraciclina (CTC), (C) paracetamol (PAR), (D) sulfadiazina (SDZ) e (E) sulfametazina (SMZ).



Foram determinados os coeficientes de distribuição (K_d), Figura 40, seletividade (k) (dados não apresentados) e seletividade relativa (k'), Figura 41, em que estes foram obtidos a partir das soluções binárias de TC:molécula interferente com concentração de 1 mg L^{-1} do analito e da molécula interferente.

Analisando os valores K_d para TC:PAR, Figura 40, observa-se que o IPDMBA-MIP adsorve muito mais TC e menos PAR quando comparado ao IPDMBI-NIP. Para as misturas binárias TC:SDZ e TC:SMZ, observa-se que o IPDMBA-MIP adsorveu mais SDZ e SMZ e menos a TC, apesar do IPDMBI-NIP adsorve ainda mais SDZ e SMZ que TC. Tal fato pode ser explicado, considerando que SDZ e SMZ possuem coeficiente de partição n-octanol/água

(log K_{ow}) de -0,09 e 0,89, respectivamente, sendo esses valores maior que o log K_{ow} para a TC (-1,40) (CONDE-CID et al., 2020; REGITANO; LEAL, 2010). O maior valor desse coeficiente indica que as sulfonamidas SDZ e SMZ possuem menor afinidade com água e, portanto, podemos inferir que estabelecem facilmente ligações com os sítios disponíveis no polímero (CASARIN et al., 2018). No entanto, vale ressaltar que, embora maiores valores de K_d tenha sido observado para SDZ e SMZ, isso não implica em maior seletividade para essas moléculas. A seletividade do IPDMBA-MIP em relação ao IPDMBI-NIP deve ser avaliada pelo coeficiente k' , quando este possui valor maior que 1,0 (MARESTONI et al., 2013). Assim, os dados apresentados mostram que o IPDMBA-MIP possui sítios seletivos para TC, pois mesmo as moléculas interferentes possuírem estruturas e grupos funcionais semelhantes a TC, houve uma adsorção preferencial da TC.

Para os análogos estruturais da TC, OTC e CTC temos um k' muito próximo de 1,0 (Figura 41). Tal fato pode ser explicado devido à similaridade estrutural entre as moléculas, exceto pelos átomos de hidrogênios nos carbonos C-7 e C-5 serem substituídos por cloro e hidroxila para CTC e OTC, respectivamente. Assim, podemos concluir que o IPDMBA-MIP apresenta efeito de impressão para a TC, bem como para seus análogos estruturais da família das TCs, indicando que os sítios seletivos da superfície são complementares em forma, tamanho e distribuição espacial as moléculas. Essa é uma característica comum para polímeros impressos para TCs, devido à forte semelhança no arranjo funcional dos grupos e do tamanho tridimensional dessas moléculas (CHEN et al., 2009; DAI et al., 2012, 2014a; GAO et al., 2020; HU et al., 2008; LU et al., 2020; MIRZAEI et al., 2013).

Figura 40. Parâmetro relacionado ao efeito de impressão (K_d), na adsorção binária para os sistemas (A) TC/PAR, (B) TC/SDZ, (C) TC/SMZ, (D) TC/OTC e (E) TC/CTC. Condições experimentais: 10,0 mg de cada polímero, concentração de 1,0 mg L⁻¹ e agitação por 15 minutos.

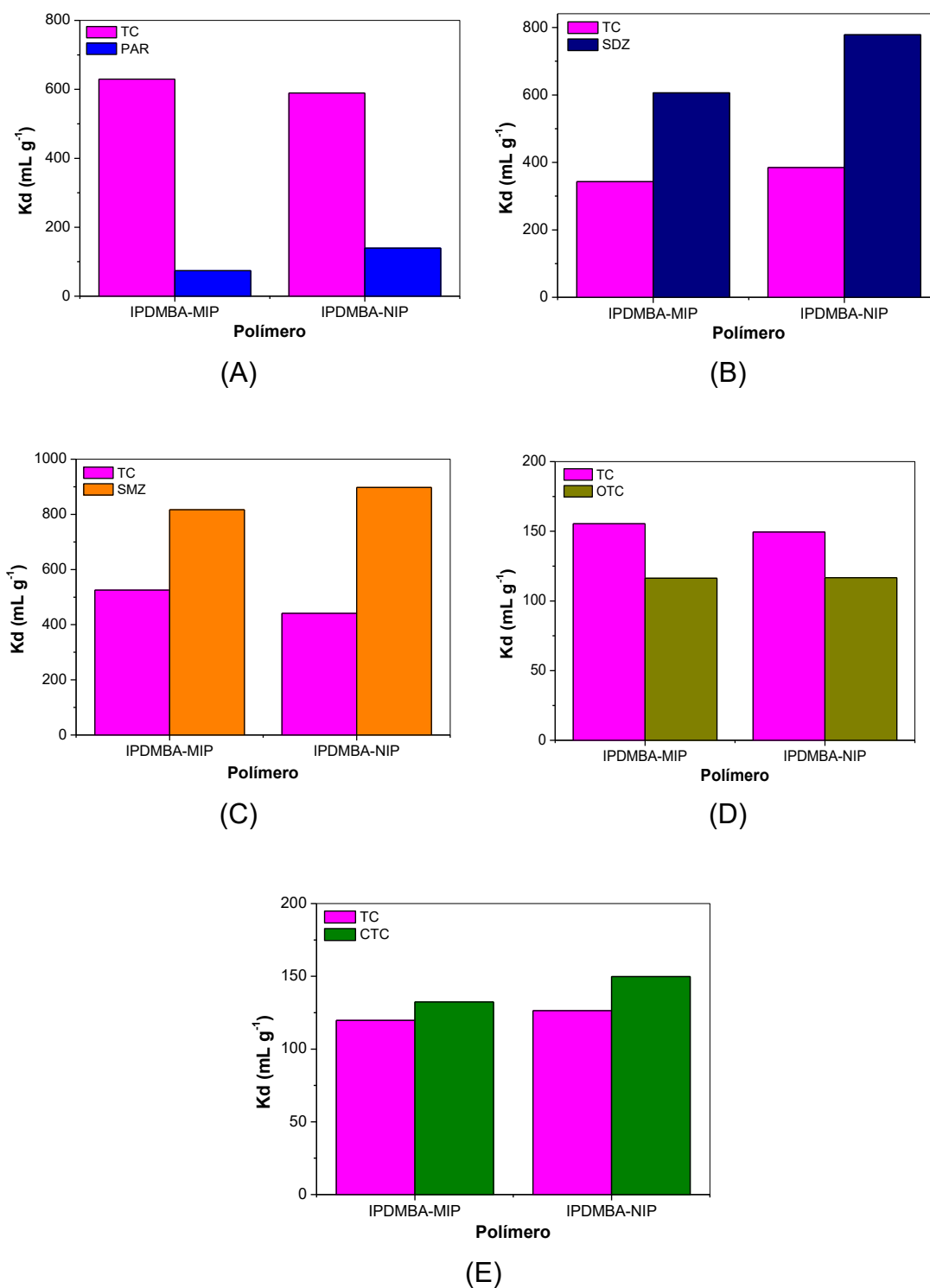
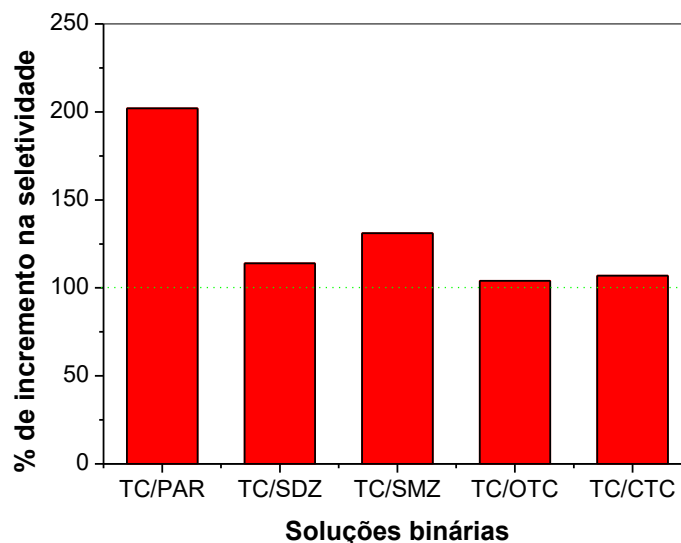


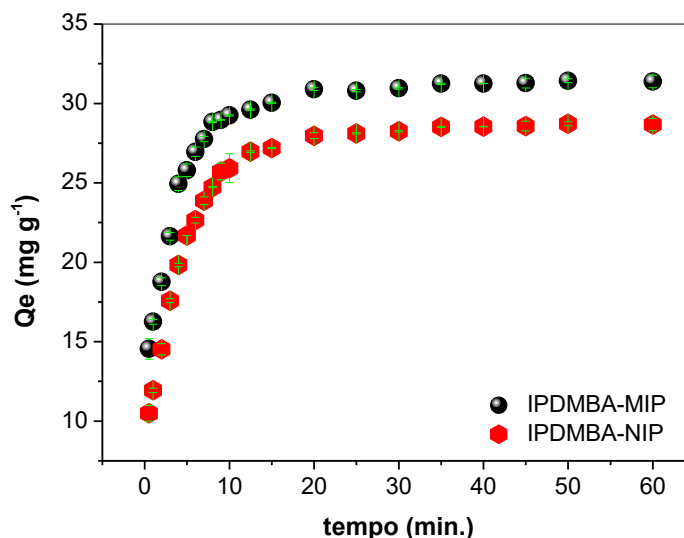
Figura 41. Percentagem de incremento na seletividade, relacionado ao efeito de impressão (k'), na adsorção binária dos sistemas TC/PAR, TC/SDZ, TC/SMZ, TC/OTC e TC/CTC. Condições experimentais: 10,0 mg de cada polímero, concentração de 1,0 mg L⁻¹ e agitação por 15 minutos.



5.5 CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE TETRACICLINA NOS POLÍMEROS IPDMBA-MIP E IPDMBA-NIP

O estudo cinético de adsorção exerce uma função importante para se compreender o mecanismo de adsorção entre adsorvente e adsorvato e etapas limitantes do processo, além de determinar o tempo mínimo de contato para que se atinja o equilíbrio entre as fases líquida e sólida (DAI; LI; SHAN, 2020; ZANG et al., 2019). Assim, o efeito do tempo de adsorção de TC pelos materiais IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP foram avaliados e seus perfis cinéticos são apresentados na Figura 42.

Figura 42. Estudo da influência do tempo de contato da TC com os polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.



É possível observar que ambos os polímeros apresentam um perfil cinético similar, com um rápido aumento da adsorção de TC pelos materiais logo na fase inicial do processo, seguido de uma diminuição da taxa de adsorção a medida que o número de sítios ativos livres diminuía até que o equilíbrio foi alcançado em 15 minutos, com capacidade de adsorção, nessas condições, de 30,19 mg g⁻¹ e 27,09 mg g⁻¹ para o IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP, respectivamente. Este comportamento cinético é típico de processos de adsorção que geralmente dependem do número de locais de adsorção disponíveis no material adsorvente. Além disso, pode atribuir-se a rápida taxa de adsorção ao tamanho dos poros, que aumentam a transferência de massa interna no processo de adsorção, e a presença de grupos funcionais dentro dos poros que podem fornecer locais de ligação (CHEN et al., 2017a).

A alta adsorção de TC no IPDMBA-NIP neste estudo, comparado ao estudo anterior (Estudo do pH, sessão 5.4) pode ser explicado devido a uma possível influência do tipo de agitação e da área superficial do material, pois apesar de a velocidade de agitação da mesa agitadora usada neste estudo ser menor que a do vórtex (Estudo do pH, sessão 5.4), o tempo de contato entre a solução e o material é maior e mais homogêneo e, devido a sua alta área superficial (206,12 m² g⁻¹), a adsorção não-específica é favorecida, já que ainda assim apresenta um Q_e menor que o do IPDMBA-MIP.

Comparado com alguns métodos relatados na literatura para polímeros impresso para TC, que exigiam alto tempo de equilíbrio de adsorção (exemplo, 100 min (DAI et al., 2012), 60 min (GAO et al., 2020), 30 mi (LI et al., 2018a), 88 min (MA et al., 2020), 480 min (NIU et al., 2016)), a taxa de adsorção de IPDMBA-MIP é melhor, indicando que os sítios impressos específicos de IPDMBA-MIP reduzem a resistência à transferência de massa, tornando o TC mais fácil de ser reconhecido (ZHOU et al., 2020). Portanto, o IPDMBA-MIP mostra-se mais vantajoso visto que a rápida adsorção associada ao alcance do equilíbrio em um curto período, evidencia a eficiência do material para a adsorção de TC. Resultados similares, em termos de tempo de equilíbrio e perfil cinético podem ser encontrados na literatura (DAI; LI; SHAN, 2020; YU; MA; HAN, 2014).

A fim de investigar o mecanismo de adsorção e sua etapa limitante que incluem transferência de massa e processo de reação química, foram aplicados aos dados cinéticos, os modelos não-lineares de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem (PPO e PSO), e os modelos lineares de Elovich e Difusão Intrapartícula. Os modelos de PPO e PSO são os modelos cinéticos de sorção mais empregados para a descrição de processos adsorptivos, pois estes modelos preconizam que a ordem de uma reação depende da taxa de ocupação dos poros do adsorvente (HO, 2006; HO; MCKAY, 1999; MA et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; PLAZINSKI; RUDZINSKI; PLAZINSKA, 2009). Os ajustes dos modelos cinéticos aos dados experimentais estão apresentados nas Figura 43 à Figura 45. As constantes cinéticas de adsorção e os valores de regressão linear para os quatro modelos aplicados, bem como os parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para adsorção de TC nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP aplicando os modelos não-lineares de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, e os modelos lineares de Elovich e Difusão Intrapartícula. Dados: $Q_{e(\text{experimental})}$: 30,19 mg g⁻¹ e 27,09 mg g⁻¹ para IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP, respectivamente.

Modelo	Parâmetro	Polímeros			
		IPDMBA-MIP		IPDMBA-NIP	
PPO $Q_t = Q_e (1 - e^{-k_1 t})$	k_1 (min ⁻¹)	0,56		0,35	
	Q_e (mg g ⁻¹)	29,96		27,69	
	R^2	0,81		0,89	
PSO $Q_t = \frac{Q_e^2 k_2 t}{k_2 Q_e (t + 1)}$	k_2 (g mg ⁻¹ min ⁻¹)	0,03		0,02	
	Q_e (mg g ⁻¹)	31,86		29,8	
	R^2	0,95		0,96	
Elovich $Q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t$	α (min ⁻¹ mg g ⁻¹)	134,18	$6,07 \times 10^{20}$	52,36	$2,74 \times 10^{15}$
	β (g mg ⁻¹)	0,19	1,67	0,18	1,39
	R^2	0,97	0,82	0,97	0,91
Difusão Intrapartícula $Q_t = k_{id} t^{1/2} + C$	C (mg g ⁻¹)	9,19	25,23	6,38	
	k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-1/2})	7,27	1,26	6,34	
	R^2	0,98	0,99	0,97	

PPO= modelo cinético de pseudo-primeira ordem; PSO= modelo cinético de pseudo-segunda ordem; Q_e = quantidade de TC adsorvida no tempo de equilíbrio; K_1 = constante de pseudo-primeira ordem; K_2 = constante de pseudo-segunda ordem; α = taxa de velocidade inicial de sorção; β = constante relacionada com a extensão da superfície da cobertura e a energia de ativação; K_{id} = coeficiente de difusão interno; C = constante relacionada com a espessura da camada limite.

Conforme expostos na Tabela 4, baseado no alto coeficiente de determinação (R^2) e na proximidade entre a capacidade adsortiva (Q_e) experimental e a prevista pelos modelos, os resultados sugerem que o modelo cinético de PSO foi predominante e descreve melhor o processo de adsorção de TC para ambos os polímeros. Estes resultados indicam a presença de sítios energeticamente diferentes e que a taxa de adsorção foi controlada principalmente por quimissorção, devido a diferentes interações que podem ocorrer entre a superfície dos materiais e a TC como ligações de hidrogênio, interações π - π e cátion- π , entre outras descritas anteriormente no estudo de pH (CHEN et al., 2017a; DAI et al., 2014a; LI et al., 2018a; WU et al., 2018a; ZHAO et al., 2014). Ademais, o bom ajuste dos dados experimentais ao modelo de Elovich, com a

presença de dois segmentos lineares (Figura 44) indicando sítios ativos energeticamente heterogêneos, corrobora com o melhor ajuste dos dados experimentais ao modelo de PSO, visto que estes são modelos complementares e preveem a adsorção ocorrendo em sítios com energias diferentes (AZIZIAN, 2004; NASCIMENTO et al., 2020; QIU et al., 2009; WU; TSENG; JUANG, 2009b).

Figura 43. Modelos de cinéticos de adsorção (A) pseudo-primeira ordem e (B) pseudo-segunda ordem para IPDMBA-MIP e, (C) pseudo-primeira ordem e (D) pseudo-segunda ordem para IPDMBA-NIP.

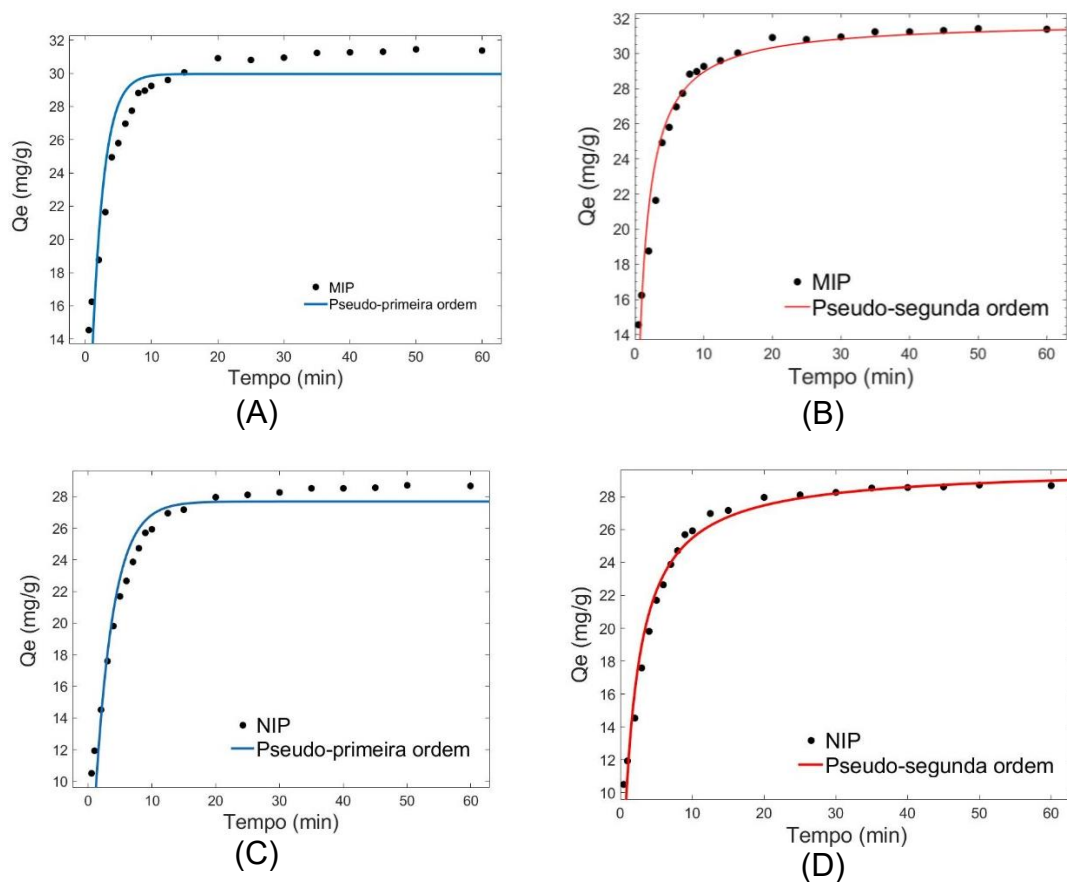
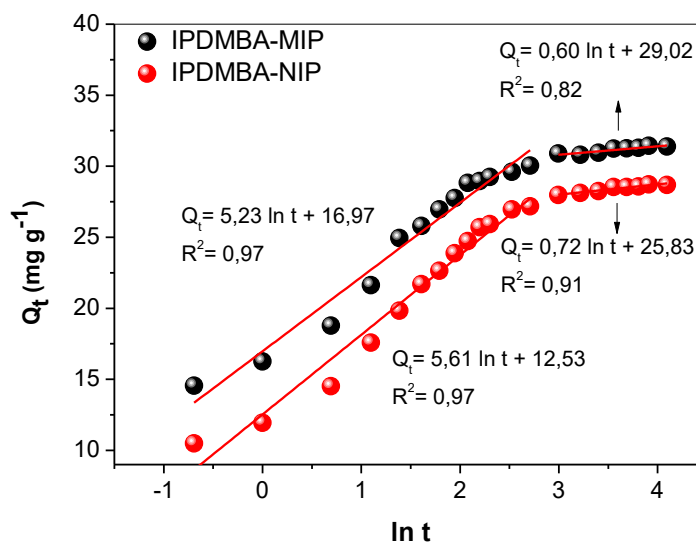


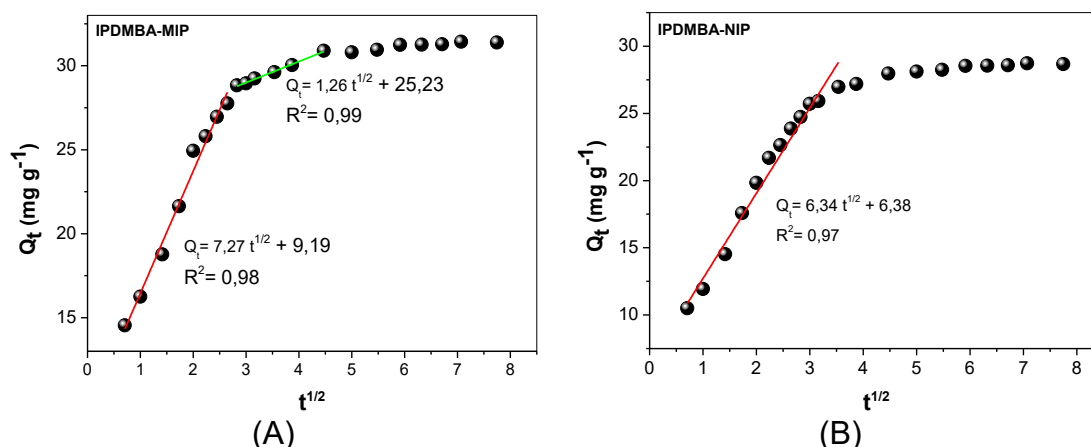
Figura 44. Modelos de cinéticos de Elovich para IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.



O modelo de Difusão Intrapartícula apresentou bom ajuste à ambos os materiais, apresentando três etapas consecutivas para o IPDMBA-MIP e duas para IPDMA-NIP. A primeira etapa (primeiro segmento linear, Figura 45) refere-se à adsorção instantânea devido a difusão do analito para a superfície externa do material adsorvente, enquanto a segunda etapa (segundo segmento linear, Figura 45) refere-se a difusão intrapartícula, etapa limitante do processo, em que o analito adsorve-se no interior do material lenta e gradualmente. Por fim, tem-se a terceira etapa (não apresentada na Tabela 4) indicando que a difusão intrapartícula diminuiu devido à baixa presença de sítios ativos livres e, portanto, atingiu-se o equilíbrio (KAJJUMBA et al., 2018; ZHAO et al., 2014).

O IPDMBA-NIP apresentou duas etapas consecutivas, sendo a primeira (segmento linear, Figura 45) referente a adsorção do analito na superfície externa do material, seguido pela etapa de equilíbrio (não apresentado na Tabela 4). Os valores da espessura da camada limitante (C), apresentado na Tabela 4, para ambos os materiais são diferentes de zero, indicando que a difusão intrapartícula não é o único processo responsável pela adsorção de TC, pois esta adsorção também pode ocorrer na superfície do material. Ainda, o IPDMBA-MIP apresenta espessura de camada limite maior do que o IPDMBA-NIP, sugerindo assim a presença de maior número de locais de ligação na superfície externa deste adsorvente (CASARIN et al., 2017; CHEUNG; SZETO; MCKAY, 2007; OLIVEIRA et al., 2013; PRETE; TARLEY, 2019).

Figura 45. Modelos de cinéticos de Difusão Intrapartícula para (A) IPDMBA-MIP e (B) IPDMBA-NIP.



Assim, os resultados aqui apresentados comprovam a presença de locais de ligação no IPDMBA-MIP e sugerem que a TC foi quimicamente adsorvida na superfície do material, em sítios energeticamente heterogêneos. Além disso, a rápida cinética de adsorção do IPDMBA-MIP mostra ser uma característica importante para o processo de adsorção.

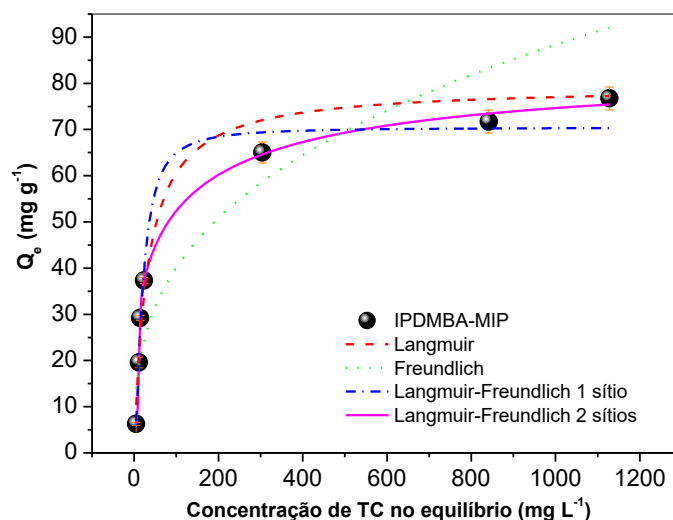
5.6 ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE TETRACICLINA NOS POLÍMEROS IPDMBA-MIP E IPDMBA-NIP

Uma isoterma de adsorção representa a relação de equilíbrio entre a concentração de adsorvato na fase líquida e na superfície do adsorvente em uma determinada condição. A partir dos resultados desse estudo, é possível conhecer a capacidade máxima de adsorção do material adsorvente, bem como obter informações a respeito da interação entre adsorvato e adsorvente (AGARRY; OGUNLEYE, 2014; BERGMANN; MACHADO, 2015).

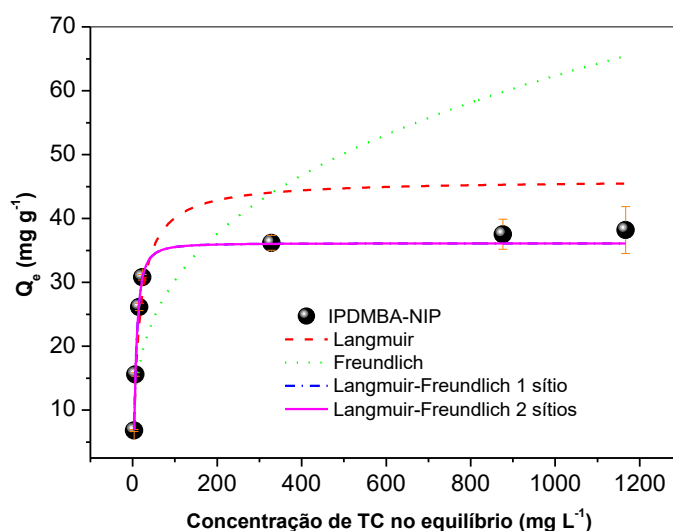
As isotermas de adsorção obtidas para os polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP estão apresentadas na Figura 46A e B, respectivamente. Aos dados experimentais, foram aplicados os modelos não lineares de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich para um e dois sítios de adsorção, a fim de obter informações sobre a presença de sítios de ligação, bem como elucidar o fenômeno adsorptivo. Os parâmetros ajustados pelos modelos não lineares de isotermas aplicados estão dispostos na Tabela 5. Cabe salientar que este estudo foi realizado na faixa de concentração de TC de 10 a 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (4,44 mg L⁻¹ a 1,33 g L⁻¹), e que concentrações acima de 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1,33 g L⁻¹) não foram

utilizadas devido a sua precipitação em solução aquosa, não atingindo, portanto, a saturação das isotermas.

Figura 46. Isotermas de adsorção de TC nos polímeros (A) IPDMBA-MIP e (B) IPDMBA-NIP e ajuste aos dados empregando os modelos não lineares de Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich para 1 e 2 sítios.



(A)



(B)

Para o IPDMBA-MIP, conforme dados apresentados na Tabela 5, o modelo de isoterma de Langmuir-Freundlich para 2 sítios apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais, considerando o valor de coeficiente de determinação (R^2) mais próximo de um e o menor valor de qui-quadrado (χ^2), bem como, a quantidade máxima de TC adsorvida pelo polímero experimentalmente ($Q_{e, \text{exp}} = 76,74 \text{ mg g}^{-1}$) encontra-se próxima ao valor predito

pelo modelo, determinado pela somatória dos parâmetros b_1 e b_2 ($Q_{e, cal} = 86,13 \text{ mg g}^{-1}$). Observa-se também, que ocorreu no sítio de maior afinidade ($K_2 = 0,0829 \text{ L mg}^{-1}$) uma menor adsorção de TC ($b_2 = 21,3859 \text{ mg g}^{-1}$), enquanto o sítio de menor afinidade ($K_1 = 0,0089 \text{ L mg}^{-1}$) uma maior adsorção ($b_1 = 64,7462 \text{ mg g}^{-1}$). Tal fato pode ser explicado considerando que, no sítio de maior afinidade esteja presente o grupo amino na superfície do IPDMBA-MIP formado após a clivagem e que sua menor adsorção se deve a uma menor quantidade desses sítios presentes no material. A alta intensidade de adsorção desse sítio ($n_2 = 7,2853$) pode ser oriunda de interações do tipo ligações de hidrogênio entre o material IPDMBA-MIP e a TC, vista que esse tipo de interação é mais forte que as demais que podem ocorrer entre o material e a molécula (como interações π - π e cátio- π , entre outras descritas anteriormente no estudo de pH). Assim, considera-se que a maior adsorção ocorra nos sítios de menor afinidade, pois houve uma maior quantidade de sítios capazes de fornecer interações mais fracas entre a superfície do material e a TC, visto que a intensidade de adsorção desses sítios é baixa ($n_1 = 0,7029$).

Em contrapartida, para o IPDMBA-NIP, os modelos de isoterma de Langmuir-Freundlich para 1 e 2 sítios apresentaram bom ajuste, sendo que o modelo para 1 sítio apresentou um valor de coeficiente de determinação (R^2) maior (0,9979) e um valor de qui-quadrado (χ^2) mais baixo (1,4437). Os parâmetros obtidos para o modelo de Langmuir-Freundlich para 2 sítios apresentaram os mesmos valores do modelo de 1 sítio. Tais resultados nos mostram que o material possui sítios com mesma afinidade pela TC, nos remetendo a não impressão do material, e que nestes sítios ajam apenas interações fracas entre a superfície do material e a TC. Estes resultados demonstram novamente que o IPDMBA-MIP possui efeito de impressão química, com a presença de locais de ligação heterogêneos devido a formação de complexos pré-polimerização entre MF e MM (UMPLEBY et al., 2004; YEŞILOVA et al., 2018). Ainda, o IPDMBA-MIP possui sítios com intensidade de adsorção muito superior ao do IPDMBA-NIP. Assim, devido a contribuição dos sítios de ligação específica no IPDMBA-MIP este material tem uma capacidade adsortiva maior que o IPDMBA-NIP.

Tabela 5. Parâmetros calculados para os modelos não lineares de Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich para 1 e 2 sítios aplicados aos dados experimentais no estudo de isoterma de adsorção da TC nos polímeros IPDMBA-MIP e IPDMBA-NIP.

Modelo	Parâmetro	IPDMBA-MIP	IPDMBA-NIP
Langmuir	K_L (L mg ⁻¹)	0,0321	0,0674
	b (mg g ⁻¹)	79,4141	46,0481
	R ²	0,9266	0,9321
	χ^2	48,3751	47,8204
Freundlich	K_F (L mg ⁻¹)	8,2289	7,1350
	n	2,9098	3,1861
	R ²	0,6285	0,5054
	χ^2	244,8648	348,2495
Langmuir-Freundlich (1 sítio)	K (L mg ⁻¹)	0,0499	0,1253
	b (mg g ⁻¹)	70,4600	36,1120
	n	1,5290	1,6267
	R ²	0,9824	0,9979
	χ^2	11,6226	1,4437
Langmuir-Freundlich (2 sítios)	K_1 (L mg ⁻¹)	0,0089	0,1253
	b_1 (mg g ⁻¹)	64,7462	18,0556
	n_1	0,7029	1,6268
	K_2 (L mg ⁻¹)	0,0829	0,1253
	b_2 (mg g ⁻¹)	21,3859	18,0556
	n_2	7,2853	1,6267
	R ²	0,9988	0,9918
χ^2	0,8129	5,7747	

$K_{1,2}$ - constante de equilíbrio; K_L - constante de Langmuir e K_F - constante de Freundlich; parâmetros relacionados à afinidade adsorvente-adsorvato; $b_{1,2}$ - capacidade máxima de sorção; $n_{1,2}$ - um parâmetro empírico relacionado a heterogeneidade da superfície do adsorvente e com a intensidade de adsorção.

A Tabela 6 apresenta a quantidade máxima adsorvida em batelada para o material adsorvente proposto (IPDMBA-MIP) em comparação com outros MIPs para TCs. Observa-se que o IPDMBA-MIP apresenta uma capacidade máxima

adsortiva superior aos outros materiais descritos na literatura. Além disso, os resultados apresentados mostram que o IPDMBA-MIP possui ótimas características para ser empregado como material adsorvente em SPE.

Tabela 6. Comparação da capacidade adsortiva de polímeros molecularmente impressos utilizados para adsorção de TCs descritos na literatura.

Material adsorvente	Capacidade adsortiva (mg g ⁻¹)	Referência
MMINs	12,51	(DAI et al., 2012)
MHNTs-MIP	48,37	(DAI et al., 2014a)
MMINs	12,86	(DAI et al., 2014b)
MMIP NPs	40,48	(GAO et al., 2020)
HMIP@CD	6,93	(LI et al., 2018a)
MIP-SPME	2,35	(LU et al., 2020)
MPS/SiO ₂	42,30	(NIU et al., 2016)
M-MIP	34,00	(PIZAN-AQUINO et al., 2020)
SpIMs	45,75	(WU et al., 2018b)
MINCMs	67,43	(WU et al., 2018a)
MIP@CD	0,535	(YANG et al., 2018)
MIP	11,90	(ZHAO et al., 2014)
MIP	16,44	(AGUILAR et al., 2020)
HMIP	8,95	(SUN et al., 2016)
IPDMBA-MIP	76,74	Este trabalho

MMINs: nanopartículas superparamagnéticas impressas molecularmente; MHNTs-MIP: polímero molecularmente impresso na superfície de nanotubos magnéticos de halloysite; MMIP NPs: nanopartículas magnéticas impressas molecularmente; HMIP@CD: polímero oco molecularmente impresso suportado em quantum dots de carbono; MIP-SPME: microextração em fase sólida molecularmente impressa; MPS/SiO₂: superfície de sílica impressa molecularmente; M-MIP; polímero magnético impresso molecularmente; SpIMs: nanocompósito com membranas impressas a base de SiO₂/pDA; MINCMs: Membranas de nanocompósitos com impressão molecular com domínios de nanoestruturas de Janus; MIP@CD: carbon dots impresso molecularmente; MIP: polímero impresso molecularmente; HMIP: polímero hidrofílico impresso molecularmente; IPDMBA-MIP: poli(3-isopropenil- α , α -dimetilbenzil).

5.7 OTIMIZAÇÃO DO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MISPE) PARA EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE TETRACICLINA

5.7.1 Estudo da Massa do Adsorvente IPDMBA-MIP na Pré-Concentração de Tetraciclina

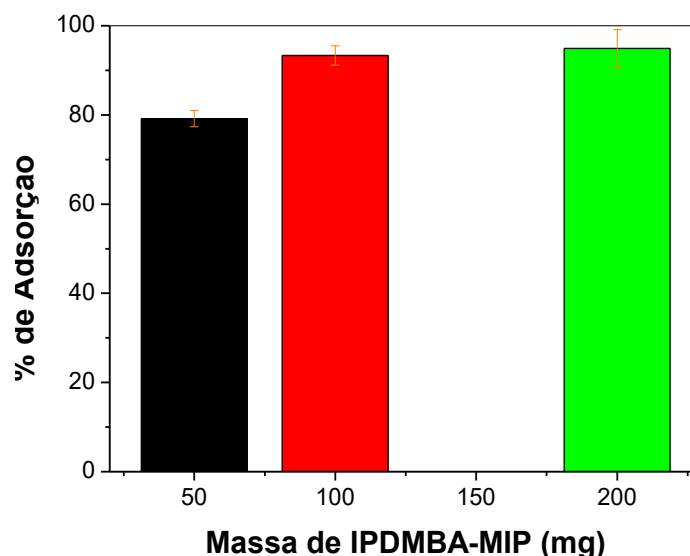
A fim de avaliar a influência da massa do material adsorvente que preenche o cartucho de SPE, foram estudados 50, 100 e 200 mg do material IPDMBA-MIP. Inicialmente cada cartucho foi condicionado com 10 mL de água

ultrapura e, em seguida, foram percolados 20,0 mL de uma solução de 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em pH 5,0 com vazão de 2,0 mL min^{-1} . O efluente foi recolhido e injetado diretamente no sistema BIA-AD. Cabe salientar que, com o intuito de reutilizar o cartucho empacotado, foram percolados 50,0 mL de MeOH após a etapa de percolação da amostra de TC.

A Figura 47 apresenta a percentagem de adsorção de TC no IPDMBA-MIP empregando as diferentes massas estudadas. Como pode-se observar, aumentando a massa do material de 50 mg para 100 mg, há um aumento na percentagem (%) de adsorção de TC pelo polímero IPDMBA-MIP. Esse comportamento pode estar relacionado com um aumento de sítios de ligação para a TC com o aumento da massa do polímero (MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021; MENDONÇA et al., 2020). Entretanto, a % de adsorção torna-se constante com o aumento da massa de 100 mg para 200 mg. Tal comportamento pode estar relacionado com a dificuldade da amostra percolar pelo sistema (MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021).

Portanto, a partir dos resultados obtidos, a massa de 100 mg de IPDMBA-MIP foi escolhida para estudos posteriores. Jing e colaboradores desenvolveram um método MISPE-LC-MS/MS para determinação de traços de tetraciclinas em amostras alimentícias em que descreveram o uso de 100 mg do polímero sintetizado por eles na coluna de SPE (JING et al., 2009). Além disso, segundo estudos presentes na literatura, o uso excessivo de massa do material adsorvente em colunas de SPE devem ser evitados, pois podem gerar pressão no cartucho, dificultando a passagem do analito pelo sistema, bem como o excesso de material adsorvente pode gerar interações não-específicas, já que outras substâncias podem interagir com o material (MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021; MENDONÇA et al., 2020).

Figura 47. Efeito da adsorção de TC em função da massa de adsorvente IPDMBA-MIP. Condições experimentais: foram percolados 20 mL de uma solução de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o efluente foi analisado no sistema BIA-AD.



5.7.2 Estudo do Solvente de Eluição na Pré-Concentração de Tetraciclina

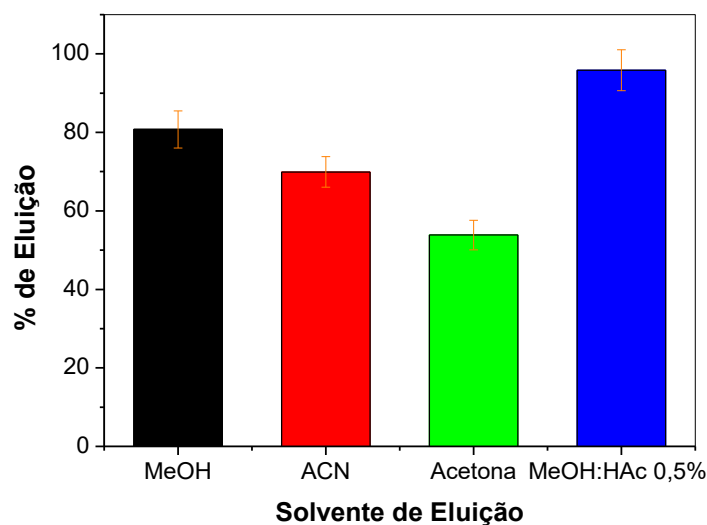
A escolha do tipo de solvente de eluição é uma importante etapa no desenvolvimento de métodos MISPE, pois este afeta a eficiência de extração já que deve espera-se obter altas percentagens de dessorção (eluição) dos analitos evitando-se efeito de memória no cartucho de SPE (MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021).

Para a otimização do solvente de eluição, 100 mg de IPDMBA-MIP foram empregados para preencher o cartucho de SPE, o qual foi condicionado com 10 mL de água ultrapura e, em seguida, foram percolados 20 mL de uma solução de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TC em pH 5,0 com vazão de 2 mL min^{-1} . Para eluição de TC foram testados os solventes MeOH, ACN e acetona, bem como MeOH com 0,5% de HAc. Vale ressaltar que solventes apolares não foram avaliados devido a baixa solubilidade do analito nesses solventes (ABRÃO; MAIA; FIGUEIREDO, 2014). A eluição foi realizada empregando 5 mL de cada solvente estudado com vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. O eluato foi recolhido, evaporado e recuperado em 5,0 mL de água ultrapura e injetado no sistema BIA-AD. A Figura 48 apresenta a percentagem de eluição de TC com os solventes estudados.

Como pode ser observado, MeOH apresentou maior percentagem de eluição (80,76%) quando comparado com ACN e acetona (69,93% e 53,85%,

respectivamente). Esse comportamento pode ser explicado devido à alta solubilidade da TC neste meio, bem como à natureza do solvente, uma vez que MeOH é um solvente polar prótico e possui alta capacidade de formar ligações de hidrogênio com o analito. Quando HAc 0,5% foi adicionado, a percentagem de eluição aumentou para 95,84%. Esse aumento pode ser explicado pois a presença do HAc protona os grupos presentes no material, interrompendo as interações entre o analito e o material. (CARO et al., 2005; CHEN et al., 2009; MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021). O uso da mistura MeOH:HAc tem sido bastante empregada na literatura para dessorção de TC de materiais impressos (AGUILAR et al., 2020; CARO et al., 2005; CHEN et al., 2009; DAI et al., 2012; FENG et al., 2016; GAO et al., 2020; LV et al., 2014a, 2012, 2014b; WANG et al., 2018, 2017). Sendo assim, a mistura de MeOH com HAc 0,5% foi adotada como solvente de eluição para os estudos posteriores.

Figura 48. Percentagem de eluição de TC em função dos eluentes estudados.

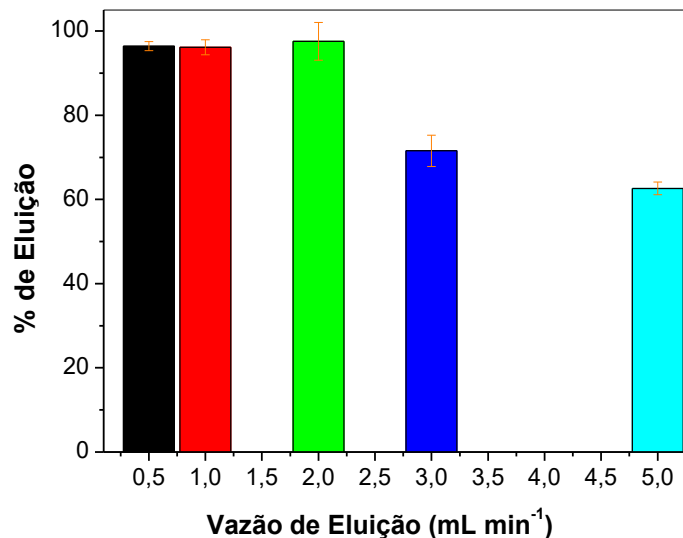


5.7.3 Estudo da Vazão e Volume do Solvente de Eluição

A vazão de eluição pode afetar o rendimento do método MISPE. Assim, variou-se a vazão do eluente no cartucho contendo IPDMBA-MIP de 0,5 a 5,0 mL min⁻¹. A Figura 49 mostra a percentagem de eluição em função da vazão do solvente de eluição. Como pode ser observado, há uma diminuição da percentagem de eluição para vazões acima de 2,0 mL min⁻¹. Tal fato pode ser atribuído à maior pressão gerado no cartucho bem como o menor tempo da solução em contato no cartucho. Sendo assim, visando a maior percentagem de

eluição e uma maior frequência analítica, adotou-se a vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ da mistura MeOH com HAc 0,5% para a eluição da TC.

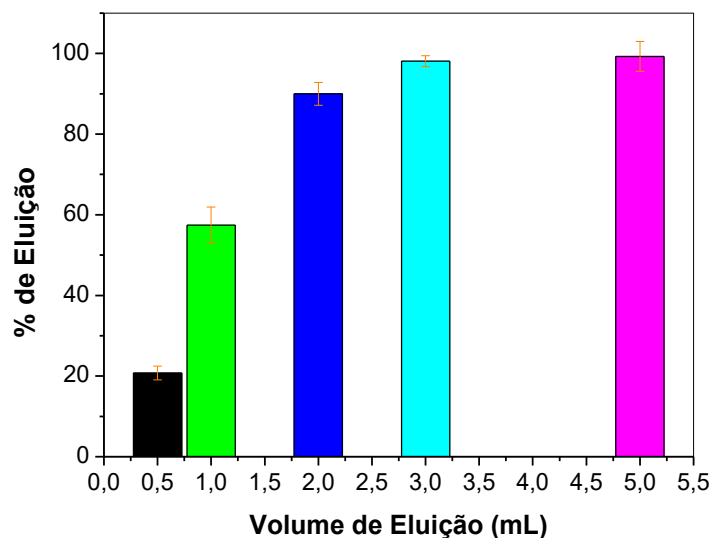
Figura 49. Efeito da vazão da mistura MeOH com HAc 0,5% na percentagem de eluição da TC. Volume da mistura utilizada: 5,0 mL.



Outro fator que pode afetar o rendimento do método MISPE é o volume de eluição pois o fator de pré-concentração do método é dependente desta etapa (MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021). Assim, 20 mL de uma solução de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TC (pH 5,0), foram percoladas pelo cartucho de SPE contendo 100 mg de IPDMBA-MIP. Posteriormente, a TC foi eluída com diferentes volumes de MeOH com HAc 0,5%, que variaram de 0,5 à 5,0 mL, a uma vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Posteriormente, os eluatos foram evaporados em chapa de aquecimento, recuperado no mesmo volume de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5) e injetado no sistema BIA-AD. A Figura 50 apresenta a percentagem de eluição de TC com os volumes estudados.

Conforme apresentado na Figura 50, houve um aumento na percentagem de eluição com o aumento do volume, atingindo um platô entre 3 e 5 mL com eluições acima de 95%. Visando um maior fator de pré-concentração o volume de 3 mL foi fixado.

Figura 50. Efeito do volume da mistura MeOH com HAc 0,5% na percentagem de eluição da TC. Vazão utilizada: 2,0 mL min⁻¹.

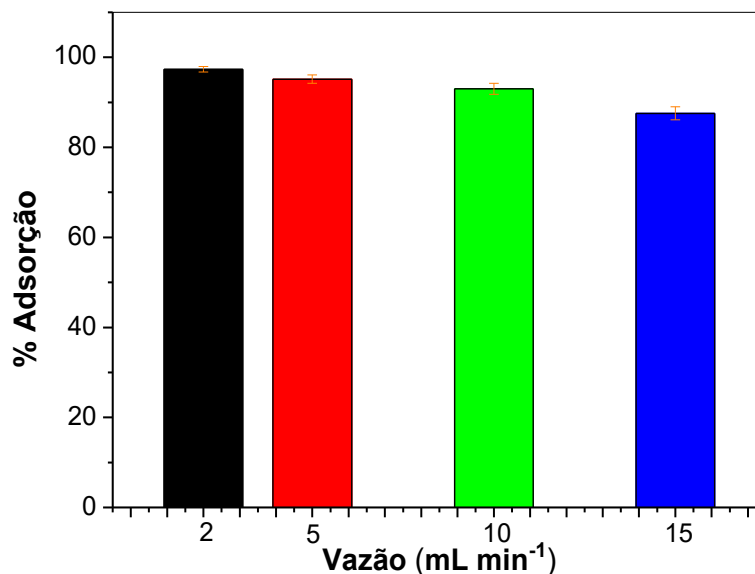


5.7.4 Estudo da Vazão de Pré-Concentração de Tetraciclina

A vazão de pré-concentração foi estudada a fim de avaliar sua influência na adsorção de TC. Primeiramente, o cartucho foi condicionado com 10 mL de água ultrapura, e, em seguida, 20,0 mL de uma solução de TC 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (pH 5,0) foram percolados pelo cartucho com diferentes vazões. Em seguida, a TC foi eluída com 3 mL de uma mistura de MeOH com HAc 0,5%, e o eluato foi evaporado e recuperado no mesmo volume com tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5) e injetados no sistema BIA-AD. A Figura 51 mostra a percentagem de adsorção de TC no IPDMBA-MIP nas vazões de 2,0; 5,0; 10,0 e 15,0 mL min⁻¹.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se uma pequena diminuição na adsorção de TC com o aumento da vazão de pré-concentração. Possivelmente isso ocorre devido ao pouco tempo de interação da TC com o IPDMBA-MIP (MARANATA; SURYA; HASANAH, 2021). Entretanto, a fim de melhorar a frequência analítica, a vazão de 15 mL min⁻¹ foi escolhida apesar de ter apresentado uma menor adsorção. Vale ressaltar que esta vazão é muito superior as vazões usualmente empregadas em métodos de SPE, $\leq 2,0 \text{ mL min}^{-1}$, porém ela permite elevar consideravelmente a frequência analítica do método desenvolvido (PRETE; TARLEY, 2019).

Figura 51. Efeito da vazão de pré-concentração na percentagem de adsorção de TC no IPDMBA-MIP. Condições experimentais: 20 mL de solução de 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (pH 5,0) e eluição com 3,0 mL de MeOH com HAc 0,5%.

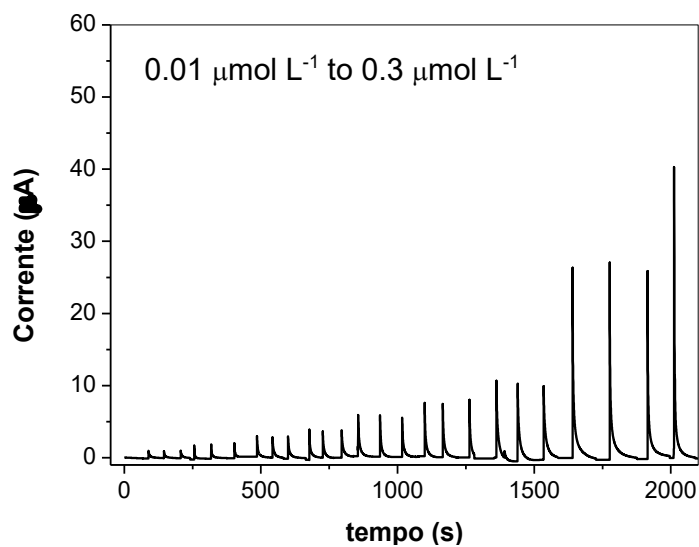
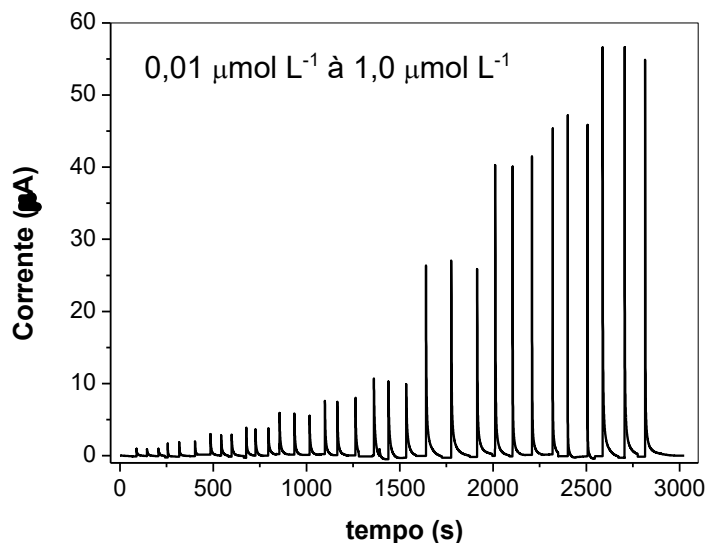


Com os parâmetros do método MISPE *off-line* otimizados, optou-se por aumentar o volume de pré-concentração para 50 mL e o eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5), visando uma maior pré-concentração do analito.

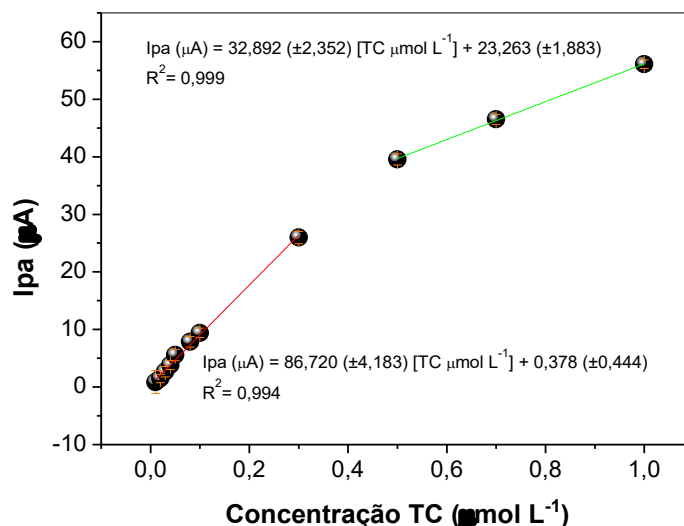
5.8 DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO MISPE

A fim de avaliar o desempenho analítico do método de pré-concentração de TC empregando IPDMBA-MIP como material adsorvente no MISPE, foram determinados os parâmetros analíticos como linearidade da curva, limites de detecção e quantificação, fator de enriquecimento e precisão. Na Figura 52 estão apresentados os amperogramas, com injeções em triplicata, para as concentrações de TC na faixa de 0,01 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dentro da faixa de concentração estudada, o método apresentou duas inclinações, sendo a primeira de 0,01 a 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a segunda de 0,5 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 52. Amperogramas para pré-concentrações crescentes de TC, de 0,01 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no cartucho IPDMBA-MIP, e (B) Curva analítica para etapa de pré-concentração de TC no cartucho IPDMBA-MIP. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 $\mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de 200 μL ; 100 mg do IPDMA-MIP, 50 mL de solução de TC (pH 5,0), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min^{-1} , solução em pH 5,0 sem tampão e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min^{-1} . O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 2,5).



(A)



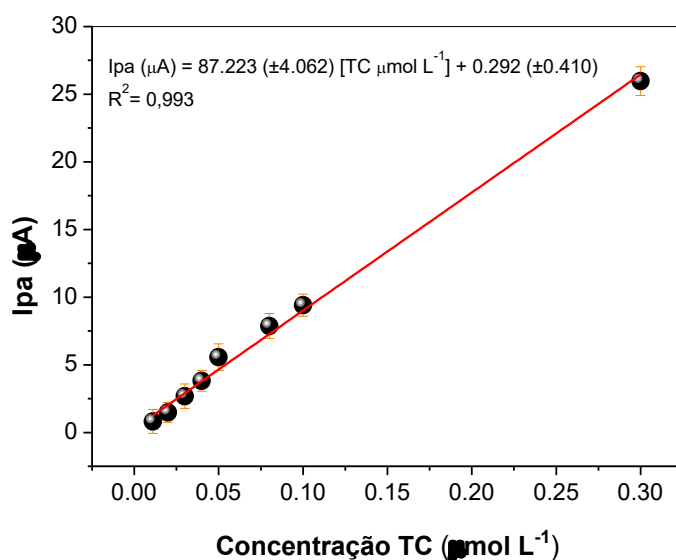
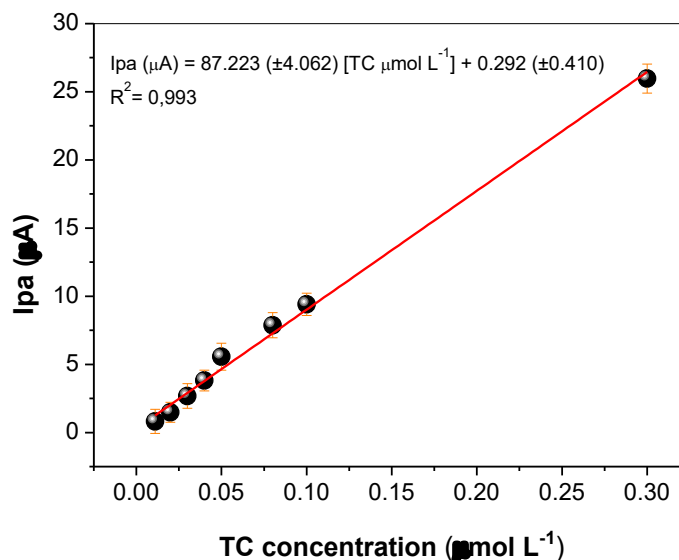
(B)

A primeira linearidade da curva analítica, de 0,01 a 0,3 $\mu mol L^{-1}$, apresentou uma equação linear como $I_{pa} (\mu A) = 86,720 (\pm 4,183) [TC \mu mol L^{-1}] + 0,378 (\pm 0,444)$ com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,994, enquanto a segunda linearidade, de 0,5 a 1,0 $\mu mol L^{-1}$, a equação foi $I_{pa} (\mu A) = 32,892 (\pm 2,352) [TC \mu mol L^{-1}] + 23,263 (\pm 1,863)$ com R^2 igual a 0,999. Tendo em vista os LMR permitidos para TC em amostras alimentícias, como por exemplo o leite, no qual o LMR permitido está na faixa de 30-100 $\mu g L^{-1}$ (0,068 a 0,225 $\mu mol L^{-1}$) optou-se por trabalhar com a primeira linearidade da curva, o qual contempla concentrações mais baixas.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983), sendo $LD = 3S_b/m$ e $LQ = 10S_b/m$, em que S_b é o desvio padrão para medidas do branco e m é o coeficiente angular da curva analítica. Os limites de LD e LQ calculados foram de 0,003 e 0,011 $\mu mol L^{-1}$, respectivamente. A fim de verificar o efeito do LQ teórico na linearidade da curva analítica, bem como se o valor é mensurável com confiabilidade, a concentração obtida do LQ foi preparada, pré-concentrada no cartucho IPDMBA-MIP e incluída como primeiro ponto da curva analítica. Como apresentado na

Figura **53**, a nova curva analítica tendo o LQ como primeiro ponto, obteve a equação linear $I_{pa} (\mu A) = 87,223 (\pm 4,062) [TC \mu mol L^{-1}] + 0,292 (\pm 0,410)$ com R^2 igual a 0,993. Assim, constata-se que não houve variação significativa no coeficiente angular das curvas analíticas sem e com o LQ, e o LQ foi assumido como primeiro ponto da curva.

Figura 53. Curva analítica com etapa de pré-concentração de TC no cartucho IPDMBA-MIP incluindo o LQ como primeiro ponto. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 μL s⁻¹ e volume de injeção de 200 μL; 100 mg do IPDMA-MIP, 50 mL de solução de TC (pH 5,0), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min⁻¹, solução em pH 5,0 sem tampão e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5).



O modelo linear para a curva analítica incluindo o LQ, para as concentrações de 0,011 a 0,300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, foi verificada por análise de variância (ANOVA), levando-se em consideração que a hipótese nula $H_0: \beta=0$ era de que não houvesse relação linear entre as variáveis. Assim, aplicou-se o teste F, com um intervalo de confiança de 95%, em que a relação entre $MS_{\text{regressão}}/MS_{\text{resíduo}}$ foi 2070,53, sendo muito maior que o valor tabelado ($F_{22,1} = 248,58$), podendo assim,

descartar a hipótese nula e considerar que os dados experimentais se ajustam bem ao modelo de regressão linear (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003). Ainda, a relação entre $MS_{\text{falta de ajuste}}/MS_{\text{erro puro}}$ foi de 2,52, sendo menor que o valor tabelado ($F_{4,12} = 2,74$), confirmando o bom ajuste ao modelo linear (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003).

A precisão intradia ($n=6$) e interdial ($n=2$) do método foi avaliada calculando o desvio padrão relativo (%DRP) para seis análises de soluções de TC em duas concentrações diferentes (0,030 e 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$). O DPR para as medidas intradia variou de 1,71 a 4,38%, enquanto a precisão interdial variou de 2,81 a 3,78%, mostrando que o método desenvolvido apresenta boa repetibilidade. Além disso, o fator de pré-concentração (FPC) foi calculado por meio da relação entre a inclinação da curva analítica com e sem a etapa de pré-concentração, sendo este igual a 214,8.

A comparação do método proposto com outros métodos para a determinação de TC é apresentada na Tabela 7. Como observado, os limites de detecção e quantificação obtidos pelo método proposto mostraram-se satisfatórios, sendo que o método proposto forneceu menor valor de LQ, quando comparado com outros métodos presentes na literatura, com exceção aos trabalhos de Liu e colaboradores (LIU et al., 2014b) e Sereshti e colaboradores (SERESHTI et al., 2021). Além dos baixos limites alcançados, o IPDMBA-MIP apresentou uma alta capacidade de adsorção, como reportado anteriormente, sendo uma importantíssima vantagem frente a outros polímeros impressos para TC reportados na literatura.

Tabela 7. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos no método proposto com outros de métodos analíticos presentes na literatura para determinação de tetraciclina em diferentes tipos de amostras.

Método	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	VP (mL)	Técnica	Amostra	Referência
MISPE	0,011-0,450	NI	0,011	300	HPLC-DAD	Água	(ABRÃO; MAIA; FIGUEIREDO, 2014)
MISPE* (CTC, OTC, DC)	0,225-2,250	0,045-0,090	0,113-0,180	NI	HPLC-DAD	Leite, ovo e carne de porco	(FENG et al., 2016)
Fibra SPME revestida com MIP	0,011-0,450	0,002	NI	25	HPLC-UV/Vis	Carne de frango e leite	(HU et al., 2008)
HMIP@CD, DSPE	0,023-0,450	0,0069	NI	5	Detecção por fluorescência	Mel	(LI et al., 2018a)
On-line MISPE	0,002-0,450	0,0002	0,002	NI	HPLC-UV	Água	(LIU et al., 2014b)
Fibra SPME revestida com MIP	0,011-2,250	0,009	0,026	4	HPLC-UV	Peixe, frango e leite	(LU et al., 2020)
MISPE	NI	0,023	0,078	5	HPLC-UV	Leite	(LV et al., 2014a)
MISPE	NI	0,029	0,098	4	HPLC-UV	Leite	(LV et al., 2014b)
	NI	0,031	0,100			Mel	
MISPE	0,338-2,138	0,056	NI	1	HPLC-UV	Leite	(NIU et al., 2016)
EC-SPME	0,057-1,688	0,017	0,057	15	HPLC-UV	Leite	(SERESHTI et al., 2021)
	0,008-1,688	0,002	0,008			Água	
GPUE-MIP	4,00-60,00	0,55	NI	NA	DPV	Formulações farmacêuticas e urina sintética	(CLARINDO et al., 2020)
MIOPPy-AuNP/SPCE	1,00-20,00	0,65	NI	NA	DPV	Camarão	(DEVKOTA et al., 2018)

Mg,N-Cds@MIP	0,011-0,225	0,002	NI		Detecção por fluorescência	Carne de porco, ovos e leite	(HU et al., 2021)
MIP-Pt/Ti	0,225-22,500	0,059	NI	NA	Detecção Amperométrica	Não aplica	(ZHAO et al., 2013)
SPGE-Au _{nano} -Cys	4,00-800,00	0,42	1,40	NA	SWV	Urina	(ASADOLLAHI-BABOLI; MANI-VARNOSFADER ANI, 2014)
	4,00-700,00	0,54	1,80	NA		Sérum	
	4,00-700,00	0,52	1,73	NA		Leite	
PEI/TetX2/NPGCE	0,50-5,00	0,018	NI	NA	CV	Leite	(BESHARATI et al., 2019)
GPUE	4,00-40,00	2,80	NI	NA	DPV	Água	(CALIXTO; CERVINI; CAVALHEIRO, 2012)
GPUE-MIP	4,00-60,00	0,555	NI	NA	DPV	Formulações farmacêuticas e urina sintética	(CLARINDO et al., 2020)
CB-PS/GCE	5,00-120,00	1,15	4,47	NA	DPV	Água, leite e formulações farmacêuticas	(DELGADO et al., 2018)
GR-SPCE	1,00-100,00	0,08	NI	NA	DPV	Leite e mel	(FILIK et al., 2016)
Au-g-C ₃ N ₄ /GCE	0,10-20,00 20,00-200,00	0,03	NI	NA	CV	Formulações farmacêuticas	(GUO et al., 2019)
SbF/GCE	0,40-3,00	0,15	NI	NA	SWCSV	Mel	(KREPPER et al., 2017)
PtNPs/C/GCE	9,99-44,00	4,28	14,30	NA	CV	Urina	(KUSHIKAWA et al., 2016)

Au(L-cysteine)-NWAE	20,00-310,0	15,20	NI	NA	CV	Peito de frango e carne	(LI et al., 2019)
ERGO-SPCE	20,00-80,00	12,00	NI	NA	AdSDPV	Leite desnatado e água	(LORENZETTI et al., 2020)
GR-AuNP/GCE	29,00-1500 ,00	16,20	NI	NA	AD	Não aplica	(OSIKOYA; GOVENDER, 2021)
MWNT-AuNP/GCE	11,25-315,00	0,095	0,313	NA	DPV	Ovos e carne de frango	(PALISOC et al., 2019)
rGO/GCE	10,00-100	1,17	3,53	NA	FIA-AMP	Leite e formulações farmacêuticas	(FARIA et al., 2019)
	1,00-100,00	0,038	0,116	NA	BIA-AMP		
PTH/CNT/CPE	0,10-20,00	0,13	0,50	NA	LSV	Formulações farmacêuticas e urina	(JAHROMI et al., 2020)
GPUE	3,80-38,00	2,60	NI	NA	DPV	Leite bovino e materno	(CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017)
CPE-mag-MIP	0,50-40,0	0,15	NI	NA	SWV	Leite	(ZEB et al., 2021)
IPDMBA-MIP	0,011-0,300	0,003	0,011	50	BIA-AD	--	Este trabalho

NI: não informado; FC: Fator de pré-concentração; LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação; MISPE: Extração em fase sólida molecularmente impressa; HPLC-DAD: Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo; MIP: Polímero molecularmente impresso; MMINs: nanopartículas superparamagnéticas impressas molecularmente; MSPE: extração em fase sólida magnética; HPLC-UV- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Ultravioleta/Visível; LC-MS/MS- Cromatografia Líquida acoplada á Espectrometria de Massas; HMIP@CD: polímero oco molecularmente impresso suportado em quantum dots de carbono; DSPE: extração em fase sólida dispersiva; MIP-MOF-DSPME: compósito polimérico molecularmente impresso-estruturas metálicas orgânicas UiO-66 usado na micro extração em fase sólida dispersiva; UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência; EC-SPME: micro extração em fase sólida controlada eletroquimicamente; MOF-MIP-MSPD: estruturas metálicas orgânicas revestidas com polímero molecularmente impresso usado na dispersão da matriz em fase sólida; GPUE-MIP: Eletrodo compósito de grafite-poliuretano modificado com polímero molecularmente impresso; MIOppy-AuNP/SPCE: eletrodo impresso de carbono modificado com polipirrol superoxidado com impressão molecular e nanopartículas de ouro; Mg,N-Cds@MIP: nanosensor fluorescente baseado no encapsulamento de pontos de *carbono dots* dopados com magnésio e nitrogênio em polímeros molecularmente impressos; DPV: voltametria de pulso diferencial; CV: voltametria cíclica; rGO/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido; FIA-AMP: análise de injeção em fluxo com detecção amperométrica; BIA-AMP: análise de injeção em batelada com detecção amperométrica; CNF: eletrodo de compósito de nanofibras de carbono-epoxy; SPGE-Au_{nano}-Cys: eletrodo impresso de ouro modificado com nanopartículas de ouro e cisteína, SWV: voltametria de onda quadrada; PEI/TetX2/NPGCE: eletrodo de carbono vítreo nanoporoso modificado com polietilenoimina e TetX2 monooxygenase; CV: voltametria cíclica; eletrodo compósito grafite-poliuretano; CB-PS/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com *carbono black* e amido de batata; GR-SPCE: eletrodo impresso de carbono modificado com grapeno; Au-g-C₃N₄/GCE: eletrodo de carbono vítreo

modificado com nitreto de carbono grafítico e nanopartículas de ouro; Au(L-cysteine)-NWAE: eletrodo de arranjos de nanofios modificado com nanopartículas de ouro e L-cisteína; ERGO-SPCE: eletrodo impresso de carbono modificado com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente; GR-AuNP/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanointerfaces de nanopartículas de grafeno-ouro; AD: detecção amperométrica; MWNT-AuNP/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e nanopartículas de ouro; MWCN-COOH-GO/CPE: eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxila e óxido de grafeno; PTH/CNT/CPE: eletrodo de pasta de carbono modificado com politionina e nanotubos de carbono; LSV: voltametria de varredura linear; CPE-mag-MIP: eletrodo de pasta de carbono modificado com partículas magnéticas impressas molecularmente

5.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO MISPE-BIA-AD EM AMOSTRAS DE LEITE

A aplicabilidade do método MISPE-BIA-AD foi avaliada para determinar a presença de TC em diferentes marcas e tipos de leite bovino. Vale ressaltar que os resultados que serão apresentados nessa seção serão expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$ a fim de se assemelhar com as unidades de medida dos órgãos reguladores. Assim, as amostras foram enriquecidas com 133 e 889 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TC ou, em alguns casos, de cada uma das TCs (TC, CTC e OTC) avaliadas nesse estudo, que equivalem a 0,3 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os dados referentes aos resultados estão dispostos na Tabela 8. Os amperogramas e os cromatogramas das análises estão apresentados nas Figura 54 e Figura 55, respectivamente.

Como apresentado na Tabela 8, não foi encontrada TC em nenhuma das amostras analisadas. Assim, realizou-se o teste de adição e recuperação, adicionando duas concentrações de TC. Os resultados mostraram uma recuperação satisfatória na faixa de 95 – 103 %, podendo inferir que o método proposto é capaz de quantificar o antibiótico estudado em amostras de leite bovino sem efeito de matriz, pois foi utilizada a curva analítica com calibração externa. Além disso, a exatidão do método proposto foi avaliada comparando os resultados das concentrações de TC encontradas pelo método proposto com as obtidas por HPLC, usado como técnica de referência. Os resultados foram avaliados pelo teste t pareado e, ao nível de confiança de 95 %, não foi observado diferença significativa entre os valores obtidos pelo método proposto e pelo HPLC.

Tabela 8. Aplicação do método proposto em diferentes tipos e marcas de leite bovino empregando o IPDMBA-MIP no sistema BIA-AD e no método de referência, HPLC, para análise de tetraciclina (TC). Os dados correspondem a média de n=3.

Amostras	BIA-AD			HPLC		
	Concentração de TC ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	Adicionada	Encontrada \pm D.P.	% Recuperação	Encontrada \pm D.P.	% Recuperação	
M-1 Int.	0	N.D	---	N.D.	---	
	133	127 \pm 5	95	127 \pm 4	96	
	889	903 \pm 3	102	889 \pm 4	101	
M-2 Int.	0	N.D	---	N.D.	---	
	133	129 \pm 3	97	125 \pm 6	93	
	889	845 \pm 5	95	901 \pm 2	101	
M-1 Des.	0	N.D	---	N.D.	---	
	133	133 \pm 4	99	132 \pm 4	99	
	889	882 \pm 7	99	883 \pm 4	99	
M-3 Z.L.	0	N.D	---	N.D.	---	
	133	133 \pm 2	97	128 \pm 4	96	
	889	906 \pm 9	102	881 \pm 7	99	

Figura 54. Amperograma para injeção de diferentes amostras de leite submetidas ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. As amostras foram enriquecidas com 0,13 e 0,89 mg L⁻¹ de TC. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de 123,2 μL s⁻¹ e volume de injeção de 200 μL; 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de 15,0 mL min⁻¹ e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5).

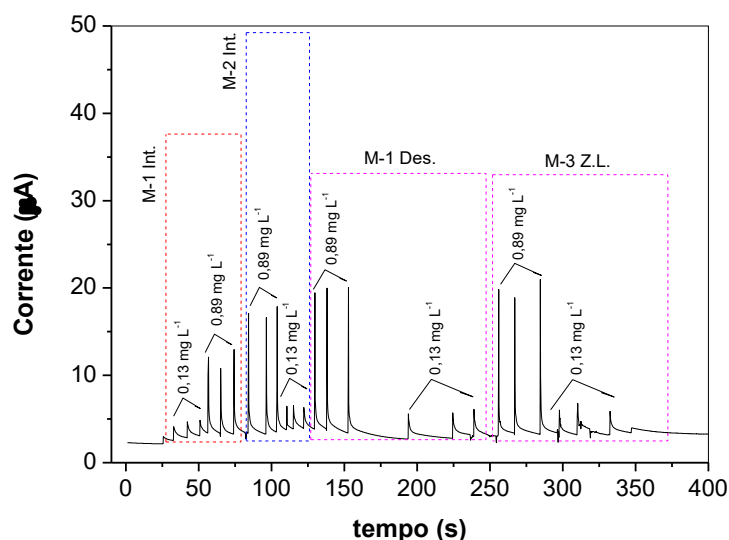
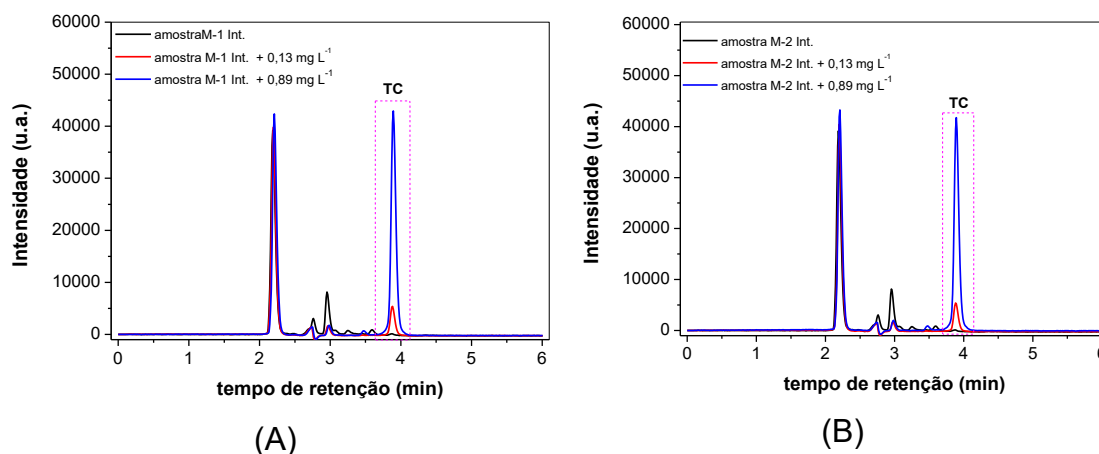
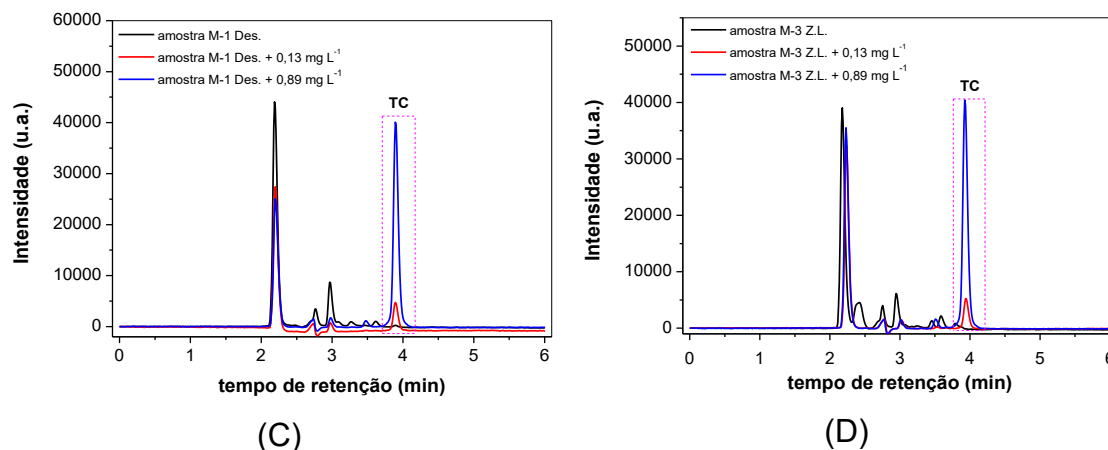


Figura 55. Cromatogramas das amostras de leites (A) M-1 Int. (B) M-2 Int., (C) M-1 Des. e (D) M-3 Z.L., submetidas ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. As amostras foram enriquecidas com 0,13 e 0,89 mg L⁻¹ de TC. Condições experimentais: 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 (sem tampão), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min⁻¹ e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5).

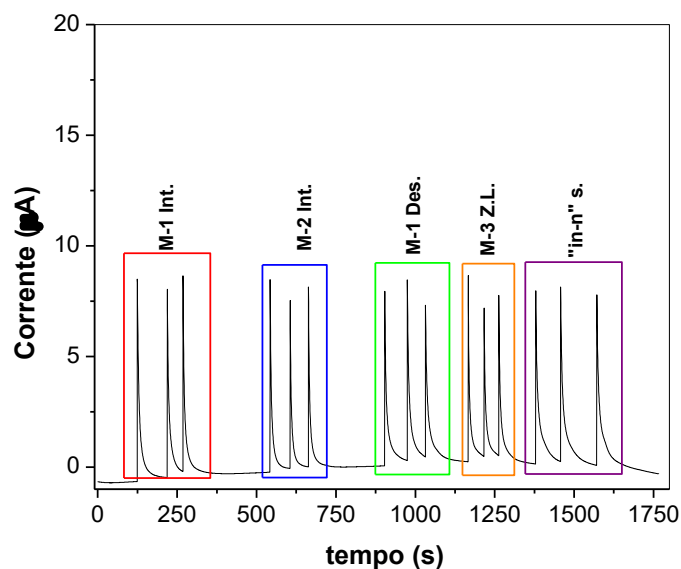




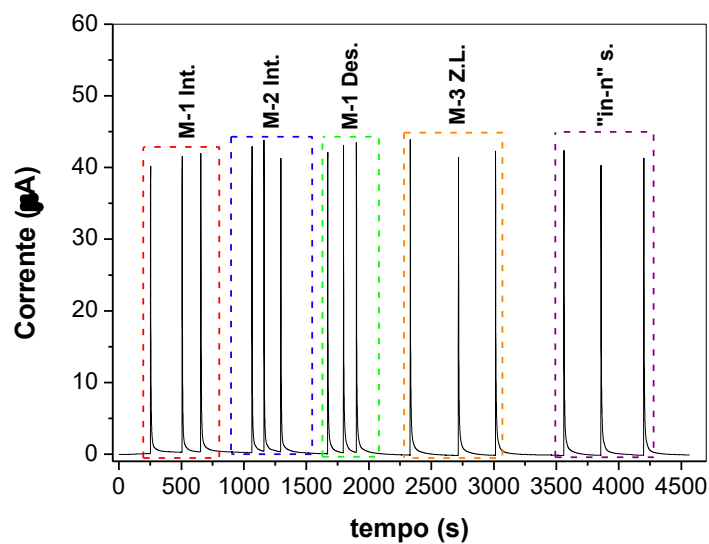
Tendo em vista que os LMR são estabelecidos, principalmente, para a classe dos antibióticos tetraciclínicos e não apenas para TC, bem como pelo fato do IPDMBA-MIP apresentar seletividade para a classe das tetraciclinas, as amostras de leite UHT foram enriquecidas com as três principais TCs, TC, OTC e CTC. Além das amostras de leite UHT, foram analisados também amostras de leite “*in-natura*” considerados saudável e não-saudável. Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Os amperogramas e os cromatogramas das análises estão apresentados na Figura 56 e Figura 57, respectivamente.

Como observado na Tabela 9, a leitura de uma amostra enriquecida por uma mistura ternária das TCs apresenta um sinal único, como esperado, não sendo possível diferenciar a resposta de cada uma das TCs. Entretanto, a concentração obtida no sistema BIA-AD é compatível com encontrada pela análise por HPLC, considerando a somatória das concentrações obtidas. Assim, é possível inferir que o método proposto é capaz de determinar os antibióticos tetraciclínicos em amostras de leite bovino.

Figura 56. Amperograma para injeção de diferentes amostras de leite submetidas ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. As amostras foram enriquecidas com (A) $0,13 \text{ mg L}^{-1}$ e (B) $0,89 \text{ mg L}^{-1}$ de cada tetraciclina. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de $1,2 \text{ V}$, velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$; 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de $15,0 \text{ mL min}^{-1}$ e eluição com $3,0 \text{ mL}$ de MeOH com $0,5\% \text{ HAc}$ a uma vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. O eluato foi evaporado e recuperado em $0,7 \text{ mL}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5).

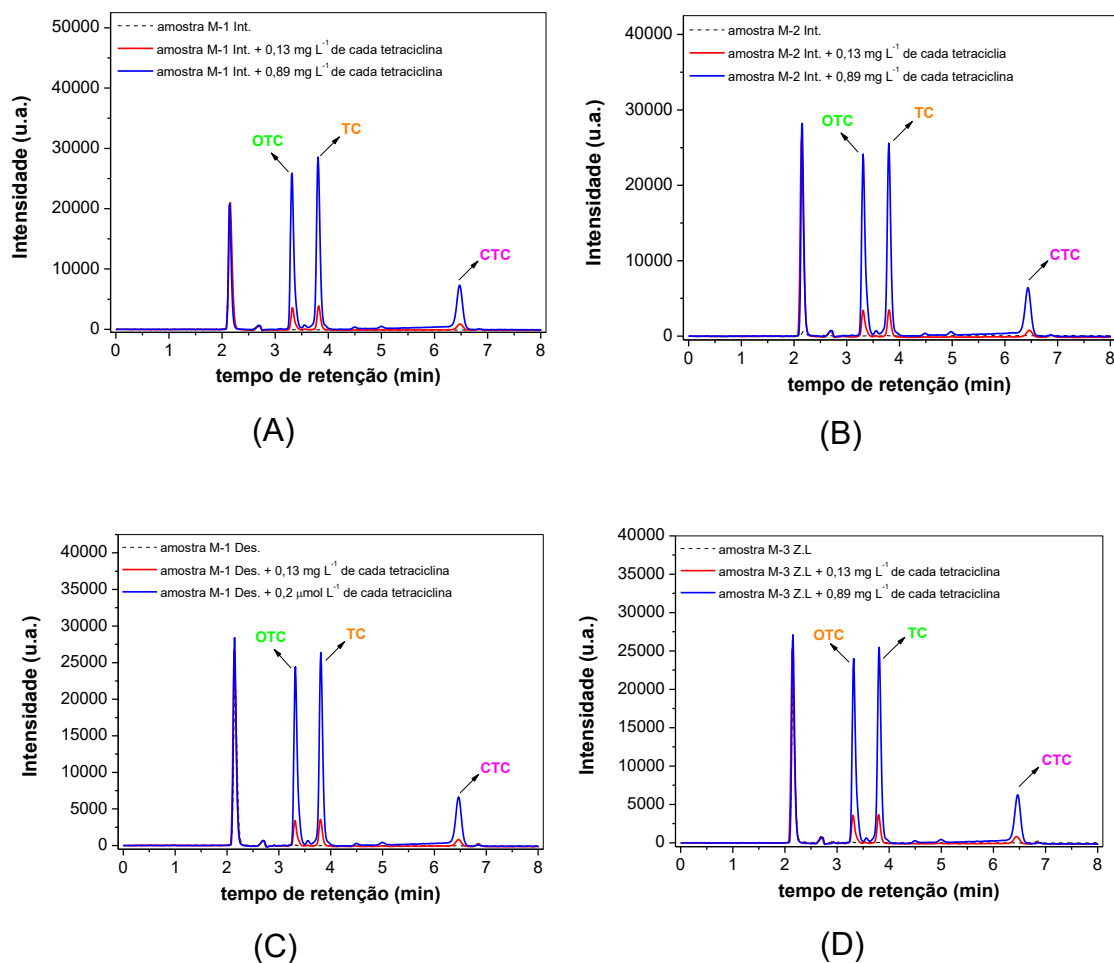


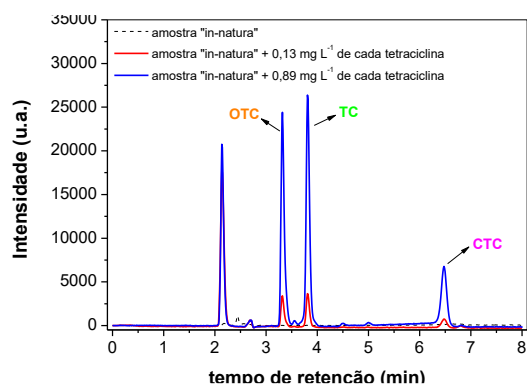
(A)



(B)

Figura 57. Cromatogramas das amostras de leites (A) leite integral Líder, (B) leite integral Batavo, (C) leite desnatado Líder, (D) leite zero lactose Parmalat e (E) leite “in-natura” saudável, submetidas ao método MISPE off-line com IPDMA-MIP. As amostras foram enriquecidas com 0,13 e 0,89 mg L⁻¹ de cada tetraciclina. Condições experimentais: 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 (sem tampão), vazão de pré-concentração de 15,0 mL min⁻¹ e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5).





(E)

Tabela 9. Aplicação do método de pré-concentração MISPE empregando IPDMBA-MIP para análise multi-resíduo dos antibióticos tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) em amostras de leite pelo (A) método desenvolvido (BIA-AD) e (B) pelo método de referência (HPLC). Os dados correspondem a média de n=3.

Am.	Add* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	HPLC - Tetraciclinas (TCs)						BIA-AD - TCs	
		TC		OTC		CTC		Enc.±D.P ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Rec.
		Enc.±D.P ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Rec.	Enc.±D.P ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Rec.	Enc.±D.P ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Rec.		
M-1 Int.	0	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	---
	133	125±3	94	123±4	93	123±10	92	379±42	95
	889	840±8	94	814±7	92	841±9	95	2473±166	93
M-2 Int.	0	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	---
	133	124±9	93	123±2	92	130±9	98	395±24	99
	889	854±6	96	861±2	97	851±9	96	2623±176	98
M-1 Des.	0	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	---
	133	131±4	99	132±6	99	133±3	100	399±29	97
	889	881±5	99	868±10	98	874±8	98	2652±94	99
M-3 Z.L.	0	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	---
	133	132±2	99	132±3	99	131±4	99	386±38	97
	889	887±3	100	849±7	95	859±8	97	2602±173	98
"In-n." s.	0	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	--	N.D.	---
	133	125±7	94	124±4	93	129±1	97	391±19	98
	889	846±9	95	828±14	93	828±11	93	2480±92	93

Am.: amostra; Add.: adicionada; M.: Marca; D.P.: desvio padrão; Int.: integral; Des.: desnatado; Z.L.: zero lactose; N.D.: não detectado; Enc.: encontrado; % Rec.: % de recuperação; TC: tetraciclina; OTC: oxitetraciclina; CTC: clorotetraciclina.

*As amostras foram enriquecidas a fim de que nos 5 mL de cada amostra usado para extração, contivesse 133 e 889 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada tetraciclina.

Para fins comparativos, abaixo são apresentados amperogramas para pré-concentração de padrões para as três tetraciclina e para padrões das TCs sem pré-concentrar.

Figura 58. Amperograma para injeção de padrões de oxitetraciclina, tetraciclina e clorotetraciclina, sem a etapa de pré-concentração, na concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$. O eluato foi evaporado e recuperado em $0,7 \text{ mL}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5).

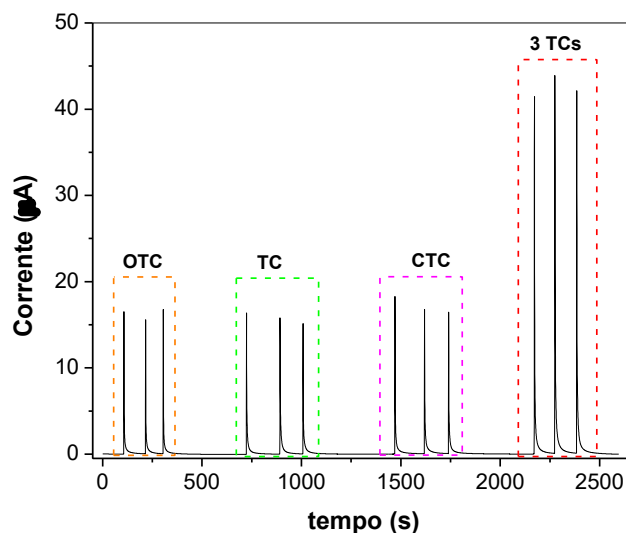
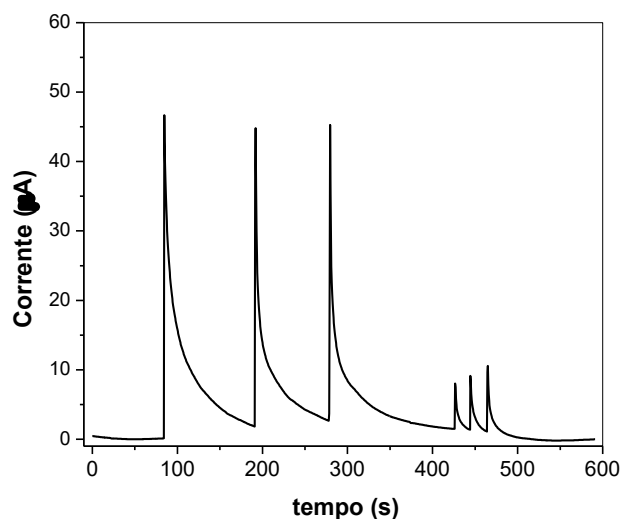


Figura 59. Amperograma para injeção do de uma mistura ternária de padrões de tetraciclina - oxitetraciclina, tetraciclina e clorotetraciclina – pré-concentrados nas concentrações de $0,13$ e $0,89 \text{ mg L}^{-1}$ de cada uma das TCs. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$. O eluato foi evaporado e recuperado em $0,7 \text{ mL}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5).



Para a amostra de leite “*in-natura*” de uma vaca não saudável, foi possível determinar a presença de OTC nessa amostra (Figura 60 e Figura 61), em uma concentração de $960 \mu\text{g L}^{-1}$ conforme apresentado na Tabela 10. A concentração de OTC encontrada nessa amostra empregando o método proposto não apresenta diferença significativa com a concentração encontrada pelo método de referência HPLC, em nível de 95 % de confiança segundo teste t pareado, uma vez que o valor de t calculado (2,84) foi menor que o tabulado ($t_{2,95\%}=4,30$).

Figura 60. Amperograma para injeção de amostra de leite “*in-natura*” não-saudável submetida ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5), potencial aplicado de 1,2 V, velocidade de injeção de $123,2 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$; 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de $15,0 \text{ mL min}^{-1}$ e eluição com 3,0 mL de MeOH com 0,5% HAc a uma vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5).

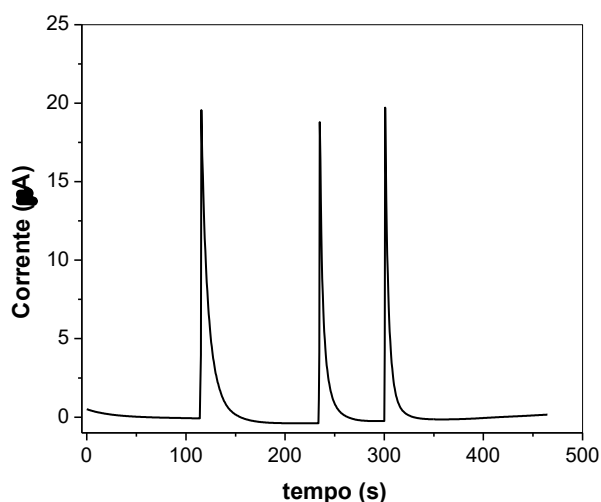
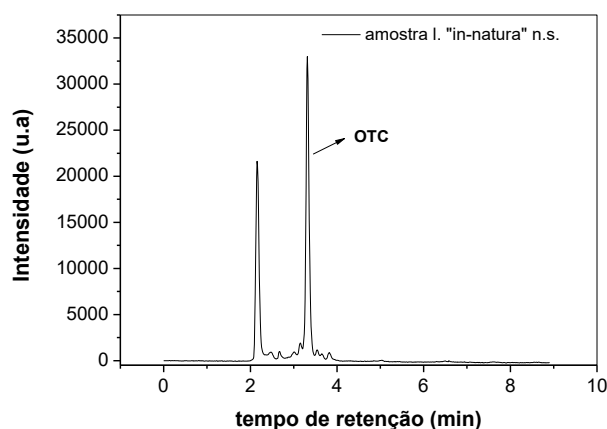


Figura 61. Cromatogramas para amostra de “*in-natura*” não saudável, submetida ao método MISPE off-line com IPDMBA-MIP. Condições experimentais: 100 mg do IPDMA-MIP, percolado 50 mL do extrato do leite em pH 5,0 sem tampão, vazão de pré-concentração de $15,0 \text{ mL min}^{-1}$ e eluição com 3,0 mL de MeOH

com 0,5% HAc a uma vazão de 2,0 mL min⁻¹. O eluato foi evaporado e recuperado em 0,7 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5).



A alta concentração encontrada na amostra de leite “*in-natura*” não-saudável pode ser justificada, pois o animal havia recebido medicação a base desse antibiótico um dia antes da coleta do leite, não cumprido os prazos de abstinência de coleta. A presença de antibióticos pertencentes a família das tetraciclina em amostras de leite também tem sido relatada na literatura. Aguilar e colaboradores (AGUILAR et al., 2020) relatam a presença de OTC na concentração de 19,83 µg L⁻¹ em uma amostra de leite analisada por eles. Os autores também enriqueceram as amostras de leite com 0,3 mg L⁻¹ de cada uma das TCs (OTC, CTC, TC e DC). Al-Mazeedi e colaboradores (AL-MAZEEDI et al., 2010) reportaram um estudo analisando 324 amostras de leite. Do total de amostras analisadas, 121 amostras (37%) apresentaram resultado positivo para a presença de resíduos de TCs, com concentrações variando entre 100 e 350 mg L⁻¹, ou seja, acima do LMR (100 mg L⁻¹). Além disso, concluíram que das amostras positivas para TCs, 80% das amostras estavam contaminadas com OTC e 20% com CTC.

Tabela 10. Aplicação do método de pré-concentração MISPE empregando IPDMBA-MIP para análise de amostra de leite “*in-natura*” não saudável pelo método desenvolvido (BIA-AD) e pelo método de referência (HPLC). Os dados correspondem a média de n=3.

Amostra	Concentração encontrada (µg L ⁻¹) ±D.P.	
	BIA-AD	HPLC
“ <i>In-n.</i> ” <i>n.s.</i>	960±2	963±2

A ocorrência de resíduos no leite é certamente motivo de preocupação e a exposição diária dos consumidores a esses resíduos através da ingestão de leite pode resultar em efeitos adversos graves à saúde a longo prazo. Uma vez que o monitoramento de amostras de leite é essencial para a garantia da qualidade do produto, o método proposto mostra-se uma alternativa eficiente e satisfatória para extração, pré-concentração e detecção de TC e demais compostos da família das TCs.

6 CONCLUSÕES

A partir resultados apresentados até o momento, pode-se concluir que o método eletroanalítico desenvolvido empregando detecção amperométrica por análise de injeção em batelada utilizando o sensor de AuNPs/SPCE proporcionou uma detecção eletroquímica de tetraciclina com boa resposta, boa repetibilidade e reprodutibilidade, mostrando-se como uma alternativa de detecção de tetraciclina, uma vez que possibilitou uma análise rápida, de baixo custo e com boa frequência analítica.

Por outro lado, notou-se a importância de desenvolver um polímero molecularmente impresso para tetraciclina como material adsorvente em extração em fase sólida, visando obter menores limites de detecção, bem como melhorar a seletividade do método desenvolvido. Assim, foi sintetizado um polímero molecularmente impresso, empregando o método de síntese semi-covalente.

Por meio das técnicas de caracterização, o polímero sintetizado IPDMBA-MIP apresentou grande área específica, alto diâmetro de poro e volume, além de boa estabilidade térmica, características essenciais para materiais adsorventes. A comparação com o polímero controle, IPDMBA-NIP, mostrou que o IPDMBA-MIP tem maior capacidade de adsorção, bem como apresenta uma maior seletividade para tetraciclina.

A presença de locais de ligação na superfície do IPDMBA-MIP foi comprovada pelos modelos aplicados à adsorção nos experimentos em batelada, além de sugerirem que a tetraciclina foi quimicamente adsorvida na superfície do material, em sítios com diferentes energias. Ainda, a rápida cinética de adsorção do material sintetizado foi de suma importância em todo o processo de adsorção. A capacidade máxima de adsorção obtida foi superior à de outros polímeros impressos para tetraciclina, e isso associado à rápida adsorção, é a principal vantagem do IPDMBA-MIP. Importante ressaltar mais uma vez que não há relatos na literatura do uso de uma abordagem semi-covalente para síntese de polímeros molecularmente impressos para tetraciclina.

Cabe salientar que o método MISPE *off-line* com IPDMBA-MIP associado à determinação amperométrica em um sistema de análise por injeção em batelada

(BIA), denominado MISPE-BIA-AD, proporcionou satisfatórias figuras de mérito para o método, incluindo baixos limite de detecção e quantificação e elevado fator de pré-concentração, sendo esses resultados superiores aos dados reportados na literatura para determinação de TC.

O método MISPE-BIA-AD foi aplicado em amostras de leite UHT e “*in-natura*” sem efeito de matriz, mostrando-se uma alternativa eficiente e satisfatória para extração e detecção de compostos da família das tetraciclinas. Assim, o método apresentou informações significativas sobre o desenvolvimento de novos materiais eficientes e seletivos para extração e pré-concentração de contaminantes.

7 REFERÊNCIAS

- ABDULGHANI, A. J.; JASIM, H. H.; HASSAN, A. S. Determination of tetracycline in pharmaceutical preparation by molecular and atomic absorption spectrophotometry and high performance liquid chromatography via complex formation with Au(III) and Hg(II) ions in solutions. **International Journal of Analytical Chemistry**, 2013.
- ABRÃO, L. C. C.; MAIA, P. P.; FIGUEIREDO, E. C. Determination of Tetracyclines by Solid-Phase Extraction with a Molecularly Imprinted Polymer and High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 47, n. 13, p. 2183–2194, 2014.
- AGARRY, S.; OGUNLEYE, O. Chemically treated kola nut pod as low-cost natural adsorbent for the removal of 2,4-dinitrophenol from synthetic wastewater: Batch equilibrium, kinetic, and thermodynamic modelling studies. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences**, v. 38, n. 1, p. 11–40, 2014.
- AGUILAR-GARCÍA, D. et al. Water-compatible core–shell Ag@SiO₂ molecularly imprinted particles for the controlled release of tetracycline. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 12, p. 5651–5663, 2016.
- AGUILAR, J. F. F. et al. Selective removal of tetracycline residue in milk samples using a molecularly imprinted polymer. **Journal of Polymer Research**, v. 27, n. 7, p. 176, 2020.
- AGUILERA-LUIZ, M. M. et al. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, n. 1–2, p. 10–16, 26 set. 2008.
- AKBULUT SÖYLEMEZ, M. Synthesis and characterization of tetracycline-imprinted membranes: A detailed positron annihilation lifetime spectroscopy investigation. **Journal of Molecular Recognition**, v. 34, n. 8, p. 1–10, 2021.
- AL-MAZEEDI, H. M. et al. Screening for tetracycline residues in food products of animal origin in the State of Kuwait using Charm II radio-immunoassay and LC / MS / MS methods. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 3, p. 291–301, 2010.
- ALENCAR, L. M. et al. Liquid-liquid Extraction Coupled to Batch Injection Analysis for Electroanalysis of Levofloxacin at Low Concentration Level. **Electroanalysis**, v. 29, n. 11, p. 2559–2564, 2017.
- ALENCAR, L. M. et al. Fast and Selective Simultaneous Determination of Acetaminophen, Aspirin and Caffeine in Pharmaceutical Products by Batch Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 30, n. 2, p. 296–303, 2018.
- ALLAHVERDIYEVA, S.; YARDIM, Y.; SENTÜRK, Z. Electrooxidation of tetracycline antibiotic demeclocycline at unmodified boron-doped diamond electrode and its enhancement determination in surfactant-containing media. **Talanta**, v. 223, p. 121695, 2021.
- ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016a.
- ANDRADE-EIROA, A. et al. **Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii.** **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 1 jun. 2016b.
- ANGELIS, P. N. et al. Feasibility of a Nano-Carbon Black Paste Electrode for Simultaneous Voltammetric Determination of Antioxidants in Food Samples and Biodiesel in the Presence of Surfactant. **Electroanalysis**, v. 32, n. 6, p. 1198-12– 07,

2020.

ANTÓN-HERRERO, R. et al. Comparative adsorption of tetracyclines on biochars and stevensite: Looking for the most effective adsorbent. **Applied Clay Science**, v. 160, n. July, p. 162–172, 2018.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Relatório 2006-2007 - Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal**. ANVISA, 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVet+Monitoramento+de+Resíduos+em+Leite+Exposto+ao+Consumo+-+Relatório+2006-2007/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>>. Acesso em: 8 jul. 2019

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução RDC N°53. Ministério da Saúde**, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RDCN53.pdf/4f53a37a-03a9-4b8e-80eb-a31cc01964fa>>. Acesso em: 8 jul. 2019

ANVISA, A. N. DE V. S. **Limites Máximos de Resíduo de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. ANVISA, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5>. Acesso em: 8 jul. 2019

ANVISA, M. DA S.-A. N. DE V. S. **Instrução Normativa - IN N° 162**. Brasil, 2022.

AOAC, A. OF O. A. C. **Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in Edible Animal Tissues**. AOAC, 2012a. Disponível em: <<http://www.ewenku.net/docs/d5bcb214a7c837>>. Acesso em: 8 jul. 2019

AOAC, A. OF O. A. C. **Multiple Tetracycline Residues in Milk**. AOAC, 2012b. Disponível em: <<https://wenku.baidu.com/view/0a0b9acca1c7aa00b52acb7d.html?re=view>>. Acesso em: 8 jul. 2019

ARABSORKHI, B.; SERESHTI, H.; ABBASI, A. Electrospun metal-organic framework/polyacrylonitrile composite nanofibrous mat as a microsorber for the extraction of tetracycline residue in human blood plasma. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 8, p. 1500–1508, 1 abr. 2019.

ARSHADY, R.; MOSBACH, K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 182, n. 2, p. 687–692, 1 jan. 1981.

ASADOLLAHI-BABOLI, M.; MANI-VARNOSFADERANI, A. Rapid and simultaneous determination of tetracycline and cefixime antibiotics by mean of gold nanoparticles-screen printed gold electrode and chemometrics tools. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 47, n. 1, p. 145–149, 2014.

ASHLEY, J. et al. Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 606–615, 15 maio 2017.

AZIZIAN, S. Kinetic models of sorption: A theoretical analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, n. 1, p. 47–52, 2004.

BABIĆ, B. M. et al. Point of zero charge and intrinsic equilibrium constants of activated carbon cloth. **Carbon**, v. 37, n. 3, p. 477–481, 1999.

BACKES, R. S. et al. Determinação Rápida E Simples De Citrato De Sildenafil (Viagra® E Genéricos) Empregando Eletrodo Impresso De Carbono Em Sistemas Fia E Bia Com Detecção Amperométrica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 752–759, 2017.

BAHRAMI, F.; L. MORRIS, D.; H. POURGHOLAMI, M. Tetracyclines: Drugs with Huge

Therapeutic Potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 44–52, 2011.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: Fundamentals and Applications**. second ed. ed. New York: John Wiley & Sons, 1980.

BARROS, L. A.; CUSTODIO, R.; RATH, S. Design of a new molecularly imprinted polymer selective for hydrochlorothiazide based on theoretical predictions using Gibbs free energy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 12, p. 2300–2311, 12 jan. 2016.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos- Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. second ed. ed. Campinas: Bookman Editora, 2003.

BELKHEIRI, D. et al. Feasibility of an electrochemical pre-treatment prior to a biological treatment for tetracycline removal. **Separation and Purification Technology**, v. 83, n. 1, p. 151–156, 2011.

BELTRAN, A. et al. **Molecularly-imprinted polymers: Useful sorbents for selective extractions**. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier, , 1 dez. 2010.

BERGMANN, C. P.; MACHADO, F. M. (EDS.). **Carbon Nanomaterials as Adsorbents for Environmental and Biological Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

BESHARATI, M. et al. A novel electrochemical biosensor based on TetX2 monooxygenase immobilized on a nano-porous glassy carbon electrode for tetracycline residue detection. **Bioelectrochemistry**, v. 128, p. 66–73, 2019.

BEYAZIT, S. et al. Molecularly imprinted polymer nanomaterials and nanocomposites by controlled/living radical polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 62, p. 1–21, 1 nov. 2016.

BOJCZUK, M. J. et al. Metal Ion-Tetracycline Interactions in Biological Fluids- Structural Investigations on Copper (II) complexes of tetracycline, oxytetracycline, chlorotetracycline, 4-(dedimethylamine), and 6-Desoxy-6-demethyltetracycline and discussion of binding modes. **Inorganic Chemistry**, v. 32, p. 428–437, 1993.

BOONKAEW, S. et al. An origami paper-based electrochemical immunoassay for the C-reactive protein using a screen-printed carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 3, p. 1–10, 2019.

BORISOVA, D. A. et al. Electrochemical oxidation of substituted phenols on a boron doped diamond electrode within the stability potentials of water. **Russian Chemical Bulletin, International Edition**, v. 62, n. 12, p. 2590–2594, 2013.

BOTARO, V. R.; GANDINI, A. Modificação do acetato de celulose em meio homogêneo via reações de condensação com diferentes isocianatos. **Polímeros**, v. 8, n. 3, p. 64–71, 1998.

BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. **The electrochemistry of gold: I. The redox behaviour of the metal in aqueous media**. **Gold Bulletin**, 1997.

CACHO, C. et al. Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, n. 2, p. 255–262, 2006.

CAI, W.; GUPTA, R. B. Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding. **Separation and Purification Technology**, v. 35, n. 3, p. 215–221, 2004.

- CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determination of Tetracycline in Bovine and Breast Milk Using a Graphite–Polyurethane Composite Electrode. **Analytical Letters**, v. 50, n. 14, p. 2323–2334, 2017.
- CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determination of tetracycline in environmental water samples at a graphite-polyurethane composite electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 938–943, 2012.
- CAPELARI, T. B. et al. Synthesis of novel poly(methacrylic acid)/ β -cyclodextrin dual grafted MWCNT-based nanocomposite and its use as electrochemical sensing platform for highly selective determination of cocaine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 880, p. 114791, 2021.
- CARNEIRO, C. E. A. et al. Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: A prebiotic chemistry study. **International Journal of Astrobiology**, v. 12, n. 2, p. 149–160, 2013.
- CARO, E. et al. Synthesis and application of an oxytetracycline imprinted polymer for the solid-phase extraction of tetracycline antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 81–86, 2005.
- CASARIN, J. et al. Poly(methacrylic acid)/SiO₂/Al₂O₃ based organic-inorganic hybrid adsorbent for adsorption of imazethapyr herbicide from aqueous medium. **Reactive and Functional Polymers**, v. 121, p. 101–109, 2017.
- CASARIN, J. et al. Insight into the performance of molecularly imprinted poly(methacrylic acid) and polyvinylimidazole for extraction of imazethapyr in aqueous medium. **Chemical Engineering Journal**, v. 343, p. 583–596, 2018.
- CASELLA, I. G.; FABIO, P. Determination of tetracycline residues by liquid chromatography coupled with electrochemical detection and solid phase extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8735–8741, 2009.
- CASTILLO-GARCÍA, M. L.; AGUILAR-CABALLOS, M. P.; GÓMEZ-HENS, A. A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1425, p. 73–80, 1 dez. 2015.
- CERVINI, P. et al. Thermal decomposition of tetracycline and chlortetracycline. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 118, p. 317–324, 2016.
- CHANG, J. et al. Adsorption of Tetracycline by Shrimp Shell Waste from Aqueous Solutions: Adsorption Isotherm, Kinetics Modeling, and Mechanism. **ACS Omega**, v. 5, p. 3477, 2020.
- CHAROENRAKS, T. et al. Flow injection analysis of doxycycline or chlortetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection. **Talanta**, v. 64, p. 1247–1252, 2004.
- CHARUAUD, L. et al. Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 361, p. 169–186, 5 jan. 2019.
- CHATTEN, L. G.; FLEISCHAMANN, M.; PLETCHER, D. The anodic oxidation of some tetracyclines. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 102, p. 407–413, 1979.
- CHATTOPADHYAY, M. K. Use of antibiotics as feed additives: A burning question. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JULY, p. 1–3, 2014.

CHEN, A. et al. Carbon disulfide-modified magnetic ion-imprinted chitosan-Fe(III): A novel adsorbent for simultaneous removal of tetracycline and cadmium. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 19–27, 2017a.

CHEN, L. et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 18, p. 3710–3719, 2009.

CHEN, L. et al. Molecular imprinting: Perspectives and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 8, p. 2137–2211, 2016.

CHEN, T. et al. New methodologies in screening of antibiotic residues in animal-derived foods: Biosensors. **Talanta**, v. 175, n. July, p. 435–442, 2017b.

CHEN, Z. et al. Electrochemical impedance spectroscopy detection of lysozyme based on electrodeposited gold nanoparticles. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1501–1506, 2011.

CHERKASHINA, K. et al. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-UV determination. **Talanta**, v. 184, p. 122–127, 2018.

CHEUNG, W. H.; SZETO, Y. S.; MCKAY, G. Intraparticle diffusion processes during acid dye adsorption onto chitosan. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 15, p. 2897–2904, 2007.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 1 jun. 2001.

CLARINDO, J. E. S. et al. Determination of Tetracycline Using a Graphite- Polyurethane Composite Electrode Modified with a Molecularly Imprinted Polymer Determination of Tetracycline Using a Graphite- Polyurethane Composite Electrode Modified with a Molecularly Imprinted Polymer. **Analytical Letters**, p. 1–24, 2020.

CLAUSEN, D. N.; PIRES, I. M. R.; TARLEY, C. R. T. Improved selective cholesterol adsorption by molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica (PMAA-SiO₂) hybrid material synthesized with different molar ratios. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 99–108, 2014.

COATES, J. **Interpretation of infrared spectra, A practical Approach**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. v. 1

COMMISSION, C. A. **MAXIMUM RESIDUE LIMITS (MRLs) AND RISK MANAGEMENT RECOMMENDATIONS (RMRs) FOR RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN FOODS CAC/MRL 2-2015**. [s.l: s.n.].

CONDE-CID, M. et al. Tetracycline and sulfonamide antibiotics in soils: Presence, fate and environmental risks. **Processes**, v. 8, n. 11, p. 1–40, 2020.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 804, n. 1, p. 173–182, 5 maio 2004.

D'EL REY DANTAS, F. T. et al. Doxiciclina: Uma Revisão Sobre Particularidades E Utilização Clínica Na Espécie Equina. **Science And Animal Health**, v. 6, n. 2, p. 101, 2019.

DA SILVA, W.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Gold nanoparticle decorated multiwalled carbon nanotube modified electrodes for the electrochemical determination of theophylline. **Analytical Methods**, v. 10, n. 47, p. 5634–5642, 2018.

- DAGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracycline antibiotics in the environment: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 209–227, 2013.
- DAI, J. et al. Preparation of molecularly imprinted nanoparticles with superparamagnetic susceptibility through atom transfer radical emulsion polymerization for the selective recognition of tetracycline from aqueous medium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 205–206, p. 179–188, 2012.
- DAI, J. et al. Highly-controllable imprinted polymer nanoshell at the surface of magnetic halloysite nanotubes for selective recognition and rapid adsorption of tetracycline. **RSC Advances**, v. 4, n. 16, p. 7967–7978, 2014a.
- DAI, J. et al. Versatile method to obtain homogeneous imprinted polymer thin film at surface of superparamagnetic nanoparticles for tetracycline binding. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 17, p. 7157–7166, 2014b.
- DAI, Y.; LI, J.; SHAN, D. Adsorption of tetracycline in aqueous solution by biochar derived from waste *Auricularia auricula* dregs. **Chemosphere**, v. 238, p. 124432, 2020.
- DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970–979, 2004.
- DANG, X. et al. 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.
- DANNER, M. C. et al. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. **Science of the Total Environment**, v. 664, p. 793–804, 2019.
- DAOUD ATTIEH, M. et al. Enzyme-Initiated Free-Radical Polymerization of Molecularly Imprinted Polymer Nanogels on a Solid Phase with an Immobilized Radical Source. **Angewandte Chemie**, v. 129, n. 12, p. 3387–3391, 13 mar. 2017.
- DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 103–121, 23 jun. 2015.
- DE FARIA, H. D. et al. Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Food Chemistry**, v. 225, p. 98–106, 15 jun. 2017.
- DELGADO, K. P. et al. Ultralow Cost Electrochemical Sensor Made of Potato Starch and Carbon Black Nanoballs to Detect Tetracycline in Waters and Milk. **Electroanalysis**, v. 30, n. 9, p. 2153–2159, 2018.
- DENOBILO, M.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Method validation for the determination of the antibiotics residues oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by high performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 209–218, 2004.
- DEVKOTA, L. et al. Electrochemical determination of tetracycline using AuNP-coated molecularly imprinted overoxidized polypyrrole sensing interface. **Electrochimica Acta**, v. 270, p. 535–542, 2018.
- DO, P. T. et al. A highly sensitive electrode modified with graphene, gold nanoparticles, and molecularly imprinted over-oxidized polypyrrole for electrochemical determination of dopamine. **Journal of Molecular Liquids**, v. 198, p. 307–312, 1 out. 2014.

DU, Q. et al. Selective photodegradation of tetracycline by molecularly imprinted ZnO @ NH₂-UiO-66 composites. **Chemical Engineering Journal**, v. 390, p. 124614, 2020.

EFFTING, L. et al. Preparation of magnetic nanoparticle-cholesterol imprinted polymer using semi-covalent imprinting approach for ultra-effective and highly selective cholesterol adsorption. **Reactive and Functional Polymers**, v. 172, p. 105178, 2022.

EMA, E. M. A. **European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2019. 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017'. Ninth ESVAC report - EMA/294674/2019.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2017_en.pdf>.

ERSAN, M. et al. Synthesis of hydroxyapatite/clay and hydroxyapatite/pumice composites for tetracycline removal from aqueous solutions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 96, p. 22–32, 2015.

ESTEBAN, C.; RODRIGUES, C. A.; NASCIMENTO, E. D. S. Determinação de tetraciclina em líquido sinovial de vacas com doença podal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 205–214, abr. 2007.

ESTEVAO NETO, A. et al. Avaliação de resíduo de antibiótico em amostras de leite de vacas após a terapia de vacas secas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 1–4, 2015.

EU, E. U. **Commission Regulation- No 37/2010. Official Journal of the European Union**, 2010. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2019

FARIA, L. V. et al. Electrochemical methods for the determination of antibiotic residues in milk : A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1173, p. 338569, 2021.

FARIA, L. V. et al. High-throughput amperometric determination of tetracycline residues in milk and quality control of pharmaceutical formulations: Flow-injection: Versus batch-injection analysis. **Analytical Methods**, v. 11, n. 41, p. 5328–5336, 2019.

FDA, U. S. F. & D. A. **2018 Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals.** [s.l.: s.n.].

FENG, M. X. et al. Molecularly imprinted polymer-high performance liquid chromatography for the determination of tetracycline drugs in animal derived foods. **Food Control**, v. 69, p. 171–176, 2016.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: Uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 361–375, 2008.

FILIK, H. et al. 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, n. 4, p. 527–533, 2016.

FONSECA, R. J. et al. Synthesis and evaluation of different adsorbents based on poly(methacrylic acid-trimethylolpropane trimethacrylate) and poly(vinylimidazole-trimethylolpropane trimethacrylate) for the adsorption of tebuthiuron from aqueous medium. **Reactive and Functional Polymers**, v. 93, p. 1–9, 2015.

FREITAS, F. B. A.; CÂMARA, M. Y. DE F.; MARTINS, D. F. F. PCZ determination of

natural adsorbents used in removing contaminants from aqueous solutions. **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 610–618, 2015.

FREITAS, J. M. et al. A simple and fast-portable method for the screening of the appetite-suppressant drug sibutramine in natural products and multivitamins supplements. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 282, p. 449–456, 2019.

FRITZ, J. W.; ZUO, Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1297–1301, 2007.

GAMA, M. R.; BOTTOLI, C. B. G. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 107–121, 2017.

GAO, J. et al. Development and optimization of a naphthoic acid-based ionic liquid as a “non-organic solvent microextraction” for the determination of tetracycline antibiotics in milk and chicken eggs. **Food Chemistry**, v. 215, p. 138–148, 15 jan. 2017.

GAO, W. et al. Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer (MMIP) Nanoparticles (NPs) for the Selective Extraction of Tetracycline from Milk. **Analytical Letters**, v. 53, n. 7, p. 1097–1112, 2020.

GARRIDO FRENICH, A. et al. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 150–160, 28 fev. 2010.

GAUDIN, V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, n. December 2016, p. 363–377, 2017.

GHADIM, E. E. et al. Adsorption properties of tetracycline onto graphene oxide: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–10, 2013.

GIMENES, D. T. et al. A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 24, n. 9, p. 1805–1810, 2012.

GONZALES, E.; CARVALHO MELLO, H. H.; CAFÉ, M. B. Uso de anitibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, v. 12, n. 13, p. 48–53, 2012.

GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**. first ed. ed. New York: VCH, 1993.

GOTHWAL, R.; SHASHIDHAR, T. Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 43, n. 4, p. 479–489, 2015.

GRAHAM, A. L.; CARLSON, C. A.; EDMISTON, P. L. Development and characterization of molecularly imprinted sol-gel materials for the selective detection of DDT. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 458–467, 2002.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; BARRA CARACCILO, A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25–39, 2018.

GU, C.; KARTHIKEYAN, K. G. Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 2660–2667, 2005.

GUERRA, W. et al. Impact of metal coordination on the antibiotic and non-antibiotic activities of tetracycline-based drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 327–328,

p. 188–199, 2016.

GUILARDUCI, V. V. DA S. et al. Phenol adsorption on commercial active carbon under alkaline conditions. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1226–1232, 2006.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. **Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes**. **Química Nova** Sociedade Brasileira de Química, , 2010.

GUNASEKARAN, S.; VARADHAN, S. R.; KARUNANIDHI, N. Qualitative analysis on the infrared bonds of tetracycline and ampicilin. **PROCEEDINGS-INDIAN NATIONAL SCIENCE ACADEMY PART A**, v. 62, p. 309–316, 1996.

GÜNEY, S.; GÜNEY, O. Development of an Electrochemical Sensor Based on Covalent Molecular Imprinting for Selective Determination of Bisphenol-A. **Electroanalysis**, v. 29, n. 11, p. 2579–2590, 2017.

GUO, H. et al. In situ decoration of Au nanoparticles on carbon nitride using a single-source precursor and its application for the detection of tetracycline. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 536, p. 646–654, 2019.

HAMI, H. K. et al. Isotherm and pH Effect Studies of Tetracycline Drug Removal from Aqueous Solution Using Cobalt Oxide Surface. **Al-Nahrain Journal of Science**, v. 22, n. 2, p. 12–18, 2019.

HAO, H. et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, p. 1–11, 2014.

HAŠŠO, M.; ŠVORC, L. Batch injection analysis in tandem with electrochemical detection: the recent trends and an overview of the latest applications (2015–2020). **Monatshefte fur Chemie**, v. 153, n. 11, p. 985–1000, 2022.

HEBIÉ, S. et al. Electrochemical Reactivity at Free and Supported Gold Nanocatalysts Surface. In: **Catalytic Application of Nano-Gold Catalysts**. [s.l.] InTech, 2016. p. 101–130.

HELLER, D. N. et al. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: Hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and β -lactam residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5267–5278, 2006.

HEZARD, T. et al. Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 664, p. 46–52, 2012.

HO, Y. S. Selection of optimum sorption isotherm. **Carbon**, v. 42, n. 10, p. 2115–2116, 2004.

HO, Y. S. Review of second-order models for adsorption systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, n. 3, p. 681–689, 2006.

HO, Y. S.; MCKAY, G. A kinetic study of dye sorption by biosorbent waste product pith. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 25, n. 3–4, p. 171–193, 1999.

HOLZE, R. The adsorption of thiophenol on gold – a spectroelectrochemical study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 33, p. 21364–21372, 2015.

HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 10, p. 2304–2347, 2011.

HU, X. et al. Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymers for trace analysis of tetracyclines in complicated samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, n. 2, p. 97–107, 2008.

HU, X. et al. A strong blue fluorescent nanoprobe based on Mg/N co-doped carbon dots coupled with molecularly imprinted polymer for ultrasensitive and highly selective detection of tetracycline in animal-derived foods. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 338, p. 129809, 2021.

HUANG, S. et al. Simultaneous and specific enrichment of several amphenicol antibiotics residues in food based on novel aptamer functionalized magnetic adsorbents using HPLC-DAD. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1060, p. 247–254, 15 ago. 2017.

IBARRA, I. S. et al. Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2196–2202, 22 abr. 2011.

IKENYIRI, P. N.; UKPAKA, C. P. Overview on the Effect of Particle Size on the Performance of Wood Based Adsorbent. **J Chem Eng Process Technol**, v. 7, n. 5, p. 315, 2016.

JAHROMI, Z. et al. Electropolymerization of thionine as a stable film along with carbon nanotube for sensitive detection of tetracycline antibiotic drug. **Iranian Polymer Journal**, v. 29, n. 3, p. 241–251, 2020.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas Resumo. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JING, T. et al. Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography – tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, p. 2009–2018, 2009.

JING, T. et al. Preparation of mixed-templates molecularly imprinted polymers and investigation of the recognition ability for tetracycline antibiotics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2218–2224, 15 jun. 2010.

KAJJUMBA, G. W. et al. Modelling of Adsorption Kinetic Processes—Errors, Theory and Application. **Advanced Sorption Process Applications**, p. 187–206, 2018.

KANYONG, P.; RAWLINSON, S.; DAVIS, J. Gold nanoparticle modified screen-printed carbon arrays for the simultaneous electrochemical analysis of lead and copper in tap water. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 8, p. 2361–2368, 2016.

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, n. 4, p. 689–696, 1997.

KE, C.; CHEN, J.-L. Polyimide Substrates Pre-Treated by Capacitively Coupled Plasma and Coated with Composites of Tetracycline-Imprinted Polymethacrylates and Quantum Dots as Fluorescent Sensors. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 1120–1130, 2020.

KESAVAN, S.; KUMAR, D. R.; SHIM, J. Determination of tetracycline in the presence of major interference in human urine samples using polymelamine/electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 241, p. 455–465, 2017.

- KHASHAYAR, P. et al. Characterization of gold nanoparticle layer deposited on gold electrode by various techniques. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 1380–1390, 2016.
- KI, C. DO et al. The use of a thermally reversible bond for molecular imprinting of silica spheres. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 50, p. 14838–14839, 2002.
- KI, C. DO; CHANG, J. Y. Preparation of a molecularly imprinted polymeric nanocapsule with potential use in delivery applications. **Macromolecules**, v. 39, n. 9, p. 3415–3419, 2006.
- KIRSCH, N. et al. Sacrificial spacer and non-covalent routes toward the molecular imprinting of “poorly-functionalized” N-heterocycles. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, n. 1, p. 63–71, 2004.
- KONOPKA, S. J.; MCDUFFIE, B. Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 14, p. 1741–1746, 1970.
- KOZAKIEWICZ, J. et al. New family of functionalized crosslinkers for heat-curable polyurethane systems-a preliminary study. **Progress in Organic Coatings**, v. 72, n. 1–2, p. 120–130, 2011.
- KREPPER, G. et al. “ In-situ ” antimony film electrode for the determination of tetracyclines in Argentinean honey samples. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 241, p. 560–566, 2017.
- KUCEKI, M. et al. Selective and sensitive voltammetric determination of folic acid using graphite/restricted access molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/SiO₂ composite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 818, p. 223–230, 2018.
- KUMAR, A.; PANDA, A. K.; SHARMA, N. Determination of antibiotic residues in bovine milk by HPLC-DAD and assessment of human health risks in Northwestern Himalayan region, India. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 95–104, 2022.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009.
- KUSHIKAWA, R. T. et al. Sensors and Actuators B: Chemical Construction of an electrochemical sensing platform based on platinum nanoparticles supported on carbon for tetracycline determination. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 228, p. 207–213, 2016.
- KYULAVSKA, M. et al. Unexpected alternating radical copolymerization of chlorotrifluoroethylene with 3-isopropenyl- α,α' -dimethylbenzyl Isocyanate. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 2681–2697, 2010.
- LAGERGREN, S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. **Kungliga svenska vetenskapsakademiens handlingar**, v. 24, n. 4, p. 1–39, 1898.
- LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 9, p. 1361–1403, 1918.
- LI, B.; ZHANG, T. Removal mechanisms and kinetics of trace tetracycline by two types of activated sludge treating freshwater sewage and saline sewage. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 3024–3033, 2013.
- LI, H. et al. Single-hole hollow molecularly imprinted polymer embedded carbon dot for fast detection of tetracycline in honey. **Talanta**, v. 185, p. 542–549, 2018a.

- LI, M. FANG et al. Tetracycline absorbed onto nitrilotriacetic acid-functionalized magnetic graphene oxide: Influencing factors and uptake mechanism. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 485, p. 269–279, 2017.
- LI, M. FANG et al. Performance of magnetic graphene oxide/diethylenetriaminepentaacetic acid nanocomposite for the tetracycline and ciprofloxacin adsorption in single and binary systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 521, p. 150–159, 2018b.
- LI, Z. et al. Multisegment nanowire / nanoparticle hybrid arrays as electrochemical biosensors for simultaneous detection of antibiotics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 632–639, 2019.
- LIAN, L. et al. Magnetic solid-phase extraction of tetracyclines using ferrous oxide coated magnetic silica microspheres from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1534, p. 1–9, 2018.
- LIU, H.; CHEN, L.; DING, J. A core-shell magnetic metal organic framework of type Fe₃O₄@ZIF-8 for the extraction of tetracycline antibiotics from water samples followed by ultra-HPLC-MS analysis. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 10, p. 4091–4098, 1 out. 2017.
- LIU, M. et al. Synthesis of tetracycline-imprinted polymer microspheres by reversible addition- fragmentation chain-transfer precipitation polymerization using polyethylene glycol as a coporogen. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 9–10, p. 1118–1125, 2014a.
- LIU, M. et al. Determination of tetracycline residues in lake water by on-line coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction with high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 6, n. 23, p. 9446–9452, 2014b.
- LIU, W. et al. Enhanced mechanical properties and water resistance of bamboo fiber-unsaturated polyester composites coupled by isocyanatoethyl methacrylate. **Wood Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 1241–1255, 2014c.
- LIU, W.; CHEN, T.; QIU, R. Effect of fiber modification with 3-isopropenyldimethylbenzyl isocyanate (TMI) on the mechanical properties and water absorption of hemp-unsaturated polyester (UPE) composites. **Holzforschung**, v. 68, n. 3, p. 265–271, 2014.
- LIU, Y. et al. High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 917–918, p. 11–17, 15 fev. 2013.
- LOFTIN, K. A. et al. Effects of Ionic Strength, Temperature, and pH on Degradation of Selected Antibiotics. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, n. 2, p. 378–386, 2008.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.
- LOPES, C. E. C. et al. Lab-made 3D-printed electrochemical sensors for tetracycline determination. **Talanta**, v. 259, p. 124536, 2023.
- LORENZETTI, A. S. et al. Electrochemically reduced graphene oxide-based screen-printed electrodes for total tetracycline determination by adsorptive transfer stripping differential pulse voltammetry. **Sensors**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2020.
- LU, Y. et al. Preparation of hydrophilic molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for the selective removal and extraction of trace tetracyclines residues in animal derived foods. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 11, p. 2172–2179, 2020.

LU, Z. et al. A screen-printed carbon electrode modified with a bismuth film and gold nanoparticles for simultaneous stripping voltammetric determination of Zn(II), Pb(II) and Cu(II). **Microchimica Acta**, v. 184, n. 12, p. 4731–4740, 2017.

LUBKE, M.; WHITCOMBE, M. J.; VULFSON, E. N. A Novel Approach to the Molecular Imprinting of Polychlorinated Aromatic Compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 51, p. 13342–13348, 1998.

LUIZ, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Miniaturized sample preparation techniques and their application to the determination of residues and contaminants in food samples. **Scintia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 157–182, 2015.

LV, G. et al. Impact of tetracycline-clay interactions on bacterial growth. **Journal of Hazardous Materials**, p. 91–97, 2019.

LV, Y.-K. et al. Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Tetracycline Residue from Milk Using internal-Surface Reversed-Phase Hybrid Composite Packing Materials. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3541–3544, 2014a.

LV, Y. K. et al. Synthesis and application of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)-silica hybrid composite material for selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of oxytetracycline residues in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1227, p. 48–53, 2012.

LV, Y. K. et al. Adsorption-controlled preparation of molecularly imprinted hybrid composites for selective extraction of tetracycline residues from honey and milk. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 802–808, 2014b.

MA, J. et al. Adsorption properties, kinetics e thermodynamics of tetracycline on carboxymethyl-chitosan reformed montmorillonite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 557–567, 2019.

MA, N. et al. Determination of Tetracyclines in Chicken by Dispersive Solid Phase Microextraction Based on Metal-Organic Frameworks/Molecularly Imprinted Nanopolymer and Ultra Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 5, p. 1211–1219, 2020.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 23 DE ABRIL DE 2019**. Brazil, 2019.

MAPA, M. DA A. P. E A. **Instrução Normativa Nº26, de 10 de julho de 2009**. , 2009. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>>

MARANATA, G. J.; SURYA, N. O.; HASANAH, A. N. Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. e05934, 2021.

MARESTONI, L. D. et al. Polímeros impressos com ions: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Quim. Nova**, v. 36, n. 8, p. 1194–1207, 2013.

MARQUES, G. L. et al. Development of Electrochemical Platform Based on Molecularly Imprinted Poly(methacrylic acid) Grafted on Iniferter-modified Carbon Nanotubes for 17 β -estradiol Determination in Water Samples. **Electroanalysis**, v. 33, n. 3, p. 568–578, 2021.

MASAWAT, P.; SLATER, J. M. The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE). **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 124, n. 1, p. 127–132, 2007.

MENDONÇA, J. DE C. et al. Design and performance of novel molecularly imprinted biomimetic adsorbent for preconcentration of prostate cancer biomarker coupled to electrochemical determination by using multi-walled carbon nanotubes/Nafion®/Ni(OH)₂-modified screen-printed electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 878, p. 114582, 2020.

METROHM DROPSSENS. **Screen-Printed electrodes**. Disponível em: <http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html>. Acesso em: 1 jun. 2020.

MIRZAEI, M. et al. Preparation and utilization of microporous molecularly imprinted polymer for sustained release of tetracycline. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 3, p. 1557–1562, 2013.

MOHAMMED, A. A.; KAREEM, S. L. Adsorption of tetracycline from wastewater by using Pistachio shell coated with ZnO nanoparticles : Equilibrium , kinetic and isotherm studies. **Alexandria Engineering Journal**, v. 58, n. 3, p. 917–928, 2019.

MOHEBI, A. et al. Homogenous liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of some antibiotics from milk samples before their determination by HPLC. **Microchemical Journal**, v. 157, n. April, p. 104988, 2020.

MOREIRA, F. T. C. et al. New biomimetic sensors for the determination of tetracycline in biological samples: Batch and flow mode operations. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 2039, 2010.

MOSTAFA, M. A. Doxycycline and Minocycline Drugs as a Treatment Proposal for Inhibition of ARDS and Inflammatory Cytokine of SARS-COV-2. **Al-Azhar University Journal of Virus Researches and Studies**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2020.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465–470, 2005.

MOUDGIL, P. et al. Analysis of antibiotic residues in raw and commercial milk in Punjab, India vis-à-vis human health risk assessment. **Journal of Food Safety**, v. 39, n. 4, p. 1–8, 2019.

MÜLLER, B. R. Effect of particle size and surface area on the adsorption of albumin-bonded bilirubin on activated carbon. **Carbon**, v. 48, n. 12, p. 3607–3615, 2010.

MUNTEANU, F. D. et al. Detection of antibiotics and evaluation of antibacterial activity with screen-printed electrodes. **Sensors**, v. 18, n. 3, p. 901, 2018.

MYERS, H. M.; TOCHON-DANGUY, H. J.; BAUD, C. A. IR absorption spectrophotometric analysis of the complex formed by tetracycline and synthetic hydroxyapatite. **Calcified Tissue International**, v. 35, n. 1, p. 745–749, 1983.

NASCIMENTO, R. F. et al. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. 2 ed. ed. [s.l.] Fortaleza Imprensa Universitária, 2020.

NAVRÁTILOVÁ, P.; BORKOVCOVÁ, I.; DRAČKOVÁ, M. Occurrence of Tetracycline , Chlortetracyclin , and Oxytetracycline Residues in Raw Cow ' s Milk. **Czech Journal Food Science**, v. 27, n. 5, p. 379–385, 2009.

NAZARI, G.; ABOLGHASEMI, H.; ESMAIELI, M. Batch adsorption of cephalexin

antibiotic from aqueous solution by walnut shell-based activated carbon. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 58, p. 357–365, 2016.

NELSON, M.; HILLEN, W.; GREENWALD, R. A. **Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine**. [s.l.] Birkhäuser Basel, 2001.

NELSON, M. L. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. **Advances in dental research**, v. 12, n. 2, p. 5–11, 1998.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T. (TAMSYN). Penicilin. In: **Molecules That Changed the World**. [s.l.] Wiley-VCH, 2008. p. 97–106.

NIKOLAIDOU, K. I.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and Validation of an HPLC Multi-Residue Method for the Determination of Seven Tetracycline Antibiotic Residues in Bovine Liver and Kidney According to the European Union Decision 2002/657/EC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 17, p. 2523–2540, 12 set. 2008.

NIU, Y. et al. Preparation of Tetracycline Surface Molecularly Imprinted Material for the Selective Recognition of Tetracycline in Milk. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 8, p. 2342–2351, 2016.

OGURA, K.; HARUYAMA, S.; NAGASAKI, K. The Electrochemical Oxidation and Reduction of Gold. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 118, n. 4, p. 531, 1971.

OLIVEIRA, F. M. DE et al. Kinetic and isotherm studies of Ni²⁺ adsorption on poly(methacrylic acid) synthesized through a hierarchical double-imprinting method using a Ni²⁺ Ion and cationic surfactant as templates. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 25, p. 8550–8557, 2013.

OLIVEIRA, F. M.; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, C. R. T. Evaluation of a new water-compatible hybrid molecularly imprinted polymer combined with restricted access for the selective recognition of folic acid in binding assays. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 21, p. 1–10, 2016.

ÖNAL, A. Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 197–203, 2011.

OSIKOYA, A. O.; GOVENDER, P. P. Electrochemical Detection of Tetracycline on Highly Sensitive Benzene Sourced CVD Graphene-Gold Nanoparticles Nanointerfaces. **Electroanalysis**, v. 33, n. 2, p. 412–420, 2021.

ÖZCAN, B.; SEZGINTÜRK, M. K. A novel label free immunosensor based on single-use ITO-PET electrodes for detection MAGE1 protein. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 792, p. 31–38, 2017.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PALAHARN, S. et al. Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, n. 1–2, p. 191–197, 2003.

PALISOC, S. et al. Highly sensitive determination of tetracycline in chicken meat and eggs using AuNP / MWCNT-modified glassy carbon electrodes. **Heliyon**, v. 5, p. e02147, 2019.

PARLAPIANO, M. et al. Selective removal of contaminants of emerging concern (CECs) from urban water cycle via Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): Potential of upscaling and enabling reclaimed water reuse. **Journal of Environmental Chemical**

Engineering, v. 9, p. 105051, 2021.

PATOLSKY, F. et al. Precipitation of an insoluble product on enzyme monolayer electrodes for biosensor applications: Characterization by Faradaic impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, and microgravimetric quartz crystal microbalance analyses. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 15, p. 3171–3180, 1999.

PAULING, L. A Theory of the Formation of Antibodies 2643 [Contribution from the Gates 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.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PÉREZ-MORAL, N.; MAYES, A. G. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, n. 1, p. 15–21, 2004.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. et al. An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. **Talanta**, v. 182, p. 1–21, 2018.

PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, p. 571–580, 15 abr. 2016.

PIZAN-AQUINO, C. et al. Evaluation of the performance of selective M-MIP to tetracycline using electrochemical and HPLC-UV method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 245, p. 122777, 2020.

PLAZINSKI, W.; RUDZINSKI, W.; PLAZINSKA, A. Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 152, n. 1–2, p. 2–13, 2009.

PLETCHER, D. et al. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. 2th. ed. Philadelphia, USA: Woodhead Publishing, 2002.

POOLE, C. F. Principles and practice of solid-phase extraction. In: COMPREHENSIVE ANALYTICAL CHEMISTRY (Ed.). **Extraction Technology Fundamental**. [s.l.] Elsevier, 2002. v. 37p. 341–387.

PRARAT, P.; HONGSAWAT, P.; PUNYAPALAKUL, P. Amino-functionalized mesoporous silica-magnetic graphene oxide nanocomposites as water-dispersible adsorbents for the removal of the oxytetracycline antibiotic from aqueous solutions: adsorption performance, effects of coexisting ions, and natural organic. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 6560–6576, 2020.

PRETE, M. C. et al. Preparation of Molecularly Imprinted Poly (methacrylic acid) Grafted on Iniferter-Modified Multiwalled Carbon Nanotubes by Living- Radical Polymerization for 17 β -Estradiol Extraction. **Journal of Chemical & Engineering**, v. 64, n. 5, p. 1978–1990, 2019.

PRETE, M. C.; TARLEY, C. R. T. Bisphenol A adsorption in aqueous medium by investigating organic and inorganic components of hybrid polymer (polyvinylpyridine/SiO₂/APTMS). **Chemical Engineering Journal**, v. 367, p. 102–114, 2019.

PRIYA, S. S.; RADHA, K. V. A Review on the Adsorption Studies of Tetracycline onto Various Types of Adsorbents. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, n. 8, p. 821–839, 2017.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: Is it all downhill from here? **Clinical Microbiology and Infection, Supplement**, v. 10, n. 4, p. 18–22, nov. 2004.

PULICHARLA, R. et al. Tetracyclines metal complexation: Significance and fate of mutual existence in the environment. **Environmental Pollution**, v. 221, n. 2016, p. 1–14, 2017.

QI, P. et al. Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols. **Polymer**, v. 51, n. 23, p. 5417–5423, 2010.

QIU, H. et al. Critical review in adsorption kinetic models. **Journal of Zhejiang University: Science A**, v. 10, n. 5, p. 716–724, 2009.

QU, Q.; ZHU, T. Preparation of hybrid-monomer, double-template molecularly imprinted polymers for the purification of green tea extracts. **Analytical Methods**, v. 9, n. 46, p. 6525–6533, 14 dez. 2017.

QUADRA, G. R. et al. **Medicamentos e Meio ambiente: soluções individuais, problemas coletivos**. Disponível em: <<https://www.oeco.org.br/colunas/colonistas-convidados/medicamentos-e-meio-ambiente-solucoes-individuais-problemas-coletivos/>>. Acesso em: 13 abr. 2020.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513–523, 2004.

RAFIEE, B.; FAKHARI, A. R.; GHAFFARZADEH, M. Impedimetric and stripping voltammetric determination of methamphetamine at gold nanoparticles-multiwalled carbon nanotubes modified screen printed electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 218, p. 271–279, 2015.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601–616, 2010.

RENKECZ, T. et al. Molecularly imprinted polymer microspheres containing photoswitchable spiropyran-based binding sites. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 17, p. 8537–8545, 2013.

RESENDE, M. A. C.; SILVA, D. N.; PEREIRA, A. C. Flow and batch injection systems with electrochemical detection applied in drugs determination. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 5, p. 1186–1209, 2020.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.

ROCHA, L. R. et al. Electroanalytical Determination of Morpholine as a Corrosion Inhibitor at a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **Analytical Letters**, v. 52, n. 7, p. 1–14, 2018.

ROCHA, L. R. et al. Development of a reliable and selective voltammetric method for determination of designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) using boron-doped diamond electrode and exploiting surfactant-mediated measurements. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 310, p. 127812, 2020.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. **Microchimica Acta**, v. 171, n. 3, p. 407–413, 2010.

RODRÍGUEZ, M. P.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Simple and clean determination of tetracyclines by flow injection analysis. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and**

Biomolecular Spectroscopy, v. 153, p. 386–392, 2016.

SAHOO, K. C. et al. Antibiotic use, resistance development and environmental factors: A qualitative study among healthcare professionals in Orissa, India. **BMC Public Health**, v. 10, n. 1, p. 629, 2010.

SAMANIDOU, V. F.; NIKOLAIDOU, K. I.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 15, p. 2430–2439, out. 2007.

SÁNCHEZ-POLO, M. et al. Molecular imprinted polymer to remove tetracycline from aqueous solutions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 203, p. 32–40, 2015.

SANLI, S.; SANLI, N.; ALSANCAK, G. Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and LC methods in water and acetonitrile-water binary mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 939–946, 2009.

SANTOS, M. G. et al. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 161–195, 2012.

SANTOS, S. M. et al. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 731–737, 15 fev. 2007.

SERESHTI, H. et al. Electrochemically controlled solid phase microextraction based on a conductive polyaniline-graphene oxide nanocomposite for extraction of tetracyclines in milk and water. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 6, p. 2304–2311, 2021.

SHETTI, N. P.; MALODE, S. J.; NANDIBEWOOR, S. T. Electro-oxidation of captopril at a gold electrode and its determination in pharmaceuticals and human fluids. **Analytical Methods**, v. 7, n. 20, p. 8673–8682, 2015.

SILVA, R. A. et al. Methodology to promote the qualitative detection of organic compounds in petroleum/water interfaces. **Quimica Nova**, v. 42, n. 1, p. 95–98, 2019.

SODHI, M.; ETMINAN, M. Therapeutic Potential for Tetracyclines in the Treatment of COVID-19. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, 2020.

SOORI, M. M. et al. Intercalation of tetracycline in nano sheet layered double hydroxide: An insight into UV/VIS spectra analysis. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 63, p. 271–285, 2016.

STEFANO, J. S. et al. Batch-injection versus Flow-injection Analysis Using Screen-printed Electrodes: Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Electroanalysis**, v. 28, n. 2, p. 350–357, 2016.

SUEDEE, R. et al. Use of molecularly imprinted polymers from a mixture of tetracycline and its degradation products to produce affinity membranes for the removal of tetracycline from water. **Journal of Chromatography B**, v. 811, n. 2, p. 191–200, 2004.

SUN, J. et al. Surface hydrophilic imprinted particles via a green precipitation polymerization for selective removal of tetracycline from aqueous solution. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 13, n. 3, p. 489–497, 2016.

SUN, Y. et al. One pot synthesis of magnetic graphene/carbon nanotube composites as

magnetic dispersive solid-phase extraction adsorbent for rapid determination of oxytetracycline in sewage water. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 53–59, 27 nov. 2015.

SUQUILA, F. A. C.; OLIVEIRA, L. L. G.; TARLEY, C. R. T. Restricted access copper imprinted poly(allylthiourea): The role of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and bovine serum albumin (BSA) on the sorptive performance of imprinted polymer. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 714–728, 2018.

TANG, W. et al. Preparation of hybrid molecularly imprinted polymer with double-templates for rapid simultaneous purification of theophylline and chlorogenic acid in green tea. **Talanta**, v. 152, p. 1–8, 15 maio 2016.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.

TARLEY, C. R. T. et al. Development of a Molecularly Imprinted Poly(Acrylic Acid)-MWCNT Nanocomposite Electrochemical Sensor for Tramadol Determination in Pharmaceutical Samples. **Electroanalysis**, v. 32, n. 5, p. 1130–1137, 2020.

THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.

TORMIN, T. F. et al. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 202, p. 93–98, 2014.

TORRES, R. D. N. S.; DREHER, A.; SIMIONI, T. A. Uso de antibióticos como promotor de crescimento e seus possíveis substitutos ao seu uso em frangos de corte. **NutriTime**, v. 12, n. 6, p. 4348–4358, 2015.

TR CU, T. R. OF THE C. U. **TR CU 021/2011- On Food Safety**. , 2011. Disponível em: <<http://www.eurexcert.com/TRCUpdf/TRCU-0021-On-food-safety.pdf>>. Acesso em: 8 jul. 2019

TRIVEDI, M. K. et al. Spectroscopic Characterization of Chloramphenicol and Tetracycline : An Impact of Biofield Treatment To cite this version : HAL Id : hal-01376485 Pharmaceutica Spectroscopic Characterization of Chloramphenicol and Tetracycline : An Impact of Biofield Trea. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 7, p. 1–5, 2015.

TURIEL, E.; ESTEBAN, A. M. Molecularly imprinted polymers. In: **Solid-Phase Extraction**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 215–233.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 87–99, 2010a.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 87–99, 4 jun. 2010b.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers-based microextraction techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 574–586, 2019.

UMPLEBY, R. J. et al. Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 804, n. 1, p. 141–149, 2004.

- VAN QUYNH, N. et al. Electrochemical deposition of gold nanoparticles-based plasmonic catalyst for glucose oxidation. **Vietnam Journal of Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 785–791, 2020.
- VARGAS MAMANI, M. C.; REYES REYES, F. G.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 545–552, 1 dez. 2009.
- VASAPOLLO, G. et al. Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5908–5945, 2011.
- VEGA, D. et al. Voltammetry and amperometric detection of tetracyclines at multi-wall carbon nanotube modified electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 3, p. 951–958, 2007.
- VENDAMME, R. et al. Influence of polymer morphology on the capacity of molecularly imprinted resins to release or to retain their template. **Polymer Journal**, v. 41, n. 12, p. 1055–1066, 2009.
- WAN IBRAHIM, W. A. et al. Application of Solid-Phase Extraction for Trace Elements in Environmental and Biological Samples: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 233–254, 3 jul. 2014.
- WANG, G. N. et al. Application of molecularly imprinted polymer based matrix solid phase dispersion for determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in meat. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1065–1066, p. 104–111, 2017.
- WANG, H. et al. Electrochemical Determination of Tetracycline Using Molecularly Imprinted Polymer Modified Carbon Nanotube-Gold Nanoparticles Electrode. **Electroanalysis**, v. 23, n. 8, p. 1863–1869, 2011.
- WANG, J. **Analytical electrochemistry**. third ed. ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2006.
- WANG, J.; CHEN, L. Small-volume batch-injection analyser. **The Analyst**, v. 119, n. 6, p. 1345–1348, 1994.
- WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, 1991.
- WANG, Q. et al. Photoresponsive molecularly imprinted hydrogel casting membrane for the determination of trace tetracycline in milk. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, n. 3, p. 123–130, 1 mar. 2016.
- WANG, S. et al. Analysis of tetracyclines from milk powder by molecularly imprinted solid-phase dispersion based on a metal–organic framework followed by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 12, p. 2604–2612, 2018.
- WANG, X. et al. A molecularly imprinted polymer-coated nanocomposite of magnetic nanoparticles for estrone recognition. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 327–332, 2009.
- WANGFUENKANAGUL, N.; SIANGPROH, W.; CHAILAPAKUL, O. A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode. **Talanta**, v. 64, n. 5, p. 1183–1188, 2004.
- WEI, D.; WU, S.; ZHU, Y. Magnetic solid phase extraction based on graphene oxide/nanoscale zero-valent iron for the determination of tetracyclines in water and milk

by using HPLC-MS/MS. **RSC Advances**, v. 7, n. 70, p. 44578–44586, 15 set. 2017.

WEI, X. et al. High-efficiency adsorption of tetracycline by the prepared waste collagen fiber-derived porous biochar. **RSC Advances**, v. 9, n. 67, p. 39355–39366, 2019.

WEN, Y. Recent advances in solid-phase extraction techniques with nanomaterials. In: **Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry: Modern Trends in Analysis**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 57–73.

WHITCOMBE, M. J. et al. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 27, p. 7105–7111, 1995a.

WHITCOMBE, M. J. et al. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 7105–7111, 1995b.

WHO, W. H. O. 2018. **WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption**. [s.l.: s.n.].

WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. Initial behavior of intraparticle diffusion model used in the description of adsorption kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 153, n. 1–3, p. 1–8, 2009a.

WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, n. 2–3, p. 366–373, 2009b.

WU, H. et al. Effects of the pH and anions on the adsorption of tetracycline on iron-montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 119, p. 161–169, 2016.

WU, X. J. et al. Determination of Tetracyclines in Milk by Graphene-Based Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 50, n. 4, p. 641–650, 4 mar. 2017.

WU, Y. et al. Bioinspired Synthesis of Janus Nanocomposite-Incorporated Molecularly Imprinted Membranes for Selective Adsorption and Separation Applications. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 7, p. 9104–9112, 2018a.

WU, Y. et al. Bioinspired synthesis of SiO₂/pDA-based nanocomposite-imprinted membranes with sol-gel imprinted layers for selective adsorption and separation applications. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 23, p. 15775–15783, 2018b.

WUFF, G.; SARHAN, A. Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 11, p. 341–345, 1972.

WULFF, G. Forty years of molecular imprinting in synthetic polymers: Origin, features and perspectives. **Microchimica Acta**, v. 180, n. 15–16, p. 1359–1370, 2 nov. 2013.

XU, J. J. et al. Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Honey and Milk by Miniaturized Solid Phase Extraction Using Chitosan-Modified Graphitized Multiwalled Carbon Nanotubes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 12, p. 2647–2654, 30 mar. 2016.

XU, Y. et al. Simultaneous determination of sulfonamides and fluoroquinolones from environmental water based on magnetic double-template molecularly imprinting

- technique. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 16, p. 16121–16134, 1 jun. 2018.
- XUE, J. et al. Simultaneous electrochemical detection of multiple antibiotic residues in milk based on aptamers and quantum dots. **Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 1981–1988, 2016.
- YANG, J. et al. Detection of trace tetracycline in fish via synchronous fluorescence quenching with carbon quantum dots coated with molecularly imprinted silica. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 450–456, 2018.
- YANG, X. et al. Modeling analysis of electrode fouling during electrolysis of phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, v. 94, p. 259–268, 2013.
- YANG, X. Q.; YANG, C. X.; YAN, X. P. Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 28–33, 23 ago. 2013.
- YEŞİLOVA, E. et al. Molecularly imprinted particle embedded composite cryogel for selective tetracycline adsorption. **Separation and Purification Technology**, v. 200, p. 155–163, 2018.
- YU, F.; MA, J.; HAN, S. Adsorption of tetracycline from aqueous solutions onto multi-walled carbon nanotubes with different oxygen contents. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2014.
- YU, H.; MU, H.; HU, Y. M. Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC-DAD. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 76–81, 2012.
- ZANG, J. et al. Removal of tetracycline by hydrous ferric oxide: Adsorption kinetics, isotherms, and mechanism. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 22, p. 4580, 2019.
- ZDRAVKOV, B. D. et al. Pore classification in the characterization of porous materials: A perspective. **Central European Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 385–395, 2007.
- ZEB, S. et al. Using magnetic nanoparticles/MIP-based electrochemical sensor for quantification of tetracycline in milk samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 900, p. 115713, 2021.
- ZHAN, J. et al. Preparation of a semicovalent, molecularly surface imprinted polymer for the rapid determination of trace acid orange II in food and environmental samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 19, p. 6353–6363, 2013.
- ZHANG, L. et al. Studies on the removal of tetracycline by multi-walled carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 178, p. 26–33, 2011.
- ZHANG, L. et al. A Molecularly Imprinted Polymer Capped Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots System for Sensitive Determination of Tetracycline in Animal-Derived Food. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 2, p. 839–846, 2020.
- ZHANG, Z. et al. Removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by amino-Fe (III) functionalized SBA15. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 471, p. 133–138, 2015.
- ZHAO, C. et al. One-pot method for obtaining hydrophilic tetracycline-imprinted particles via precipitation polymerization in ethanol. **Journal of Applied Polymer Science**, v.

131, n. 7, p. 1–11, 2014.

ZHAO, H. et al. Amperometric Sensor for Tetracycline Determination Based on Molecularly Imprinted Technique. **Procedia Environmental Sciences**, v. 18, p. 249–257, 2013.

ZHAO, Y. et al. Adsorption of tetracycline onto goethite in the presence of metal cations and humic substances. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 1, p. 247–251, 2011.

ZHOU, Y. et al. Restricted access magnetic imprinted microspheres for directly selective extraction of tetracycline veterinary drugs from complex samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1613, p. 460684, 2020.

ZHOU, Z. et al. A mesoporous fluorescent sensor based on ZnO nanorods for the fluorescent detection and selective recognition of tetracycline. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 71061–71069, 2016.

ZHU, Y. et al. Effect of phosphate on the adsorption of antibiotics onto iron oxide minerals: Comparison between tetracycline and ciprofloxacin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111345, 2020.

ZOU, Y. et al. Amperometric glucose sensor based on boron doped microcrystalline diamond film electrode with different boron doping levels. **RSC Advances**, v. 4, n. 102, p. 58349–58356, 2014.